

瓜类作物离体雌核诱导单倍体研究进展

周霞¹, 邓英², 陈劲枫^{1,*}

(¹南京农业大学园艺学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095; ²贵州省农业科学院园艺研究所, 贵阳 550006)

摘要: 单倍体和双单倍体对于作物改良和遗传分析具有重要意义。在瓜类作物的研究中, 通过诱导离体雌核发育是获得单倍体和双单倍体的有效途径。综述了瓜类作物未受精子房和胚珠离体培养的研究概况及影响因素, 总结了再生植株鉴定、单倍体加倍和应用方面的进展, 分析了目前研究存在的问题以及未来的研究方向, 最后对瓜类作物单倍体研究的发展前景做简要地展望, 以期后续瓜类作物离体雌核发育诱导单倍体的研究提供参考。

关键词: 瓜类作物; 离体雌核发育; 单倍体; 双单倍体

中图分类号: S 65

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 09-1810-17

Research Progress on Haploid Induction of Cucurbitaceous Crops Based on *in vitro* Gynogenesis

ZHOU Xia¹, DENG Ying², and CHEN Jinfeng^{1,*}

(¹State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Institute of Horticulture, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

Abstract: Haploid and double haploid are of great significance for crop improvement and genetic analysis. In the study of cucurbits crops, *in vitro* gynogenesis is an effective way to obtain haploid and double haploid. Here we mainly review the research overview and major factors of the *in vitro* unfertilized ovule and ovary culture in cucurbit crops and summarize the progress in the identification of regenerated plants, haploid doubling, and related application. Besides, the existing problems and further research directions are also analyzed. Finally, the prospects for the development of haploid research in cucurbits crops are briefly prospected. This provides a reference for the following studies on the inducing haploid development of *in vitro* gynogenesis in cucurbits crops.

Keywords: cucurbits crop; *in vitro* gynogenesis; haploid; double haploid

单倍体 (Haploid) 植物的体细胞染色体数与其配子染色体数相同, 对其进行基因组加倍可以获得纯合的双单倍体 (Doubled haploid, DH), 这是在杂合子代中实现单步完全纯合的一种快速有效的方法。由于单倍体植物的细胞内只含有一组同源染色体, 所以 DH 每个基因位点上的每组等位基

收稿日期: 2020 - 05 - 19; 修回日期: 2020 - 07 - 13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31902007)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jfchen@njau.edu.cn)

因是纯合的, 因此单倍体和双单倍体在作物品种改良、突变体筛选、基因功能验证、遗传图谱构建、细胞学研究等方面具有重要作用。

在葫芦科植物中, 自发产生单倍体的频率极低, 仅为 0.002% ~ 0.02% (Savin et al., 1988)。人工诱导雄性或雌性配子细胞发育是获得单倍体的主要途径。雄核发育 (Androgenesis) 是雄配子经过细胞分裂发育成胚的过程, 包括花药培养和小孢子培养; 雌核发育 (Gynogenesis) 是指卵子没有与精子融合, 雌配子体 (胚囊) 被诱导产生只含有母体遗传信息的胚, 这个过程类似于孤雌生殖 (Parthenogenesis)。通过雌核途径人工诱导单倍体的方法较多, 除去花药和小孢子培养的雄核途径, 其他方法可归为雌核途径, 包含未受精胚珠和子房离体培养、辐射花粉授粉和远缘杂交结合胚拯救、玉米中诱导系授粉。在许多作物中雄核途径是获得单倍体的有效方法, 如烟草 (Dunwell, 1976)、西瓜 (薛光荣 等, 1983)、油菜 (Siebel & Pauls, 1989; 李恂和官春云, 1994)、水稻 (Raina & Irfan, 1998)、小麦 (李艳萍, 2003; Minesh et al., 2004)、大白菜 (曹鸣庆 等, 1993; 申书兴 等, 1999) 等。

在瓜类作物单倍体的研究中, 西瓜通过雄核途径中的花药培养较为成功; 雌核途径中, 辐射花粉授粉已有不少成功的报道, 但花粉辐射、授粉和胚拯救是个耗时费力的过程, 远缘杂交则少有成功的报道, 目前离体雌核途径是诱导黄瓜、南瓜、甜瓜和西葫芦产生单倍体的有效方法, 并且通过该方法能获得自发加倍的双单倍体, 但该方法还未形成稳定、高效的再生体系。本文中对瓜类作物离体雌核途径的未受精胚珠和子房离体培养研究进展进行综述, 并分析目前研究中存在的问题, 对发展前景做简要展望, 以期后续瓜类作物离体雌核发育诱导单倍体的研究提供参考。

1 瓜类作物离体雌核发育诱导单倍体的研究概况

单倍体可以通过自发或者人工方式诱导雄核和雌核发育获得。自发的单倍体来自低频率的半配合、多胚、染色体消除、雌核发育和雄核发育, 人工诱导是获得单倍体的主要方法, 其中未受精胚珠和子房的离体培养是诱导瓜类作物产生单倍体的有效途径。子房是雌蕊基部膨大的部分, 由子房壁、胎座和胚珠组成, 胚囊则深藏在胚珠的珠心组织中。多数被子植物的成熟胚囊是七细胞八核的蓼型结构, 具有 1 个卵细胞、2 个助细胞、中央细胞 (2 个极核) 和 3 个反足细胞, 它们由减数分裂形成的单核胚囊细胞经核分裂 3 次形成, 这些细胞是单倍性的。未受精胚珠和子房的离体培养就是诱导胚囊细胞分裂及分化最终产生单倍体或双单倍体植株的过程。

20 世纪 50 年代开始, 印度学者在未受精胚珠和子房培养方面做了大量研究 (Chopra, 1958; Sachar & Kapoor, 1959; Guha & Johri, 1966; Rangan, 1982), 在离体培养诱导雌配子再生植株的可能性方面奠定了理论基础, 但未成功获得单倍体植株。1976 年 San (1976) 首次利用大麦未受精子房培养获得单倍体植株, 之后许多学者做了大量的研究和探索, 相继在烟草和小麦 (祝仲纯和吴海珊, 1979)、水稻 (周端和杨弘远, 1980)、玉米 (敖光明 等, 1982)、甜菜 (Hoseman & Bossoutrot, 1983)、马铃薯 (陶自荣 等, 1985)、西葫芦 (Chambonnet & Dumas, 1985)、洋葱 (Muren, 1989)、黄瓜 (Gémes-Juhász et al., 2002) 等作物中获得未受精胚珠或子房培养的单倍体植株。该方法在禾本科、茄科、百合科、葫芦科及菊科等物种中研究较多, 洋葱 (Luthar & Bohanec, 1999) 和甜菜 (Gurel et al., 2000) 成为离体雌核发育研究的模式物种, 并在生产中被有效利用。瓜类中南瓜属、葫芦属、西瓜属、甜瓜属和苦瓜属均已获得了单倍体 (雷春和陈劲枫, 2006), 但目前还没有形成稳定、高效的再生体系。

表 1 中总结了在瓜类作物黄瓜、南瓜、甜瓜、西葫芦和西瓜中通过未受精胚珠和子房离体培养获得再生植株的报道。

表 1 瓜类作物通过未受精胚珠和子房离体培养获得再生植株
Table 1 Cucurbits plants regenerated through unfertilized ovule and ovary culture

