

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

谢冰, 王秀峰, 樊治成

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 泰安 271018)

摘要:【目的】建立西葫芦离体雌核发育高频植株再生体系, 以加速自交系选育, 有效缩短西葫芦杂种一代育种周期。【方法】将西葫芦未受精胚珠接种至附加 2, 4-D、NAA、BA 的 N₆ 培养基上可形成胚状体, 该胚状体转接至无激素的 N₆ 培养基上可形成再生植株。【结果】试验共获得 120 棵再生植株 (R₀), 其中 41 株因生活力低下死亡, 8 株用于摸索移栽方法死亡, 71 株移栽成活且生长正常, 其中 42 株性状表现符合二倍体特征且育性正常, 已有 10 株获得自交果实及种子, 其余 29 株育性异常。试验结果表明, 胚珠发育时期、培养基、供体基因型及供体栽培季节等均显著影响胚状体诱导频率。【结论】胚状体起源于胚囊成员细胞, 再生植株为胚囊植株。试验筛选出 3 种诱导频率较高的培养基; 以开花前 1 日及当日的胚珠诱导频率较高; 秋播材料诱导效果最好。

关键词: 西葫芦 (*Cucurbita pepo* L.); 未受精胚珠; 离体培养; 胚囊植株

Improved Conditions of *in vitro* Culture of Unpollinated Ovules and Production of Embryonary Sac Plants in Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.)

XIE Bing, WANG Xiu-feng, FAN Zhi-cheng

(College of Hortscience and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

Abstract:【Objective】The aim of this research was to establish a high frequency plants regeneration system for summer squash (*Cucurbita pepo* L.) via *in vitro* gynogenesis, in order to provide a quick way to obtain self-bred lines for summer squash F₁ breeding. 【Method】Unpollinated ovules from summer squash ovaries were cultured on N₆ medium and supplemented with 2, 4 - D, NAA, BA. After the embryoids were obtained, they were transplanted into N₆ medium without growth regulators, and the regenerated plants would be obtained. 【Result】120 embryonary sac plants were regenerated in this research. Among them, 41 plants were died of reduced growth, 8 plants died of studying the regenerated method, 71 plants survived after transplanting into soil. In these survived plants, 42 have normal fertility and 10 of them had obtained self-bred fruits and seeds; 29 have abnormal fertility. The statistical results showed that ovules development stage, medium, material genotype and material planting season had significant effects on the embryoids inductivities. 【Conclusion】The embryoids came from the cells of embryonary sac, the regenerated plants are embryonary sac plants. 3 mediums had been selected for high inductivities. Ovules from one day before anthesis and the day of anthesis had higher inductivities and the materials planted in autumn was the best for induction of embryoids.

Key words: Summer squash (*Cucurbita pepo* L.); Unpollinated ovules; *in vitro* culture; Embryonary sac plant

0 引言

【本研究的重要意义】通过对蔬菜植物未受精胚珠或子房的离体培养人工诱导雌核发育, 可以获得单倍体及双单倍体植株, 进而可迅速获得纯合的系统^[1-3]。将

此技术应用于蔬菜一代杂种亲本自交系的选育, 可有效缩短育种周期、加快育种进程^[2], 同时也可以为基因转化提供高效的再生体系, 并为隐性基因的表达提供有利条件^[3]。所以, 未受精胚珠或子房的离体培养技术具有重要的理论意义和应用价值。【前人研究进

收稿日期: 2004-09-01; 接受日期: 2005-11-03

基金项目: 山东省良种产业化资助项目 (鲁科农字[2001]500号)

作者简介: 谢冰 (1968-), 女, 山东章丘人, 博士研究生, 研究方向为蔬菜遗传育种。通讯作者, 王秀峰、樊治成, E-mail: xfwang@sdau.edu.cn; fanzc@sdau.edu.cn

展】国内外有关植物未受精胚珠或子房离体培养的研究已有报道^[4-15]，但西葫芦 (*Cucurbita pepo* L.) 未受精胚珠离体培养的研究相对较少。Metwally^[4]以西葫芦栽培品种Eskandarani为供体，经未受精胚珠离体培养获得了再生试管小植株及愈伤组织，但未明确小植株的再生途径及愈伤组织的发育前途；陈学军等^[5]以西葫芦品种早青一代为供体，经愈伤组织途径仅获得了未受精胚珠离体培养的再生单倍体试管苗。【本研究切入点】上述研究的供体基因型均较单一，诱导频率也较低，而且缺乏对再生植株性状表现的观察。

【拟解决的关键问题】本试验采用 5 个西葫芦杂交组合作为供体材料，在对未受精胚珠离体诱导培养基进行大规模筛选的基础上，探讨西葫芦离体雌核发育的植株再生途径，并对其中 3 种诱导频率较高的培养基以及胚珠发育时期、供体基因型、供体栽培季节等对胚状体诱导频率的影响进行了比较研究，同时研究了胚状体的发育起源及再生植株的性状表现，以期建立高频西葫芦离体雌核发育植株再生体系，为加快西葫芦一代杂种亲本选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采用本课题组多年选育的自交系所配制的西葫芦杂交组合 1-S×G₁、15×23、20-3-9×17、15×G₁、G₁×15 为供体材料，分 3 季播种，春播：3 月上、中旬阳畦育苗，幼苗三叶一心时定植于露地；夏播：8 月上旬露地直播；秋播：9 月中、下旬育苗，幼苗三叶一心时定植于日光温室。待供体植株第二雌花开放后开始取样接种。

1.2 试验方法

1.2.1 胚状体的诱导 分别取开花前一日 (-1)、开花当日 (0)、开花后一日 (+1) 的雌花，其中，开花当日及开花后一日的雌花需于开花前扎花，以保证未授粉。去掉花冠，子房用 70% 酒精处理 30 min，无菌水冲洗 3 次，然后于无菌条件下从子房中剥取完整胚珠，接种于培养基上。本试验在参考前人研究结果^[4-10]的基础上，对胚状体诱导培养基进行了大量的筛选，最终确定了 3 种胚状体诱导频率较高的培养基，其中基本培养基均为 N₆ + 3% 蔗糖或 2% 葡萄糖 + 0.8% 琼脂，附加不同浓度的植物生长调节剂，共设 3 个处理，即 M₁: 4 mg·L⁻¹ 2, 4-D + 0.5 mg·L⁻¹ NAA + 1 mg·L⁻¹ BA; M₂: 4 mg·L⁻¹ 2, 4-D + 0.25 mg·L⁻¹ NAA + 1 mg·L⁻¹ BA; M₃: 2 mg·L⁻¹ 2, 4-D + 0.5 mg·L⁻¹ NAA +

1 mg·L⁻¹ BA。培养条件：25℃ 左右，光照 14 h/d，光强 2 000 lx。采用 3 因素随机区组试验设计，共 45 个处理，每个处理 3 次重复 (3 个培养皿)，每重复 (每个培养皿) 接种 50 个胚珠，统计胚状体诱导频率 (即形成胚状体的胚珠数占接种胚珠数的百分比)，进行方差分析及多重比较。

1.2.2 胚状体发育起源的确定 于未受精胚珠接种后 7、15、20、25、30、35 d 依次取样固定，采用石蜡切片法制片，番红-固绿二重染色，用倒置显微镜对胚珠接种后胚囊内胚状体的形成过程进行观察并照相，依此确定胚状体的发育起源。

1.2.3 再生植株的诱导、性状观察及倍性的初步确定 将胚状体转移至无激素的 N₆ 培养基上，附加 2% 蔗糖或葡萄糖，0.8% 琼脂，其余培养条件同胚状体诱导。4~6 周后，待再生植株生长至 3~4 片叶、根量较多时，可在炼苗后移栽至培养土中，成活后定植于网室内，转入常规管理，观察再生植株当代 (R₀) 的性状表现。采用叶片气孔保卫细胞叶绿体计数^[6]的方法，初步确定再生植株的倍性，即撕取叶片下表皮，置荧光显微镜下观察，每类型植株取 5 片叶，每片叶观察 10 个细胞进行叶绿体计数，取平均值。