| 物种 Species | 外植体 Explant | 结果 Result | 参考文献 Reference |
|------------------|--------------------|---|--|
| 黄瓜 Cucumber | 子房片 Ovary slice | 单倍体 Haploid | 杜胜利, 2002; Gémes-Juhász et al., 2002; 裴晓利, 2011 |
| | | 单倍体、双单倍体和四倍体 | Diao et al., 2009 |
| | | Haploid, double haploid and tetraploid | |
| | | 单倍体、双单倍体、四倍体和混倍体 | 刘立功 等, 2015 |
| | | Haploid, double haploid, tetraploid and mixoploid | |
| | 胚珠 Ovule | 单倍体、双单倍体和三倍体 | Sornitip et al., 2017 |
| | | Haploid, Double haploid and Triploid | |
| | | 单倍体、双单倍体和同源四倍体 | 周霞 等, 2020 |
| | | Haploid, Double haploid and autotetraploid | |
| | | 单倍体、双单倍体 Haploid and double haploid | Suprunova & Shmykova, 2008; Plapung et al., 2014a, 2014b |
| 南瓜 Pumpkin | 子房片 Ovary slice | 单倍体、二倍体 Haploid and diploid | 王烨 等, 2015 |
| | | 获得植株未鉴定 Unidentified plants | 闵子扬 等, 2016; Zou et al., 2020 |
| | | 单倍体、双单倍体和三倍体 | 邓英 等, 2018 |
| | | Haploid, double haploid and triploid | Kwack & Fujieda, 1988 |
| | | 单倍体、二倍体 Haploid and diploid | |
| | 胚珠 Ovule | 获得植株未鉴定 Unidentified plants | 武习习, 2018 |
| | | 单倍体、二倍体和混倍体 | 孙守如 等, 2013 |
| | | Haploid, diploid and mixoploid | 孙守如, 2011; Kurtar et al., 2018 |
| | | 单倍体、二倍体和混倍体 | |
| | | Haploid, diploid and mixoploid | Ficcadenti et al., 1999 |
| 甜瓜 Melon | 子房片 Ovary slice | 单倍体和双单倍体 Haploid and double haploid | Malik et al., 2011 |
| | | 单倍体、三倍体和四倍体 | 韩丽华, 2004 |
| | | Haploid, Triploid and Tetraploid | |
| | | 单倍体 Haploid | Koli & Murthy, 2013 |
| | | 获得植株未鉴定 Unidentified plants | 程慧, 2013 |
| | 胚珠 Ovule | 单倍体、二倍体和混倍体 | 赵晓菲, 2014 |
| | | Haploid, Diploid and Mixoploid | |
| | | 单倍体、二倍体和四倍体 | 唐桃霞, 2015 |
| | | Haploid, Diploid and tetraploid | |
| | | 单倍体和二倍体 Haploid and diploid | Chambonnet & Dumas, 1985; Metwally et al., 1998; Shalaby, 2007 |
| 西葫芦 Squash | 子房片 Ovary slice | 获得植株未鉴定 Unidentified plants | Dumas & Chambonnet, 1986 |
| | | 单倍体 Haploid | 郭永强, 2004; 陈学军 等, 2000 |
| | | 单倍体、双单倍体和混倍体 | 谢冰, 2005; 刘栓桃 等, 2008 |
| | | Haploid, Double haploid and mixoploid | |
| | | 二倍体、四倍体和混倍体 | 徐静, 2007 |
| | 胚珠 Ovule | Diploid, Tetraploid and mixoploid | |
| | | 单倍体、二倍体和多倍体 | 葛志东, 2009; 李伟, 2012; 王朝阳, 2012 |
| | | Haploid, Diploid and polyploid | |
| | | 四倍体和混倍体 Tetraploid and mixoploid | 李迎迎, 2017 |
| | | 单倍体和二倍体 Haploid and diploid | Zou et al., 2018; 龚思 等, 2019; 闵子扬 等, 2019 |
| 西瓜 Watermelon | 胚珠 Ovule | 单倍体、二倍体和四倍体 | 李玲, 2014 |
| | | Haploid, diploid and tetraploid | |
| | | 单倍体和二倍体 Haploid and diploid | 张立杰 等, 2015 |
| | | 单倍体和双单倍体 Haploid and double haploid | 荣文娟, 2015 |

Chambonnet 和 Dumas (1985) 首次从西葫芦的胚珠培养中获得单倍体植株, 之后研究者在南瓜 (Kwack & Fujieda, 1988)、甜瓜 (Ficcadenti et al., 1999), 黄瓜 (Gémes-Juhász et al., 2002)、西瓜 (李玲, 2014) 中也相继获得再生植株。其中, 通过该方法在黄瓜和西葫芦上获得成功的报道最

多, 南瓜和甜瓜上的次之, 西瓜上的最少, 这也在一定程度上说明, 不同物种雌配子再生植株的难易程度是有差异的。从已有的单倍体研究来看, 黄瓜和南瓜更适宜通过未受精胚珠、子房离体培养和辐射花粉授粉获得单倍体; 甜瓜通过辐射花粉授粉获得单倍体的报道较多; 西瓜花药培养是获得单倍体的有效方法; 西葫芦通过雌核发育途径诱导都能获得成功。从瓜类作物未受精胚珠、子房离体培养获得再生植株的倍性看, 培养中除单倍体以外还能产生较大比例的其他倍性的再生植株, 说明在培养中染色体能自发加倍, 这些植株可以作为特异的种质资源直接用于育种等研究。

2 影响瓜类作物未受精胚珠和子房离体培养的因素

2.1 培养流程及存在问题

瓜类作物胚珠和子房离体培养过程涉及多个操作步骤, 且不同研究中所用处理方式不同(图 1), 虽然已相继获得多种瓜类的单倍体植株, 但存在再生效率低, 培养体系不稳定等问题。影响瓜类作物未受精胚珠和子房离体培养获得单倍体的因素很多, 主要包括供体材料的基因型、培养基成分、雌配子发育阶段、冷处理、热激、切片方式等, 探究多种因素的影响并加以优化是提高植株再生率的关键。

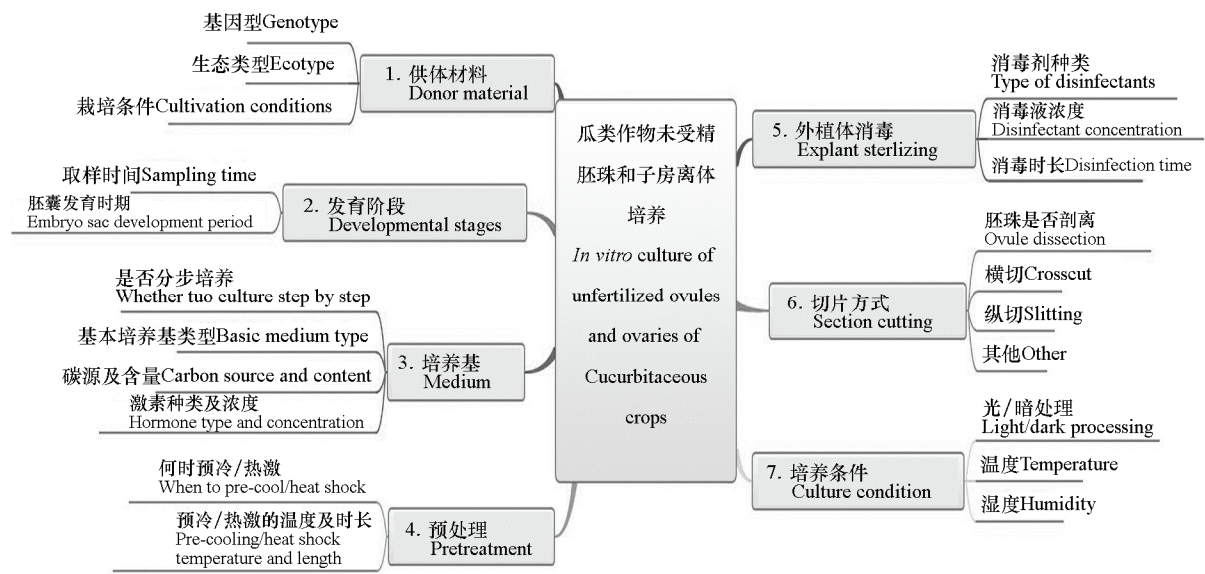


图 1 未受精胚珠和子房离体培养流程和影响因素

Fig. 1 Basic steps and factors involved in unfertilized ovule and ovary culture protocol

2.2 基因型的影响

大量研究表明, 供体材料的基因型是影响子房和胚珠离体培养成功的关键因素。在黄瓜中, 不同基因型黄瓜子房和胚珠培养的胚诱导率有明显差异(陈小鹏 等, 2005; Diao et al., 2009; Moqbeli et al., 2013; Tantasawat et al., 2015)。在南瓜中, 离体雌核诱导时不同材料的胚状体诱导率和愈伤率不同(闵子扬 等, 2016; 武习习, 2018)。在甜瓜中, 王林(2009)用 3 种生态类型的品种进行

未受精胚珠离体培养,发现品种不同,不仅影响离体培养的诱导效果,也影响发育的途径。在西葫芦中,有研究发现基因型是影响离体雌核发育的主要因素(谢冰,2005;徐静,2007;李伟,2012),不同基因型材料在未授粉子房培养时的诱导效果不同(唐桃霞,2015)。在西瓜中,也有研究表明基因型是影响离体雌核发育的关键因素(荣文娟,2015;李迎迎,2017;Zou et al.,2018),闵子扬等(2019)报道不同品种西瓜胚状体诱导率在2.3%~23.3%之间。因此,在瓜类作物中,供试材料的基因型、生态类型是影响子房培养的因素,这一特异性问题造成培养效果难以稳定重复,从而限制了子房和胚珠培养的发展,而基因型的影响在机理方面的研究还未见报道,需要做进一步的探索。

2.3 培养基与生长调节剂的影响

培养基对瓜类作物未授粉子房和胚珠培养有显著影响,其中基础培养基、生长调节剂种类以及浓度是众多研究者关注的焦点。在基础培养基的选择上,许多研究者将MS作为基础培养基(陈学军等,2000;Diao et al.,2009;牛明明,2012;唐桃霞,2015;Sorntip et al.,2017;闵子扬等,2019),在黄瓜中,学者们使用了黄瓜基础培养基CBM(Gémes-Juhász et al.,2002;Li et al.,2013;Plapung et al.,2014a,2014b)。谢冰等(2006)在西葫芦子房培养中应用N₆培养基获得了再生植株。大多数研究中采用的是固体培养基,而武习习(2018)在南瓜未受精胚珠培养中采用液体培养+固体培养的方式诱导胚状体发育并获得了再生植株。

TDZ(Thidiazuron,苯基噻二唑脲)是目前常用于未授粉子房和胚珠培养的生长调节剂,在外植体愈伤形成到体细胞胚胎发生的过程中起到关键的诱导作用(徐晓峰和黄学林,2003)。不少研究表明培养基中添加一定浓度的TDZ可以提高黄瓜胚状体的诱导率(Gémes-Juhász et al.,2002;陈小鹏等,2005;刁卫平等,2008a;王璐等,2008;王烨等,2015)。闵子扬等(2019)在南瓜的未授粉子房和胚珠培养中使用MS+0.04 mg·L⁻¹TDZ培养基,胚状体诱导率最高,且形成的正常胚状体有利于成苗。生长素(2,4-D、NAA、IAA等)也广泛用于瓜类作物未授粉子房和胚珠离体培养,使用的浓度在不同材料中有所不同(刘栓桃等,2008;孙守如等,2013;龚思等,2019)。AgNO₃作为乙烯拮抗剂已用于植物组织培养。在黄瓜子房培养中,AgNO₃对胚发生率和胚产量起到积极作用(刁卫平等,2008a;裴晓利,2011;Li et al.,2013;王烨等,2015)。唐桃霞(2015)在西葫芦未授粉子房培养的研究中发现AgNO₃不仅可以显著降低胚状体的玻璃化率,而且有利于缩短最早出胚天数。孙守如等(2013)研究发现,南瓜未受精胚珠培养时添加AgNO₃明显抑制出胚。韩丽华(2004)认为,甜瓜胚珠不宜在AgNO₃培养基中诱导时间过长,两周后转出有利于出苗。由此可见,在瓜类作物离体雌核发育诱导单倍体的研究中,广泛添加TDZ、生长素类调节剂和AgNO₃影响显著,但在不同作物中添加的浓度和处理的效果存在差异。胚在体外的发育是个复杂的过程,与多种植物生长调节剂作用有关,目前缺乏对离体胚发育内在机理的探讨,因此还未找到最适宜的植物生长调节剂组合来提高植株再生率。

2.4 子房发育阶段的影响

子房发育阶段的选择与子房内胚囊的发育时期相关,是影响未授粉子房培养成功的关键因素之一。在花药或花粉培养过程中花粉处于单核中、晚期时培养效果最佳,能够响应外界的刺激启动雄核发育。在瓜类作物未授粉子房和胚珠离体培养中,研究者同样关注了取样时期。Gémes-Juhász等(2002)的研究表明开花前6 h的黄瓜未授粉子房胚状体诱导率最高,此时胚囊还未发育成熟。已有的研究在取材时间上多采用开花前1 d的未授粉子房,并获得成功(Shalaby,2007;Diao et al.,2009;Koli & Murthy,2013;孙守如等,2013;Tantasawat et al.,2015;龚思等,2019)。用开花

当天的黄瓜、甜瓜和南瓜的子房进行培养, 获得单倍体和双单倍体 (Malik et al., 2011; Li et al., 2013; 闵子扬 等, 2016)。有研究认为开花前 1 d 的子房比开花当天的培养效果好 (陈小鹏 等, 2005)。周霞等 (2020) 通过石蜡切片观察到开花前 1 d、开花当天和开花后 1 d 的子房胚囊逐渐成熟。在瓜类作物离体雌核的培养中, 取样的时间范围多在开花前 2 d 到开花当天。不同发育阶段的子房中成熟胚囊的比例有差异, 而不同发育时期的胚囊可能对外界刺激的响应不同, 哪个发育阶段的胚囊更适宜诱导出苗还有待研究。目前缺乏对这一问题的探索, 对最适宜取样时期还没有达成明确的共识。

2.5 预冷和热激处理的影响

体外培养期间对供体进行某些物理处理 (例如预冷、热激和黑暗) 可能会对胚诱导产生显著影响。有研究表明, 4 °C 预处理 4 d 的西葫芦和甜瓜胚珠反应效果好, 胚形成率高 (Ficcadenti et al., 1999; Shalaby, 2007; Malik et al., 2011), 但也有研究认为这种处理方式会降低未受精胚珠的胚发生潜能 (Metwally et al., 1998)。Rakha 等 (2012) 报道了预冷处理对葫芦科 6 种杂种的雌核发育有负面影响。龚思等 (2019) 认为 4 °C 低温预处理并不能提高西瓜胚状体诱导效率。Malik 等 (2011) 认为 4 °C 预处理 8 d 的甜瓜胚珠不能发生雌核反应, 长时间的预冷处理对雌核反应有不利影响。

另外, 在胚诱导期间进行热激处理, 对于单倍体胚胎形成可能有益。有研究发现在黄瓜诱导培养期 32 °C 热激处理 2~4 d, 胚诱导率 (18.4%) 和植株再生率 (7.1%) 最高 (Gémes-Juhász et al., 2002); 35 °C 下热激培养 3 d, 提高了黄瓜胚的诱导率 (Diao et al., 2009; Moqbeli et al., 2013)。西葫芦子房培养过程中, 32 °C 培养 4 d 胚珠的反应率最佳 (28%) (Shalaby, 2007)。南瓜子房胚诱导前在 35 °C 下热处理 6 d, 可以显著增强胚胎的形成 (孙守如 等, 2013)。甜瓜子房在 30 °C 暗培养 2 d 时雌核启动最佳 (牛明明, 2012)。闵子扬等 (2016) 的研究表明, 35 °C 热激 5 d 可以使南瓜胚珠转绿并诱导胚状体。然而, 也有研究报道, 在 35 °C 热激 3 d 降低了黄瓜胚状结构形成的百分比 (Tantasawat et al., 2015)。因此, 大部分研究认为热激 (32~35 °C) 处理对瓜类作物的子房和胚珠培养起到积极作用, 在接种到培养基后进行, 热激 2~5 d。而预冷 (4 °C) 处理在不同物种中的效果存在差异, 长时间预冷易对胚诱导造成负面影响, 多在培养前进行, 时间为 2~8 d。目前在瓜类作物离体雌核诱导单倍体的研究中, 温度处理是常用的手段, 但对培养造成的影响只是从统计数据上有所显示, 尚未从分子手段做机理机制上的探究, 因此最佳处理温度和时间还未达到共识。

2.6 子房切片方式的影响

未授粉子房离体培养的切割方式主要分横切和纵切两种, 另外也可以将胚珠剥离单独培养, 横切时厚度多在 1~2 mm, 有研究表明两种切割方式下胚诱导效果存在差异。在黄瓜中, 有研究认为纵切的效果优于横切 (赵隽 等, 2003; 李建欣 等, 2012), 提出可以先纵切, 长出排列紧密的胚状体后再横切的培养方法。陈小鹏等 (2005) 研究发现, 子房片横切或纵切各有缺点, 横切时下部胚状体造成悬空, 影响营养物质的吸收, 纵切时暴露的胚状体太多, 营养竞争大, 不利于胚状体的继续发育。王烨等 (2015) 在黄瓜子房培养中, 先不对子房进行切割, 完整预培养 7 d 后再将子房中胚珠剥离放在诱导培养基上培养。赵晓菲 (2014) 的研究表明, 西葫芦未受精胚珠 4 种切割方式的诱导率不同: 横切 > 纵切 > 切喙 > 完整胚珠。横切、纵切或其他切片方式产生的影响可能有两方面原因, 一是切面上胚珠暴露出来的面积以及胚珠是否被切开, 因为胚囊的发育与胚珠的状态密切相关; 二是切面是否接触培养基以及接触面积, 这关系到胚囊营养的获得。总的来看, 切片方式对胚诱导效果存在的影响可能是显著的, 但对植株再生率的影响还未见报道。

2.7 其他因素的影响

在瓜类作物未授粉子房和胚珠离体培养中, 也有研究关注到栽培季节、暗培养、消毒过程等因素。魏爱民等(2007)研究了供体植株栽培方式和栽培季节对黄瓜未授粉子房离体培养的影响, 认为种植在塑料大棚中的供试材料单倍体胚胎发生率和成苗率都明显高于露地材料, 并且温度相对较高的季节单倍体胚胎发生率和成苗率较高。陈学军等(2000)、谢冰(2005)、赵晓菲(2014)曾报道不同播期的西葫芦雌核发育诱导率存在极显著差异, 以秋播的诱导率最高, 夏季次之, 春季栽培的诱导率最低, 认为可能与日照长度有关, 西葫芦是短日照植物, 秋播时短日照条件刺激了雌核发育相关基因的表达。王璐等(2008)的研究表明, 预培养选择 25 ℃ 黑暗处理 1 d, 可启动黄瓜未授粉子房雌核发育且反应率最高。李禹琪(2017)认为当南瓜子房片厚度为 1 mm 时, 用 7% 次氯酸钠溶液消毒 6 min, 其胚珠生长效果最佳。闵子扬等(2016)发现, 在南瓜未授粉子房培养中, 切片后消毒可以避免胎座组织生长对胚珠的干扰, 有效提高胚状体的诱导率。因此, 大量研究表明, 多种因素都对瓜类作物离体雌核发育产生不同程度的影响, 但由于缺乏对诱导机制的理论研究, 目前还处于探索阶段, 缺乏突破性的进展。

3 再生植株倍性鉴定与纯合性检验

3.1 染色体计数鉴定

在未授粉子房和胚珠离体培养过程中, 诱导产生的愈伤组织、胚状体或植株可能来源于单倍性的胚囊细胞, 也有可能来源于二倍性的珠被、胎座组织等体细胞, 而只有起源于胚囊的细胞才能发育为单倍体或 DH 植株。因此, 需要鉴定再生植株的倍性和纯合性以确定其来源。