2 结果与分析

2.1 胚状体的诱导

试验中，未受精胚珠接种 2 d 后开始出现以下 3 种类型的变化：一是胚珠逐渐膨大，珠被由黄白色转为绿色，且表面发亮，但整个胚珠不透明，数天后胚状体形成并突破珠被。从图-A 可以看到突破珠被并已发育为具有绿色芽端、黄白色根端的类似成熟胚的胚状体。该胚状体转接至诱导植株再生的培养基上即可发育为小植株 (图-B)。二是胚珠逐渐膨大，且整体透明，1 周内即有 1 肉眼可见的巨大液泡突破珠被，无胚状体的形成。三是胚珠陆续白化，停止形态建成，直至死亡 (图-A)。

2.1.1 供体材料基因型、接种时胚珠的发育时期以及培养基组成对胚状体诱导频率的影响 表 1 为全部试验处理组合的平均诱导频率。3 因素方差分析表明，本试验设计所考察的 3 个主效因素以及各因素之间的一级互作、二级互作均达极显著水平，其中，主效培养基、胚珠发育时期、供体材料的 F 值分别为 $F = 250.34 > F_{0.01} = 4.88$ 、 $F = 1553.36 > F_{0.01} = 4.88$ 、 $F = 137.66 > F_{0.01} = 3.56$ ，一级互作培养基×胚珠发育时期、培养基×供体、胚珠发育时期×供体的 F 值分别为 $F =$

表 1 培养基、胚珠发育时期及材料对胚状体诱导频率的影响

Table 1 Effects of medium, ovules development stage and material on the production of embryoids

培养基 Medium	胚珠发育时期 Ovules development stage	材料 Materials	胚状体平均诱导频率 Mean number of embryoid per/ 100 ovules (%)	培养基 Medium	胚珠发育时期 Ovules development stage	材料 Materials	胚状体平均诱导频率 Mean number of embryoid per 100 ovules (%)	
M1	-1	1-S×G1	9.3ghGH	M3	+1	15×G1	15.0eE	
		15×23	8.0hH			G1×15	11.3fgFG	
		20-3-9×17	15.0eE			1-S×G1	3.0jJ	
	15×G1	5.0iI	15×23			1.4k		
	G1×15	6.0iI	20-3-9×17			0		
	1-S×G1	5.0iI	15×G1			2.0jk		
	0	15×23	11.0fgFG		G1×15	0		
		20-3-9×17	16.0eE		-1	1-S×G1	18.7cdCD	
		15×G1	7.0hH			15×23	12.0fF	
		G1×15	8.0hH			20-3-9×17	25.0bB	
		+1	1-S×G1			0	15×G1	12.5fF
			15×23			0	G1×15	15.0eE
20-3-9×17	1.4k		0	1-S×G1		10.0gG		
15×G1	0.7k	15×23		25.0bB				
G1×15	2.0jk	20-3-9×17		30.0aA				
M2	-1	1-S×G1		20.0cC	15×G1	16.7eE		
		15×23		11.0fgFG	G1×15	10.6gG		
		20-3-9×17		18.0dD	+1	1-S×G1	0.7k	
	15×G1	10.0gG	15×23	0.8k				
	G1×15	12.0fF	20-3-9×17	1.0k				
	0	1-S×G1	15.4eE	15×G1		0		
15×23		21.0cC	G1×15	1.0k				
20-3-9×17		24.0bB						

数据为 3 次重复的平均值。不同小写字母表示 5% 水平上差异显著，不同大写字母表示 1% 水平上差异显著

The data were the means of three replications. Different small and capital letters represents significant difference at 5%, 1% level, respectively

53.54 > $F_{0.01} = 3.56$ 、 $F = 11.10 > F_{0.01} = 2.74$ 、 $F = 71.19 > F_{0.01} = 2.74$ ，二级互作培养基×胚珠发育时期×供体的 F 值为 $F = 6.70 > F_{0.01} = 2.24$ 。这一分析结果说明，培养基组成、接种时胚珠的发育时期以及供体材料的基因型对西葫芦胚状体的诱导均有很大影响，而且这 3 个因素两两之间以及 3 个因素之间的交互效应对诱导频率也有较大影响。具体结果为，接种时胚珠的发育时期是对诱导频率影响最大的因素，其次为培养基，供体基因型的影响在 3 个主效因素中最小；一级互作对胚状体诱导频率的影响次序为胚珠发育时期×供体 > 培养基×胚珠发育时期 > 培养基×供体；在所有主效及互作效应中，二级互作培养基×胚珠发育时期×供体对胚状体诱导频率的影响相对较小。

多重比较结果表明，胚珠发育时期以开花当日的胚珠平均诱导频率最高 15.1%；其次为开花前一日的胚珠（13.2%）；开花后一日的胚珠最低（0.9%）。培养基以 M3 的平均诱导频率最高（11.9%）；其次为

M2（10.9%）；M1 最低（6.3%）；供体以 20-3-9×17 的平均诱导频率最高（14.5%），其次 15×23 为 10.0%、1-S×G1 为 9.3%，15×G1、G1×15 的平均诱导频率均较低，分别为 7.7%、7.3%。

试验中各级互作效应均极显著，所以，不同基因型供体存在不同的最优处理组合。从表 1 可以看出，1-S×G1 的最优处理为采用 M2 培养基、接种开花前一日的胚珠；15×23、20-3-9×17、15×G1 的最优处理均为采用 M3 培养基、接种开花当日的胚珠；G1×15 的最优处理为采用 M3 培养基、接种开花前一日的胚珠；全部试验处理中的最优组合为平均诱导频率最高的组合，即 20-3-9×17 采用 M3 培养基、接种开花当日的胚珠。

综合以上分析，接种时胚珠的发育时期是诱导西葫芦离体雌核发育的关键因素，在本试验的诱导条件中，其作用大于培养基与供体基因型的效应，这一结果与前人在玉米^[14]等作物上的研究一致。根据西葫芦

雌配子体的发育进程, 雌花开放当日的胚囊为成熟胚囊, 开花前一日胚囊也接近成熟。诱导结果表明, 西葫芦成熟以及接近成熟的胚囊对人工诱导条件比较敏感, 而成熟后的胚囊成员细胞在离体条件下较难启动分裂。本试验筛选的 3 种培养基中, M₃、M₂ 的诱导频率均较高, 有较大的利用价值。所以, 进行西葫芦离体雌核发育的人工诱导, 应在兼顾培养基与供体基因型筛选的前提下, 注重对胚珠发育时期的选择, 提高胚状体的诱导频率。

2.1.2 供体材料栽培季节的影响 统计结果表明(表 2), 接种时供体材料的生长季节对胚状体的诱导频率有一定的影响, 不同播期的材料其胚状体发生频率存在极显著差异, 其中, 秋播材料的诱导频率最高, 夏播与春播均很低, 5 份供体材料的表现一致。初步分

析认为, 该结果可能与西葫芦为短日性植物有关。秋播时供体植株的盛花期处在短日条件下, 该条件可能启动了某些与雌核发育相关基因的表达, 从而表现较高的胚状体发生频率。具体原因值得进一步研究。

2.2 胚状体的发育起源

图-C 为培养 7 d 的胚珠切片, 从位置判断, 珠孔端染色较深的部位应为卵器细胞启动分裂形成的类似原胚的胚状体, 合点端的反足细胞已退化。培养 15、20 d 的胚珠切片显示, 珠孔端染色较深的部分逐渐扩大, 说明随着细胞的不断分裂, 胚状体的细胞数逐渐增加, 进而形成球形(图-D, -E)。培养 25 d 的胚珠切片显示球形的胚状体, 尾部存有尚未退化的胚柄(图-F)。培养 30 d 的胚珠切片显示近似心形的胚状体(图-G), 培养 35 d 的胚珠切片显示已突破珠被的近似鱼