染色体计数是目前倍性鉴定最直观准确的方法, 但在实际应用中也有其局限性。在不同物种中, 染色体数量和大小不同, 计数法的难度也不同。在瓜类作物中, 黄瓜、西瓜、甜瓜、西葫芦和南瓜(中国南瓜)都是二倍体, 但染色体数不同, 分别为 14、22、24、40 和 44 条。其中黄瓜、西瓜和甜瓜的染色体条数少, 利于染色体的计数, 不少研究通过染色体计数鉴定了离体雌核培养获得再生植株的倍性(Gémes-Juhász et al., 2002; Diao et al., 2009; Malik et al., 2011; 龚思 等, 2019; 周霞 等, 2020)。而西葫芦和南瓜的染色体数多, 计数难度大, 有少数研究也采用了该方法鉴定倍性(Shalaby, 2007; 闵子扬 等, 2016)。

染色体制片时通常以根尖为材料, 采用压片法和去壁低渗法进行染色体标本制备, 通过扫描电镜观察。该方法能够准确直观地对植株倍性作出鉴定, 但是操作难度较大, 需要有经验的人员和完备的试验设备。其次, 计数法对根尖的要求较高, 需要有发育健壮的根, 配比适当的酶解液等方面的配合才能制备出清晰可见的染色体切片。而离体培养中得到的植株通常根系弱小, 用于制片时难以达到准确计数的效果, 因此应在扩繁后再驯化取根, 避免造成材料的浪费。另外, 计数法也不适宜于鉴定大批量再生植株。

3.2 流式细胞仪鉴定

流式细胞仪检测 DNA 含量的原理是利用特殊的荧光染料(PI、DAPI、AO 等)与细胞内 DNA 碱基结合, 染色细胞进入流式细胞仪的流动室后经激光照射发出荧光, 通过滤片收集每个细胞相应的荧光强度, 根据荧光强度推知细胞的 DNA 含量及其倍性水平(汪艳 等, 2015)。流式细胞仪鉴定法已应用于瓜类作物的倍性水平分析(韩毅科 等, 2006; Karimzadeh et al., 2010; 施先锋 等,

2010; 闵子扬 等, 2019)。该方法特点是效率高, 操作技术易掌握, 适合于较多样品的倍性检测分析(魏爱民 等, 2001), 并且取样量少(50 mg 左右), 不影响植株的正常生长, 组培苗即可鉴定。缺点是专门的仪器和试剂价格昂贵, 检测所需费用高。

3.3 气孔保卫细胞叶绿体计数鉴定

在西瓜和甜瓜上有研究表明, 叶片气孔大小及保卫细胞内叶绿体数与植株倍性有很高的相关性, 证明这是一种有效的判断植株倍性的依据之一(马国斌 等, 1999; Sari et al., 1999)。在黄瓜中, 保卫细胞叶绿体数随植株倍性成正比增加, 单倍体、双单倍体和三倍体的保卫细胞叶绿体数存在显著差异(杜胜利, 2002)。西葫芦中, 唐桃霞(2015)采用气孔保卫细胞叶绿体计数和保卫细胞直径对植株进行倍性鉴定, 随倍性的增高保卫细胞叶绿体数依次增加, 保卫细胞直径也依次增大, 准确性达 87.5%, 认为该方法可以作为西葫芦胚囊再生植株倍性鉴定的有效方法。这一方法的优点是所需的样叶少, 在组培期间即可选取少量叶片进行显微观察, 不需要专门的设备, 操作简单成本低, 但撕取幼嫩叶片的表皮较为困难。

3.4 再生植株形态学鉴定

细胞核和细胞的体积与染色体的同源倍数呈正相关, 染色体的同源倍数越多, 叶片大小、厚度、气孔和花粉粒大小、花和种子大小等也随之递增。杜胜利等(1999)研究了黄瓜辐射花粉授粉再生植株的形态特征, 发现单倍体植株较二倍体植株具有叶片小、长势弱、花冠深裂等特征。Zheng 等(2019)的研究表明, 四倍体黄瓜的植株叶片、花、气孔直径较大, 花粉粒和保卫细胞中的叶绿体数更多, 但气孔密度和正常花粉率比二倍体降低, 果实更小。在西瓜、甜瓜、西葫芦和南瓜中也有研究利用形态学观察鉴定再生植株倍性(Rakha et al., 2012; 闵子扬 等, 2016)。形态学鉴定直观, 成本低, 缺点是准确性有待确定, 并且需要再生植株移栽后生长一段时间才能鉴定, 用时较长。

3.5 纯合性检验

目前诱导雌核发育技术还不能分离单个卵细胞进行培养, 只能进行子房或胚珠培养, 由此获得的植株若是二倍体则可能是来自胎座组织或其他二倍性组织的杂合体。由于 DH 和普通二倍体含有相同数量的染色体, 所以用流式细胞仪和细胞遗传学观察来区分两者是非常困难的(刁卫平等, 2008a)。不少研究利用再生植株的自交后代表型是否整齐一致, 对其纯合性进行推断(谢冰, 2005; 刘栓桃 等, 2008; Suprunova & Shmykova, 2008; Plapung et al., 2014a, 2014b; 刘立功 等, 2015; 荣文娟, 2015)。这样的鉴定方法所用时间长, 而且对于自交不育的植株难以进行鉴定, 同时环境、栽培条件等因素对表型的影响很大, 因此效率低且存在不确定性(Chen et al., 2011)。利用分子标记可以鉴定出自然加倍的双单倍体植株, 为育种提供一种快速、实用的方法。简单重复序列(Simple Sequence Repeat, SSR)即通常所说的微卫星 DNA, 由重复核苷酸单元(1~5 个碱基)组成, 具有高度多态性、共显性遗传, 是用来鉴定纯合体的理想标记。SSR 已经成功应用于黄瓜(Claveria et al., 2005; 刁卫平等, 2008b; Diao et al., 2009; Sorntip et al., 2017; 周霞 等, 2020)、甜瓜(Malik et al., 2011)、西葫芦(苏敏, 2011)、南瓜(Košmrlj et al., 2013)的纯合性鉴定, 但目前的研究通常只用较少的几个标记鉴定。

4 单倍体加倍技术研究

葫芦科作物自然加倍的现象很少 (Dryanovska, 1985)。黄瓜在温室栽培环境中染色体自然加倍的频率为 2.2% (Ramírez-Madera et al., 2017)。由于单倍体植株弱小且没有后代, 因此人工染色体加倍是必需的过程。目前, 单倍体染色体加倍依然较为困难, 加倍概率低, 并且在加倍过程中会造成材料损失。最常用的技术是将体外生长的植物浸泡在秋水仙碱中以获得加倍, 秋水仙素对细胞的主要作用是使核分裂的中期延长或停止, 纺锤丝的形成和发展受到阻碍或破坏, 使分裂了的染色体停留在赤道板上, 不向两极移动, 新的核膜不形成, 因而分裂了的染色体停留在 1 个细胞核中, 致使染色体加倍。西瓜 (Sari & Abak, 1996; 施先锋 等, 2010) 和黄瓜 (Caglar & Abak, 1999a, 1999b) 在秋水仙碱处理后已经获得不同程度的成功。研究表明, 用 0.006% 氟乐灵处理观赏南瓜单倍体植株, 加倍效果好 (孙守如, 2011)。Claveria 等 (2005) 用 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙碱处理黄瓜单倍体植株 48 h, 有 30% 成为完整的二倍体, 55% 嵌合植株和 14% 未加倍单倍体, 其中茎节的二倍体转化率 (2%) 远低于芽尖 (22%)。秋水仙碱、胺磺灵和氟乐灵是用于单倍体植物人工基因组复制的最常用抗有丝分裂剂 (Dhooghe et al., 2011)。Ebrahimzadeh 等 (2018) 在黄瓜中建立了有效的染色体加倍方案, 使用茎节和茎尖为外植体, 比较了秋水仙碱, 胺磺灵和氟乐灵的加倍效果, 结果表明茎节在 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胺磺灵中处理 18 h 加倍率最高 (92.31%)。后续研究依然要提高染色体加倍效率, 同时应解决目前存在的植物毒性效应、花形态异常、存活率低、混倍体植株、未加倍成功的单倍体植株等问题。

5 单倍体的应用

目前关于瓜类单倍体诱导的研究主要集中在培养方法的效率方面, 而关于获得植株的后续研究和应用方面的报道很少。在育种和遗传转化方面, 利用黄瓜未授粉子房培养育成了 20 多个表现优异的品系 (杜胜利, 2002), 包括适合保护地栽培的黄瓜品种 ‘津美 3 号’ (韩毅科 等, 2010) 等, 建立了农杆菌介导的黄瓜未授粉子房培养遗传转化体系, 但该体系转化处理后子房再生植株率低, 因此影响转基因植株的获得 (魏爱民 等, 2014)。单倍体对于抗病育种和分子遗传研究具有重要意义。Lofti 等 (2003) 利用对多种病毒具有抗性的杂交甜瓜为供体, 胚拯救后获得 DH 植株用于抗病育种的研究。Plapung 等 (2014a) 对筛选出的 5 个耐黄瓜花叶病毒 (CMV) 的黄瓜品种进行胚珠培养, 获得的双单倍体经测定对 CMV 有很强的抗性。Gonzalo 等 (2005) 和裴晓利 (2011) 利用 DH 群体分别构建了甜瓜和黄瓜的遗传图谱。DH 技术是反向育种中的关键一环, 通过消除植物的雄性或雌性配子减数分裂产生 DH, 这些 DH 来源于非重组亲本染色体的组合, 因此可以选择互补的亲本, 用于永久地重组杂合子, 并产生特定的 F_1 杂种 (Dirks et al., 2009), 但该方法的应用有许多限制性条件, 因此还有待进一步研究。

近年来单倍体蛋白和基因的研究取得了突破性进展。研究发现, 着丝粒特异组蛋白 CENH3 的任何改变都可以削弱着丝粒的功能, 从而产生单倍体, 但在双子叶植物拟南芥中末端交换诱导系表现出严重的不育 (Ravi & Chan, 2010)。在玉米 (Kelliher et al., 2016)、番茄和水稻 (Kalinowska et al., 2019) 中通过对 CENH3 的 N 末端进行编辑成功实现了单倍体诱导。原因可能是着丝粒结构复杂, 拟南芥的 CENH3 与其他植物相比存在功能的不同 (Wang et al., 2019)。此外, 在玉米中定位到的与单倍体诱导相关的基因 *MTL/ZmPLA1/NLD* (Gilles et al., 2017; Kelliher et al., 2017; Liu et al., 2017), 并通过 CRISPR/CAS9 技术在单子叶作物水稻中得到应用 (Yao et al., 2018)。但在双子叶植

物中, 该基因不在花粉中特异表达 (La Camera et al., 2005), 这给在双子叶植物中的应用带来了不确定性。最新研究表明, *ZmDMP* 的同源基因在拟南芥中也具有单倍体诱导功能 (Zhong et al., 2020), 这为建立双子叶作物单倍体育种技术体系奠定了基础。

6 存在问题与展望

DH 技术对于作物改良和遗传分析具有广阔的应用前景, 但在应用中仍然存在巨大的挑战。目前研究中存在的问题主要有 4 个: 一是再生植株率低, 在瓜类作物未受精子房、胚珠获得再生植株的研究中, 常用雌核启动率、出胚率、愈伤率等来表现各因素的影响, 很少有再生植株率的报道, 在目前已有的报道中, 黄瓜培养后再生频率较高, 可达到 20% (杜胜利, 2002), 西葫芦中也能获得较多的再生植株 (谢冰等, 2006), 但其他多数研究中只是获得几株。二是培养体系不稳定, 虽然不少研究尝试优化培养体系, 但依然没有找到获得培养成功的“密钥”, 基因型的特异性更加降低了试验的可重复性和该技术的有效应用。三是获得的双单倍体存在育性差、自交留种困难的问题, 使得植株难以保存和利用。四是单倍体染色体加倍的效率不够高, 并且加倍过程往往对植株造成严重毒害导致植株死亡。

近年来, 单倍体诱导相关的基因和蛋白的发现, 推动了单倍体研究的发展, 但在双子叶植物包括瓜类作物中的应用还需要更多探索。在单倍体加倍上, 若能开发一种单倍体诱导剂, 使单倍体具有基因组自发加倍的能力, 则能避免使用危险化学品, 因此也需加强对自发性单倍体基因组加倍的遗传学和加倍机制的研究。在离体雌核发育诱导单倍体的研究中, 从雌核启动到胚发生再到植株形成, 这些过程中涉及的调控机制、基因功能等方面的研究, 都将有助于植物单倍体和 DH 的高效生产。日后应从机理上进行深入研究, 加深对单倍体诱导机制的认识, 为生产实践打下坚实基础。

References

- Ao Guang-ming, Zhao Shi-xu, Li Guang-hua. 1982. Haploid plants were cultivated from unfertilized corn ovary. *Acta Genetica Sinica*, 9 (4): 281 - 283. (in Chinese)
- 敖光明, 赵世绪, 李广华. 1982. 从未受精的玉米子房培养出单倍体植株. *遗传学报*, 9 (4): 281 - 283.
- Caglar G, Abak K. 1999a. Obtention of *in vitro* haploid plants from in situ induced haploid embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Turk J Agric For*, 23 (3): 283 - 290.
- Caglar G, Abak K. 1999b. Progress in the production of haploid embryos plants and doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by gamma irradiated pollen in Turkey. *Acta Hort*, 492: 317 - 322.
- Cao Ming-qing, Li Yan, Liu Fan. 1993. Effects of genotype and donor plant growth environment on embryogenesis of free microspores in Chinese cabbage. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 8 (4): 1 - 6. (in Chinese)
- 曹鸣庆, 李岩, 刘凡. 1993. 基因型和供体植株生长环境对大白菜游离小孢子胚胎发生的影响. *华北农学报*, 8 (4): 1 - 6.
- Chambonnet D, Dumas de Vaulx R. 1985. Obtention of embryos and plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo*. *Cucurbit genetics. Coop Rep*, 8: 66.
- Chen J F, Cui L, Malik A A, Mbira K G. 2011. *In vitro* haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104 (3): 311 - 319.
- Chen Xiao-peng, Liu Shuan-tao, Sun Xiao-lei, Zhao Zhi-zhong, Wang Xiu-feng. 2005. Primary study on embryoids induced from unpollinated ovaries of cucumber. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 14 (2): 148 - 151. (in Chinese)
- 陈小鹏, 刘栓桃, 孙小镭, 赵智中, 王秀峰. 2005. 黄瓜未授粉子房的胚状体诱导研究初报. *西北农业学报*, 14 (2): 148 - 151.

- Chen Xue-jun, Xing Guo-ming, Chen Zhu-jun. 2000. *In vitro* induction of plants from unpollinated ovules in summer squash. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 12 (3): 165 - 167. (in Chinese)
- 陈学军, 邢国明, 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 (3): 165 - 167.
- Cheng Hui. 2013. Research on the impact factors of culture of *in vitro* female nucleus and plant regeneration in squash[M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 程 慧. 2013. 西葫芦离体雌核培养及植株再生影响因子研究[硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Chopra R N. 1958. *In vitro* culture of ovaries of *Althaea rosea* Cav//Maheshwari P. Proc Seminar Mod Dev Plant Physiol: 87 - 89.
- Claveria E, Garcia-Mas J, Dolcet-Sanjuan R. 2005. Optimization of cucumber doubled haploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. J Am Soc Hort Sci, 130 (4): 555 - 560.
- Dhooghe E, Van Laere K, Eeckhaut T, Leus L, van Huylenbroeck J. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell Tiss Organ Cult, 104: 329 - 341.
- Deng Ying, Tang Bing, Wu Kang-yun, Lu Song, Wen Lin-hong, Zhang Wan-ping. 2018. *In vitro* culture of unfertilized ovary of pumpkin and to form regenerated plantlets. Acta Bot Boreali-occidentalis Sin, 38 (2): 381 - 385. (in Chinese)
- 邓 英, 唐 兵, 吴康云, 卢 松, 文林宏, 张万萍. 2018. 南瓜未授粉子房培养形成再生植株的研究. 西北植物学报, 38 (2): 381 - 385.
- Diao W P, Jia Y Y, Song H. 2009. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenetants using SSR markers. Scientia Horticulturae, 119 (3): 246 - 251.
- Diao Wei-ping, Chen Jin-feng, Lei Chun, Song Hui, Zhang Xiao-qing. 2008a. Factors affecting embryo formation in unpollinated ovary culture of cucumber. Journal of Nanjing Agricultural University, 31 (1): 137 - 140. (in Chinese)
- 刁卫平, 陈劲枫, 雷 春, 宋 慧, 张晓青. 2008a. 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 (1): 137 - 140.
- Diao Wei-ping, Jia Yuan-yuan, Jiang Biao, Bao Sheng-you, Lou Qun-feng, Chen Jin-feng. 2008b. Induction of autotetraploid cucumber by unpollinated ovary culture and their characterization. Acta Horticulturae Sinica, 35 (12): 1781 - 1786. (in Chinese)
- 刁卫平, 贾媛媛, 江 彪, 鲍生有, 娄群峰, 陈劲枫. 2008b. 黄瓜未授粉子房培养获得同源四倍体. 园艺学报, 35 (12): 1781 - 1786.
- Dirks R, Van Dun K, de Snoo C B. 2009. Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. Plant Biotechnol J, 7: 837 - 845.
- Dryanovska O A. 1985. Induced callus *in vitro* from ovaries and anthers of species from the Cucurbitaceae family. C R Acad Bulg Sci, 38: 1243 - 1244.
- Du Sheng-li. 2002. Identification and study of the female nuclear development and chromosome ploidy of cucumber[Ph. D. Dissertation]. Tianjin: Nankai University. (in Chinese)
- 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.
- Du Sheng-li, Wei Hui-jun, Wei Ai-min, Ma De-hua, Huo Zhen-rong. 1999. Haploid plantlet regeneration of cucumber by pollination with irradiated pollens. Scientia Agricultura Sinica, 32 (2): 109. (in Chinese)
- 杜胜利, 魏惠军, 魏爱民, 马德华, 霍振荣. 1999. 通过辐射花粉授粉诱导获得黄瓜单倍体植株. 中国农业科学, 32 (2): 109.
- Dumas de Vaulx R, Chambonnet D. 1986. Obtention of embryos and plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules of *Cucubita pepo*. Genetic Manipulation in Plant Breed, 295 - 297.
- Dunwell J M. 1976. A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in cultured anthers of *Nicotiana tabacum*. Environmental and Experimental Botany, 16 (2-3): 109 - 118.
- Ebrahimzadeh H, Soltanloo H, Shariatpanahi M E, Eskandari A, Ramezani-pour S S. 2018. Improved chromosome doubling of parthenogenetic haploid plants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) using colchicine, trifluralin, and oryzalin. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 4: 1 - 11.
- Ficcadenti N, Sestili S, Annibali S, Marco M D, Schiavi M. 1999. *In vitro* gynogenesis to induce haploid plants in melon (*Cucumis melo* L.) . J Genet Breed, 53 (3): 255 - 257.