表 2 供体材料栽培季节对胚状体诱导频率的影响

Table 2 Effect of planting season on the production of embryoids

栽培季节 Planting season	材料 Materials				
	1-S×G1	15×23	20-3-9×17	15×G1	G1×15
春播 Sowing in spring	1.0 B	0	0	0	0
夏播 Sowing in summer	2.0 B	0	0	0.6B	1.1B
秋播 Sowing in autumn	18.7 A	12.0	25.0	12.5A	15.0A

数据为开花前一日的胚珠在培养基 M₃ 上的诱导结果(平均值)。不同大写字母表示 1% 水平上差异显著

The data were the inductive results from ovules one day before anthesis on M₃ (mean). Different capital letters A, B represents significant difference at 1% level

雷形的胚状体(图-H)。以上不同培养时期胚珠切片的观察结果表明, 本试验所获得的胚状体起源于单倍的胚囊成员细胞, 且为珠孔端的卵器细胞, 胚状体发育形成的再生植株确为胚囊植株。

2.3 再生植株(R₀)的诱导、性状表现及倍性的初步确定

2.3.1 再生植株(胚囊植株, R₀)的诱导 胚状体转接后生长迅速, 1 周内长度达 0.5~1.0 cm(图-B)。在再生植株的形成过程中观察到 4 种情况: 一是胚状体转接后 3 周内可生根, 且根量大, 芽生长点正常, 叶片伸展, 再生植株生长状况良好, 其叶片与供体材料即正常二倍体植株的幼苗叶大小接近, 胚状体成苗率高, 高者可达 80% 以上, 且移栽成活率高(图-I)。二是胚状体成苗后生长速度缓慢, 与同期转接形成的再生植株相比, 叶片细小, 发根慢且根量极少, 植株长势弱, 移栽前白化、死亡或移栽后生长缓慢, 然后

逐渐死亡。三是胚状体的芽发育正常, 可分化叶片, 且叶片伸展, 但生根困难, 转接至改变成分的生根培养基后仍难以正常生根, 因而无法形成完整的再生植株。分析认为可能与胚状体诱导阶段的培养基组成及供体材料的基因型有关, 具体原因尚需进一步研究。四是胚状体的根系发育良好, 且较发达, 但芽发育不良, 并逐渐变黄、白化, 不能形成完整的再生植株。初步分析认为, 可能是由于诱导过程中雌核发育畸形, 造成胚状体的芽发育不健全, 从而导致生长点逐步退化、死亡。原因尚待进一步查明。

2.3.2 再生植株当代(R₀)的性状表现 试验经未受精胚珠离体培养共获得 120 株西葫芦再生植株(R₀, 胚囊植株), 移栽成活 90 株。在死亡的 30 株组培苗中, 有 8 株生长健壮但因用于摸索移栽方法而死亡, 其余植株虽然都有根、芽的分化, 但与移栽成活的个体相比, 长势极弱, 叶片细小并呈半透明状, 根量极

少。在 90 株移栽成活的再生植株中，有 19 株在定植露地 2 周后逐渐停止生长，与同时定植的其它再生植株相比，这一批植株明显表现个体矮小，生长极为缓慢，叶片呈黄绿色，只着生雄花，而且不能正常开放（图-J），定植 3 周后，植株陆续黄化死亡。其余移栽成活的再生植株在定植露地后，生长状况良好，叶片伸展，叶面积大小与二倍体植株的叶片基本一致。有 42 株的雌、雄花发育正常，并能正常开放，花冠的大小、颜色以及柱头、花药的形状均与二倍体植株相似，其中 10 株自交授粉后果实发育正常、种子饱满（图-K）。其余的植株则表现出不同程度的不育性，如雌、雄花器无异常，自交授粉后果实发育也基本正常，但种子不饱满，且无发芽能力；雌、雄花的大小虽与二倍体植株的相似，但不能正常开放等（图-L）。

2.3.3 再生植株当代（R₀）倍性的初步确定 杜胜利等^[6]对黄瓜倍性鉴定的研究表明，叶片气孔保卫细胞叶绿体数通常随植株倍性成正比增加，可以作为一个重要依据来间接鉴定植株的倍性。因此，本试验将移栽成活的 R₀ 代植株分为两组，即黄化、死亡的植株与正常开花、坐果的植株，分别进行叶片气孔保卫细胞叶绿体计数。从表 3 结果可以看出，R₀ 代植株叶片的气孔保卫细胞叶绿体数之间存在显著差异，两种类型植株叶片气孔保卫细胞叶绿体数之比接近 1：2。由此，可初步间接确定这两类植株分别为单倍体和双单倍体。

表 3 再生植株当代（R₀）叶片气孔保卫细胞叶绿体数

Table 3 Guard cell chloroplast numbers of regenerated plants

材料	叶绿体数
Materials	Chloroplast number
黄化、死亡的植株	5.2b
Dead plant	
正常开花、坐果的植株	11.6a
Flowering and fruit-bearing plant	

不同字母表示 5% 水平上差异显著

Different small letters represents significant difference at 5% level

3 讨论

3.1 已有的研究表明，在植物未受精胚珠或子房离体培养所获得的再生植株群体中，主要包括 3 类起源于胚囊成员细胞的个体，即单倍体、自然加倍的双单倍体、多倍体与非整倍体，这 3 类个体一般称为胚囊植株，在植物遗传学研究及育种实践中均有很高的利用价值。本试验通过对西葫芦未受精胚珠的离体培养，

经胚状体途径产生了一定数量的再生植株（R₀），胚胎学研究证实，胚状体的发生起源于胚囊内位于珠孔端的卵器细胞。这充分说明，本试验所获得的西葫芦再生植株是胚囊植株，所筛选出的再生体系具有较高的利用价值。关于再生植株的倍性，本试验仅利用叶片气孔保卫细胞叶绿体计数的方法进行了初步确定。由于西葫芦的染色体很小，增加了胚囊植株细胞学鉴定的难度，加之所获得的再生植株数量有限，本研究目前尚未寻找到理想的倍性鉴定方法，今后还需要继续摸索。

3.2 据文献报道，植物的离体雌核发育有胚状体与愈伤组织两条途径，在水稻、小麦^[14]等作物上发现这两条途径并存，而在洋葱^[9]、烟草、大麦^[14]等作物上只观察到了胚状体途径。Metwally 等的研究^[4]获得了西葫芦离体雌核发育的试管小植株及愈伤组织，再生小植株中双单倍体与单倍体数量之比为 3：1，但未明确小植株的再生途径及愈伤组织的发育前途。陈学军等^[5]通过愈伤组织途径仅获得了西葫芦未受精胚珠离体培养的再生单倍体试管苗，且未报道再生植株的数量。本试验诱导的西葫芦离体雌核发育是经胚状体途径获得再生植株的，在得到 120 株胚囊植株（R₀）中，41 株因生活力低下死亡，8 株因用于摸索移栽方法死亡。71 株移栽成活且生长正常的植株中，42 株性状表现符合二倍体特征且育性正常，并已有 10 株获得自交果实及种子，其余 29 株育性异常。至于西葫芦的离体雌核发育是否存在愈伤组织途径，从而对胚的形态发生、再生植株的诱导频率产生影响，均有待深入研究。

3.3 本试验还对育性正常的胚囊植株进行了单株自交，现已获得成熟、饱满且发芽率较高的种子，得到了再生植株 R₁ 代（自交第一代）株系。通过田间性状观察、比较发现，R₁ 代株系内个体间性状表现整齐一致，未发生性状分离，且与 R₀ 代植株表现一致，但与供体材料及杂交组合的亲本之间存在一定的性状差异。由此可进一步说明，本研究所获得的正常可育的再生植株（R₀）确为双单倍体（DH）胚囊植株。