- Gémes-Juhász A, Balogh P, Ferenczy A, Kristóf Z. 2002. Effect of optimal stage of female gametophyte and heart treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Reports*, 21 (2): 105 - 111.
- Ge Zhi-dong. 2009. Study on *in vitro* culture of unpollinated ovary of summer squash (*Cucurbita pepo* L.) [M. D. Dissertation]. Urumqi: Xinjing Agricultural University. (in Chinese)
- 葛志东. 2009. 西葫芦未授粉子房离体培养研究[硕士论文]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学.
- Gilles L M, Khaled A, Khaled A, Laffaire, J B, Chaignon S, Gendrot G, Laplaige J, Bergès H, Beydon G, Bayle V, Barret P, Comadran J, Martinant J P, Rogowsky P M, Widiez T. 2017. Loss of pollen-specific phospholipase *NOT LIKE DAD* triggers gynogenesis in maize. *The EMBO Journal*, 36 (6): 707 - 717.
- Gong Si, Liang Shao-hua, Yan Jing-yi, Zou Tian, Yang Jie, Chu Xiao, Chen Ze-nan, Sun Xiao-wu. 2019. Study on the technology of unfertilized ovary culture in watermelon. *China Cucurbits and Vegetables*, 32 (5): 17 - 21. (in Chinese)
- 龚思, 梁少华, 严静怡, 邹甜, 杨洁, 楚箫, 陈泽南, 孙小武. 2019. 西瓜未受精子房离体培养技术. *中国瓜菜*, 32 (5): 17 - 21.
- Gonzalo M J, Oliver M, Garcia-Mas J, Monfort A. 2005. Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet*, 5 (110): 802 - 811.
- Guha S, Johri B M. 1966. *In vitro* development of ovary and ovule of *Allium cepa* L. *Phytomorphology*, 16: 353 - 364.
- Guo Yong-qi. 2004. Study on the way of inducing haploid through gynogenesis of *Cucurbita pepo* [M. D. Dissertation]. Beijing: Capital Normal University. (in Chinese)
- 郭永强. 2004. 西葫芦离体雌核发育途径诱导单倍体的研究[硕士论文]. 北京: 首都师范大学.
- Gurel S, Gurel E, Kaya Z. 2000. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Rep*, 19 (12): 1155 - 1159.
- Han Li-hua. 2004. *In vitro* gynogenesis in melon from unfertilized ovules [M. D. Dissertation]. Baoding: Hebei Agricultural University. (in Chinese)
- 韩丽华. 2004. 厚皮甜瓜未受精胚珠离体培养技术[硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Han Yi-ke, Du Sheng-li, Wei Ai-min, Zhang Li, Liu Nan, Zhang Gui-hua, Zhao Guo-yun. 2010. A new cucumber cultivar 'Jinmei 3' bred by unfertilized ovary culture. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (3): 509 - 510. (in Chinese)
- 韩毅科, 杜胜利, 魏爱民, 张历, 刘楠, 张桂华, 赵国云. 2010. 利用未受精子房培养技术育成黄瓜新品种‘津美3号’. *园艺学报*, 37 (3): 509 - 510.
- Han Yi-ke, Du Sheng-li, Zhang Gui-hua, Wei Ai-min. 2006. Anti-microtubule herbicides oryzalin for induction of tetraploid cucumber. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 21 (4): 27 - 30. (in Chinese)
- 韩毅科, 杜胜利, 张桂华, 魏爱民. 2006. 利用抗微管除草剂胺磺灵诱导黄瓜四倍体. *华北农学报*, 21 (4): 27 - 30.
- Hoseman D, Bossoutrot D. 1983. Induction of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated beet (*Beta vulgaris* L.). *Z Pflanzenzucht*, 91: 74 - 77.
- Kalinowska K, Chamas S, Unkel K, Demidov D, Lermontova I, Dresselhaus T. 2019. State-of-the-art and novel developments of *in vivo* haploid technologies. *Theor Appl Genet*, 132 (3): 593 - 605.
- Karimzadeh G, Mousavi S H, Jafarkhani-Kermani M. 2010. Karyological and Nuclear DNA Variation in Iranian endemic muskmelon (*Cucumis melo* var. *inodorus*). *Cytologia*, 75 (4): 451 - 461.
- Kelliher T, Starr D, Wang W, McCuiston J, Zhong H, Nuccio M L. 2016. Maternal haploids are preferentially induced by CENH3-tailswap transgenic complementation in maize. *Front Plant Sci*, 7: 414.
- Koli S P, Murthy H N. 2013. Haploid plant regeneration from unpollinated ovules of *Cucumis melo* L. var. *conomon* cv. Mudicode. *Br Biotechnol J*, 3 (4): 605 - 613.
- Košmrlj K, Murovec J, Bohanec B. 2013. Haploid Induction in hullless seed pumpkin through parthenogenesis induced by X-ray-irradiated pollen. *J Am Soc Hort Sci*, 138 (4): 310 - 316.

- Kurtar E S, Balkaya A, Ozbakir Ozer M. 2018. Production of callus mediated gynogenic haploids in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.). Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 54 (1): 9 - 16.
- Kwack S N, Fujieda K. 1988. Somatic embryogenesis in cultured unfertilized ovules of *Cucurbita moschata*. J Jpn Soc Hort Sci, 57 (1): 34 - 42.
- La Camera S, Geoffroy P, Samaha H, Ndiaye A. 2005. A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in *Arabidopsis*. Plant J, 44 (5): 810 - 825.
- Lei Chun, Chen Jin-feng. 2006. Research progress on the creation of haploid materials of Cucurbitaceous vegetable crops. China Vegetables, (1): 33 - 36. (in Chinese)
- 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.
- Li J W, Si S W, Cheng J Y, Li J X, Liu J Q. 2013. Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus*. Biologia Plantarum, 57 (1): 164 - 168.
- Li Jian-xin, Ge Gui-min, Pang Shu-min, Fang Guan-na, Wu Xiao-bo, Zhou Hai-xia. 2012. Study on embryoid induction and plant regeneration of unpollinated ovary of three cucumber cultivars. Northern Horticulture, (23): 131 - 134. (in Chinese)
- 李建欣, 葛桂民, 庞淑敏, 方贯娜, 吴小波, 周海霞. 2012. 三个基因型黄瓜品种未授粉子房胚状体诱导及植株再生研究. 北方园艺, (23): 131 - 134.
- Li Ling. 2014. Study on culture *in vitro* of unfertilized ovule and un-pollinated ovary in watermelon [M. D. Dissertation]. Changsha: Hunan Agricultural University. (in Chinese)
- 李 玲. 2014. 西瓜未受精胚珠和未授粉子房离体培养的研究 [硕士论文]. 长沙: 湖南农业大学.
- Li Wei. 2012. Study on the optimization of embryoids culture condition and plantlet formation in summer squash *in vitro* ovary culture techniques [M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 李 伟. 2012. 西葫芦未受精子房离体培养成胚条件优化与成苗技术研究 [硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Li Xun, Guan Chun-yun. 1994. Microspore culture and double haploid breeding of rapeseed. Crop Research, 8 (3): 1 - 3. (in Chinese)
- 李 梅, 官春云. 1994. 油菜的小孢子培养和双单倍体育种. 作物研究, 8 (3): 1 - 3.
- Li Yan-ping. 2003. Study on anther culture and flower breeding of rice. Tianjin Agricultural Sciences, 9 (4): 36 - 39. (in Chinese)
- 李艳萍. 2003. 水稻花药培养与花培育种研究. 天津农业科学, 9 (4): 36 - 39.
- Li Ying-ying. 2017. Study on *in vitro* culture of un-pollinated ovary in watermelon (*Citrullus lanatus*) [M. D. Dissertation]. Zhengzhou: Henan Agricultural University. (in Chinese)
- 李迎迎. 2017. 西瓜未授粉子房离体培养技术的研究 [硕士论文]. 郑州: 河南农业大学.
- Li Yu-qi. 2017. Researching on the influencing factors of pumpkin unfertilized ovule culture *in vitro* [M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 李禹琪. 2017. 南瓜未受精胚珠离体培养影响因子研究 [硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Liu C X, Li X, Meng D X, Zhong Y, Chen C, Dong X, Xu X W, Chen B J, Li W, Li L, Tan X L, Zhao H M, Song W B, Luo H S, Zhang Q H, Lai J S, Jin W W, Yan J B, Chen S J. 2017. A 4-bp insertion at ZmPLA1 encoding a putative phospholipase generates haploid induction in maize. Mol Plant, 10: 520 - 522.
- Liu Li-gong, Wang Jing, Zhao Hong, Yang Hong-hong, Zhang Feng. 2015. Studies on the induction of embryos and regenerated plants in cucumber unpollinated ovary. China Vegetables, (6): 48 - 53. (in Chinese)
- 刘立功, 王 晶, 赵 泓, 杨红红, 张 峰. 2015. 黄瓜未授粉子房诱导出胚和再生植株的研究. 中国蔬菜, (6): 48 - 53.
- Liu Shuan-tao, Zhao Zhi-zhong, Sun Xiao-lei, Lu Jin-dong. 2008. Critical factors influence *in vitro* plantlet production of unfertilized ovule culture in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 23 (2): 96 - 100. (in Chinese)
- 刘栓桃, 赵智中, 孙小镭, 卢金东. 2008. 西葫芦未受精胚珠离体诱导植株再生的关键因素. 华北农学报, 23 (2): 96 - 100.
- Lofti M, Alan A R, Henning M J, Jahn M M, Earle E D. 2003. Production of haploid and double haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for

- use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Rep*, 21 (11): 1121 - 1128.
- Luthar Z, Bohanec B. 1999. Induction of direct somatic organogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two-step flower or ovary culture. *Plant Cell Rep*, 18 (10): 797 - 802.
- Ma Guo-bin, Wang Ming, Zheng Xue-qin. 1999. Generating tetraploid plants from tissue culture of melon. *Acta Horticulturae Sinica*, 26 (2): 128 - 130. (in Chinese)
- 马国斌, 王 鸣, 郑学勤. 1999. 甜瓜组织培养再生植株中的四倍体变异. *园艺学报*, 26 (2): 128 - 130.
- Malik A A, Cui L, Zhang S X, Chen J F. 2011. Efficiency of SSR markers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture. *Horticultural Science*, 38 (1): 27 - 34.
- Metwally E I, Moustafa S A, El-Sawy B I, Haroun S A, Shalaby T A. 1998. Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 52 (3): 117 - 121.
- Min Zi-yang, Li Han, Zou Tian, Tong Long, Cheng Juan, Sun Xiao-wu. 2016. *In vitro* culture and plant regeneration of pumpkin unpollinated ovary. *Chinese Bulletin of Botany*, 51 (1): 74 - 80. (in Chinese)
- 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 (1): 74 - 80.
- Min Zi-yang, Zou Tian, Ruan Wan-hui, Sun Xiao-wu. 2019. Haploid plants regeneration induced by watermelon gynogenesis *in vitro*. *Molecular Plant Breeding*, 17 (13): 4404 - 4409. (in Chinese)
- 闵子扬, 邹 甜, 阮万辉, 孙小武. 2019. 西瓜离体雌核发育诱导单倍体植株再生. *分子植物育种*, 17 (13): 4404 - 4409.
- Minesh Patel, Norman L D, Donald R M, James O B. 2004. Optimization of culture conditions for improved plant regeneration efficiency from wheat microspore culture. *Euphytica*, 140 (3): 197 - 204.
- Moqbeli E, Peyvast G, Hamidoghli Y, Olfati J A. 2013. *In vitro* cucumber haploid line generation in several new cultivars. *Aspac J Mol Biol Biotechnol*, 21 (1): 18 - 25.
- Muren R. 1989. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. *HortScience*, 24 (5): 833 - 834.
- Niu Ming-ming. 2012. Study of Gynogenesis *in vitro* to induce haploid plants in melon [M. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)
- 牛明明. 2012. 甜瓜离体雌核发育诱导单倍体研究 [硕士论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- Pei Xiao-li. 2011. *In vitro* gynogenesis to induce haploid plants in cucumber and construction of genetic map with SSR markers in DH population [M. D. Dissertation]. Lanzhou: Gansu Agricultural University. (in Chinese)
- 裴晓利. 2011. 黄瓜离体雌核发育诱导单倍体及其 DH 群体 SSR 标记图谱构建 [硕士论文]. 兰州: 甘肃农业大学.
- Plapung P, Khamsukdee S, Potapohn N, Smitamana P. 2014a. Screening for cucumber mosaic resistant lines from the ovule culture derived double haploid cucumbers. *Am J Agric Biol Sci*, 9 (3): 261 - 269.
- Plapung P, Khamsukdee S, Smitamana P. 2014b. Development of cucumber lines resistant to cucumber mosaic virus by ovule culture. *International Journal of Agricultural Technology*, 10 (3): 733 - 741.
- Raina S K, Irfan S T. 1998. High-frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspores of indica rice. *Plant Cell Reports*, 17 (12): 957 - 962.
- Rakha M T, Metwally E I, Moustafa S A. 2012. Evaluation of regenerated strains from six cucurbita interspecific hybrids obtained through anther and ovule *in vitro* cultures. *Aust J Crop Sci*, 6 (1): 23 - 30.
- Ramírez-Madera A O, Miller N D, Spalding E P. 2017. Spontaneous polyploidization in cucumber. *Theoretical & Applied Genetics*, 130 (7): 1481 - 1490.
- Rangan T C. 1982. Ovary, ovule and nucellus culture. *Experimental embryology of vascular plants*. Springer Berlin Heidelberg, 105 - 129.
- Ravi M, Chan S W. 2010. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature*, 464 (7288): 615 - 618.
- Rong Wen-juan. 2015. Study on *in vitro* culture unfertilized ovule in watermelon (*Citrullus lanatus*) [M. D. Dissertation]. Zhengzhou: Zhengzhou

- Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)
- 荣文娟. 2015. 西瓜未受精胚珠离体培养研究[硕士论文]. 郑州: 中国农业科学院郑州果树研究所.
- Šachar R C, Kapoor M. 1959. *In vitro* culture of ovules of *Zephyranthes*. Phytomorphology, 9: 147 - 156.
- San Noeum L H. 1976. Haploides d'*Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d'ovaires non fécondes. Ann Amelio Plant, 26: 751 - 754.
- Sari N, Abak K, Pitrat M. 1999. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai. Sci Hort, 82 (3): 265 - 277.
- Sari N, Abak K. 1996. Effect of colchicine treatment with different doses and periods on *in vitro* chromosome duplication in haploid watermelon. Turk J Agric For, 20 (6): 555 - 559.
- Savin F, Decombe V, Le Couviour M, Hallard J. 1988. The X-ray detection of haploid embryos arisen in muskmelon (*Cucumis melo* L.) seeds, and resulting from a parthenogenetic development induced by irradiated pollen. Cucurbit Genet Coop Rpt, 11: 39 - 42.
- Shalaby T A. 2007. Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.) . Sci Hort, 115 (1): 1 - 6.
- Shen Shu-xing, Zhao Qian-cheng, Liu Shi-xiong, Zhang Cheng-he, Li Zhen-qiu. 1999. Obtaining and ploidy identification of microspore plants of tetraploid Chinese cabbage. Acta Horticulturae Sinica, 26 (4): 232 - 237. (in Chinese)
- 申书兴, 赵前程, 刘世雄, 张成合, 李振秋. 1999. 四倍体大白菜小孢子植株的获得与倍性鉴定. 园艺学报, 26 (4): 232 - 237.
- Shi Xian-feng, Peng Jin-guang, Li Yu-hua, zeng Hong-xia, Du Nian-hua, Wang Li-ping. 2010. Study on the identification method of watermelon polyploid. Zhejiang Agricultura Sinica, (2): 273 - 275. (in Chinese)
- 施先锋, 彭金光, 李煜华, 曾红霞, 杜念华, 汪李平. 2010. 西瓜多倍体鉴定方法的研究. 浙江农业科学, (2): 273 - 275.
- Siebel J, Pauls K P. 1989. A comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus*. Theoretical and Applied Genetics, 78 (4): 473 - 479.
- Sornitip A, Poolsawat O, Kativat C, Tantasawat P A. 2017. Gynogenesis and doubled haploid production from unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.) . Canadian Journal of Plant Science, 98: 353 - 361.
- Su Min. 2011. New germplasm creation of ZYMV resistant squash by using molecular marker and double haploid technique[M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 苏敏. 2011. 利用分子标记和单倍体技术进行西葫芦抗 ZYMV 的种质创新研究[硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Sun Shou-ru. 2011. Study on *in vitro* culture and mechanism of unpollinated ovary and ovule in ornamental pumpkin[M. D. Dissertation]. Zhengzhou: Henan Agricultural University. (in Chinese)
- 孙守如. 2011. 观赏南瓜未授精子房、胚珠离体培养及其机理研究[硕士论文]. 郑州: 河南农业大学.
- Sun Shou-ru, Zhang Peng, Hu Jian-bin, Sun Li-ping, Zhang Man, Sun Zhi-qiang. 2013. *In vitro* culture and plant regeneration of unfertilized ovule of pumpkin. Chinese Bulletin of Botany, 48 (1): 79 - 86. (in Chinese)
- 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 (1): 79 - 86.
- Suprunova T, Shmykova N. 2008. *In vitro* induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*// Pitrat M. Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae. Avignon, France: 371 - 374.
- Tang Tao-xia. 2015. Research on technology of unpollinated ovary culture and the ploidy identification of embryo sac plants in *cucurbita pepo* L. [M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 唐桃霞. 2015. 西葫芦未授粉子房培养及胚囊植株倍性鉴定技术研究[硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Tantasawat P A, Sornitip A, Poolsawat O, Chaowiset W, Pornbungkerd P. 2015. Evaluation of factors affecting embryo-like structure and callus formation in unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus*) . Int J Agric Biol, 17 (3): 613 - 618.
- Tao Zi-rong, Liu Min-song, Zhu Zhong-chun. 1985. *In vitro* production of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of potato. Genetics, 5: 24. (in Chinese)