4 结论

4.1 本试验通过西葫芦未受精胚珠的离体培养经胚状体途径获得了再生植株，胚胎学研究证实，胚状体的发生起源于胚囊内珠孔端的卵器细胞，证明再生植株为胚囊植株。

4.2 试验结果表明，接种时胚珠的发育时期、培养基、供体基因型是影响西葫芦未受精胚珠胚状体诱导频率

的主要因素,且互作效应极显著。本试验筛选出3种诱导频率较高的培养基配方,5份供体材料表现为接种开花前一日及开花当日的胚珠胚状体诱导频率较高。供体的栽培季节也是影响胚状体诱导频率的重要因素,其中以秋播材料的诱导效果最好。

4.3 本研究所获得的再生胚囊植株是一个复杂的群体,包括生活力低下并逐步黄化死亡、生活力强且育性正常、生长正常但育性异常等多种类型的个体。

References

- [1] 孟金陵. 植物生殖遗传学. 北京: 科学出版社, 1995: 368-382.
Meng J L. *Plant Reproduction Genetic*. Beijing: Science Press, 1995: 368-382. (in Chinese)
- [2] 李竞雄, 宋同明. 植物细胞遗传学. 北京: 科学出版社, 1993: 307-344.
Li J X, Song T M. *Plant Cell Genetic*. Beijing: Science Press, 1993: 307-344. (in Chinese)
- [3] 蔡得田, 陈冬玲. 植物遗传工程的理想受体——胚囊. 华中农业大学学报, 1986, 5: 427-433.
Cai D T, Chen D L. The best receptor of plant genetic engineering-embryonary sac. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1986, 5: 427-433. (in Chinese)
- [4] Metwally E I, Moustafa S A, El-Sawy B I, Haroun S A, Shalaby T A. Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1998, 52: 117-121.
- [5] 陈学军, 邢国民, 陈竹君. 西葫芦未授粉胚珠离体培养和植株再生. 浙江农业学报, 2000, 12: 165-167.
Chen X J, Xing G M, Chen Z J. *In vitro* induction of plants from unpollinated ovules in summer squash. *Acta Agriculture Zhejiangensis*, 2000, 12: 165-167. (in Chinese)
- [6] 杜胜利, 韩毅科, 魏爱民, 王 鸣, 陈启民, 侯 锋. 黄瓜倍性鉴定方法的研究. 园艺学报, 2002, 29: 280-281.
Du S L, Han Y K, Wei A M, Wang M, Chen Q M, Hou F. Ploidy determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, 29: 280-281. (in Chinese)
- [7] 田惠桥, 杨弘远. 韭菜未传粉子房培养中单倍体的胚胎发生和植株再生. 实验生物学报, 1989, 22: 139-142.
Tian H Q, Yang H Y. Haploid embryogeny and plant regeneration in unpollinated ovary culture of *Allium tuberosum*. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 1989, 22: 139-142. (in Chinese)
- [8] Lux H, Herrmann L, Wetzel C. Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules. *Plant Breeding*, 1990, 104: 177-183.
- [9] Roger C. Muren. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. *Hortscience*, 1989, 24: 833-834.
- [10] Geoffriau E, Kahane R, Rancillac M. Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*, 1997, 94: 37-44.
- [11] Li R B, Pandey M P, Garg G K, Pandey S K, Dwivedi D K, Ashima. Development of a technique for *in vitro* unpollinated ovary culture in rice, *Oryza sativa* L. *Euphytica*, 1998, 104: 159-166.
- [12] Tosca A, Arcara L, Frangi P. Effect of genotype and season on gynogenesis efficiency in *Gerbera*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1999, 59: 77-80.
- [13] Li R B, Pandey M P, Pandey S K, Dwivedi D K. Agro-morphological characterization of ovary culture-derived plants of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 1999, 106: 197-203.
- [14] 周 嫦, 杨弘远. 未传粉子房与胚珠的离体培养. 武汉大学学报(自然科学版), 1982, 3: 61-72.
Zhou C, Yang H Y. *In vitro* culture of unpollinated ovaries and ovules in angiosperms. *Journal of Wuhan University*, 1982, 3: 61-72. (in Chinese)
- [15] Keller J. Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa*). *Euphytica*, 1990, 47: 241-247.

(责任编辑 曲来娥)