- 陶自荣, 刘敏颂, 祝仲纯. 1985. 从马铃薯未传粉子房培养获得单倍体植株. 遗传, 5: 24.
- Wang Lin. 2009. Studies of *in vitro* culture of unpollinated ovules in melon (*Cucumis melo* L.) [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 王林. 2009. 甜瓜未受精胚珠离体培养研究[硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Wang Lu, Chen Xiao-yan, Zhang Li, Chen Huai-meng, Ren Hua-zhong. 2008. Effect of different factors on induction of embryoids in unfertilized ovaries of cucumber. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 17 (4): 267 - 270. (in Chinese)
- 王璐, 陈小燕, 张力, 陈怀勳, 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 (4): 267 - 270.
- Wang S, Jin W W, Wang K. 2019. Centromere histone H3 and phospholipase-mediated haploid induction in plants. Plant Methods, 15: 42.
- Wang Yan, Xiao Yuan, Liu Wei, Li Ting-ting, Hu Rui, Qiao Zhi-xian. 2015. Operation skills of flow cytometer for detecting nuclear DNA contents in higher plant cells. Plant Science Journal, 33 (1): 126 - 131. (in Chinese)
- 汪艳, 肖媛, 刘伟, 李婷婷, 胡锐, 乔志仙. 2015. 流式细胞仪检测高等植物细胞核 DNA 含量的方法. 植物科学学报, 33 (1): 126 - 131.
- Wang Ye, Zhang Sheng-ping, Miao Han, Gu Xing-fang. 2015. Studies on haploid plant induction via *in vitro* unfertilized ovule culture of cucumber. Acta Horticulturae Sinica, 42 (11): 2174 - 2182. (in Chinese)
- 王烨, 张圣平, 苗晗, 顾兴芳. 2015. 黄瓜未受精胚珠离体培养及单倍体植株再生. 园艺学报, 42 (11): 2174 - 2182.
- Wang Zhao-yang. 2012. Research on the technology of ovule culture and pollen development in squash (*Cucurbita pepo* L.) [M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 王朝阳. 2012. 西葫芦胚珠培养技术及雄花花粉发育研究[硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Wei Ai-min, Du Sheng-li, Han Yi-ke, Liu Nan. 2014. Transformation system through *Agrobacterium tumefaciens* mediated unfertilized ovary culture in cucumber. China Cucurbits and Vegetables, 27 (5): 5 - 9. (in Chinese)
- 魏爱民, 杜胜利, 韩毅科, 刘楠. 2014. 农杆菌介导的黄瓜未受精子房培养遗传转化体系的建立. 中国瓜菜, 27 (5): 5 - 9.
- Wei Ai-min, Du Sheng-li, Han Yi-ke, Zhang Li. 2001. Methods of plant cell ploidy level identification. Tianjin Agricultural Sciences, 7 (2): 41 - 43. (in Chinese)
- 魏爱民, 杜胜利, 韩毅科, 张历. 2001. 植物细胞染色体倍性鉴定方法. 天津农业科学, 7 (2): 41 - 43.
- Wei Ai-min, Han Yi-ke, Du Sheng-li, Zhang Gui-hua, Liu Nan. 2007. Effects of donor plant cultivation season and cultivation methods on *in vitro* culture of cucumber unfertilized ovary. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, (5): 141 - 144. (in Chinese)
- 魏爱民, 韩毅科, 杜胜利, 张桂华, 刘楠. 2007. 供体植株栽培季节和栽培方式对黄瓜未受精子房离体培养的影响. 西北农业学报, (5): 141 - 144.
- Wu Xi-xi. 2018. Study on liquid culture technology of unfertilized ovule of pumpkin [M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 武习习. 2018. 南瓜未受精胚珠液体培养技术探究[硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Xie Bing. 2005. *In vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.) and plant regeneration [Ph. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 谢冰. 2005. 西葫芦的离体雌核发育及植株再生[博士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Xie Bing, Wang Xiu-feng, Fan Zhi-cheng. 2006. Improved conditions of *in vitro* culture of unpollinated ovules and production of embryonary sac plants in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). Scientia Agricultura Sinica, 39 (1): 132 - 138. (in Chinese)
- 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 (1): 132 - 138.
- Xu Jing. 2007. Construction of high efficient system *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.) [M. D. Dissertation]. Urumqi: Xinjing Agricultural University. (in Chinese)
- 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.

- Xu Xiao-feng, Huang Xue-lin. 2003. TDZ: an efficacious plant growth regulator. *Chinese Bulletin of Botany*, 20 (2): 227 - 237. (in Chinese)
- 徐晓峰, 黄学林. 2003. TDZ: 一种有效的植物生长调节剂. *植物学通报*, 20 (2): 227 - 237.
- Xue Guang-rong, Yu Wen-yan, Fei Kai-wei, Cui Hai-nan, Sun Rui-xing. 1983. Watermelon plants derived by *in vitro* anther culture. *Plant Physiol Commun*, (4): 40 - 42. (in Chinese)
- 薛光荣, 余文炎, 费开伟, 崔海南, 孙瑞星. 1983. 西瓜花药离体培养获得花粉植株. *植物生理学通讯*, (4): 40 - 42.
- Yao L, Zhang Y, Liu C, Liu Y, Wang Y, Liang D, Liu J, Sahoo G, Kelliher T. 2018. *OsMATL* mutation induces haploid seed formation in indica rice. *Nature Plants*, 4 (8): 530 - 533.
- Zhang Li-jie, Yang Ying, Shen Wen-juan, Wang Jian-she. 2015. Induced haploid and identification of watermelon *in vitro* gynogenesis. *Journal of Agricultural Sciences*, 36 (4): 8 - 11. (in Chinese)
- 张立杰, 杨颖, 沈文娟, 王建设. 2015. 西瓜离体雌核发育诱导单倍体及鉴定. *农业科学研究*, 36 (4): 8 - 11.
- Zhao Jun, Pan Jun-song, Cai Run, Wu Ai-zhong. 2003. Application of radiated pollen induced haploid plants in cucurbitaceae. *Journal of Shanghai Jiao Tong University (Agricultural Science Edition)*, 21 (3): 259 - 264. (in Chinese)
- 赵隽, 潘俊松, 蔡润, 吴爱忠. 2003. 辐射花粉技术在葫芦科诱导单倍体上的应用. *上海交通大学学报 (农业科学版)*, 21 (3): 259 - 264.
- Zhao Xiao-fei. 2014. Research of embryo sac regeneration plants induction by *in vitro* culture of the female nucleus in *Cucurbita pepo* L. [M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 赵晓菲. 2014. 西葫芦离体雌核培养诱导胚囊再生植株技术研究[硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Zheng J S, Sun C Z, Yan L Y. 2019. Development of cucumber autotetraploids and their phenotypic characterization. *Cytologia*, 84 (4): 359 - 365.
- Zhong Y, Chen B J, Li M R, Wang D, Jiao Y Y, Qi X L, Wang M, Liu Z K, Chen C, Wang Y W, Chen M, Li J L, Xiao Z J, Cheng D H, Liu W X, Boutilier K, Liu C X, Chen S J. 2020. A DMP-triggered *in vivo* maternal haploid induction system in the dicotyledonous *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 6 (5): 466 - 472.
- Zhou Chang, Yang Hong-yuan. 1980. *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of *Oryza sativa* L. *Acta Genetica Sinica*, 7 (3): 89 - 90. (in Chinese)
- 周嫦, 杨弘远. 1980. 从水稻未授粉的幼嫩子房培养出单倍体小植株. *遗传学报*, 7 (3): 89 - 90.
- Zhou Xia, Zhang Lu, Zhou Jun-guo, Deng Ying, Wang Yi, Lou Qun-feng, Chen Jin-feng. 2020. Embryonary sac regenerated plants were obtained in cucumber via *in vitro* unpollinated ovary culture. *Acta Horticulturae Sinica*, 47 (3): 455 - 466. (in Chinese)
- 周霞, 张璐, 周俊国, 邓英, 王怡, 娄群峰, 陈劲枫. 2020. 黄瓜未授粉子房离体培养获得胚囊再生植株. *园艺学报*, 47 (3): 455 - 466.
- Zhu Zhong-chun, Wu Hai-shan. 1979. Haploid plants were cultivated from unpollinated wheat and tobacco ovary. *Acta Genetica Sinica*, (2): 181 - 183. (in Chinese)
- 祝仲纯, 吴海珊. 1979. 从未授粉的小麦及烟草子房培养出单倍体植株. *遗传学报*, (2): 181 - 183.
- Zou T, Song H, Chu X, Tong L, Liang S, Gong S, Yang H, Sun X. 2020. Efficient induction of gynogenesis through unfertilized ovary culture with winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.). *Scientia Horticulturae*, 264: 109152.
- Zou T, Su H, Wu Q, Sun X. 2018. Haploid induction via unfertilized ovary culture in watermelon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 135 (2): 179 - 187.