

葫芦科作物离体雌核发育技术研究进展

张成桃, 宋慧娟, 孙翔宇, 戴思慧, 孙小武

(湖南农业大学园艺学院 长沙 410128)

摘要: 单倍体或双单倍体对作物改良、遗传育种具有重要意义, 对提高单倍体的诱导频率、建立高效稳定的离体雌核诱导体系至关重要。而常规育种周期长、工作量大, 且遗传性状存在不稳定性。在葫芦科作物中通常通过未授粉子房、胚珠离体培养的途径产生单倍体或双单倍体植株, 从而获得纯合的自交系, 使基因快速纯合, 极大地缩短育种年限。对葫芦科作物离体雌核发育技术进行了综述, 影响离体雌核发育结果的主要因素有供体植株的基因型、培养基及添加的外源激素、黑暗热激与预冷处理方式、播种季节、子房发育时期等。同时也概括了再生植株的倍性与加倍方法, 为后续葫芦科作物离体雌核发育的研究提供参考依据。

关键词: 葫芦科作物; 离体雌核发育; 离体培养; 影响因子

中图分类号: S642+S65

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2024)04-001-06

Research progress on *in vitro* gynogenesis technology of Cucurbitaceae crops

ZHANG Chengtao, SONG Huijuan, SUN Xiangyu, DAI Sihui, SUN Xiaowu

(College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China)

Abstract: Haploid or double haploid plays an important role in crop improvement and genetic breeding. It is very important for increasing the induction frequency of haploid and establishing an efficient and stable *in vitro* gynogenetic induction system. The conventional breeding cycle is long, the workload is heavy, and the genetic characters are unstable. Haploid or double haploid plants are usually produced by *in vitro* culture of unpollinated ovary and ovule, so as to obtain homozygous inbred lines, which can make genes homozygous quickly and shorten breeding life greatly. In this paper, the authors reviewed the techniques of *in vitro* gynogenesis of cucurbit crops, and found that the main factors affecting the results, including the genotypes of the donor plants, the medium and added exogenous hormones, the methods of dark heat shock and pre-cooling, the sowing season, and the stage of ovary development. Besides, the methods of ploidy and doubling of regenerated plants were also summarized, to provide reference for the subsequent research on the development of *in vitro* female nuclei of cucurbitaceae crops.

Key words: Cucurbit crops; *In vitro* gynogenesis; *In vitro* culture; Influencing factors

常规的育种手段周期长、变异小, 需要一种能快速、准确繁育出携带所需性状的纯合植株的方法。利用离体雌核培养诱导技术可以快速得到纯合植株, 缩短育种周期, 加快育种进程。但在葫芦科离体雌核发育的过程中受到许多因素的影响, 导致类胚诱导率、出胚率较低等许多问题。因此, 通过改进试验技术、方法来提高其诱导效率, 建立稳定性好、重复性高的未授粉子房离体培养技术, 在葫芦科作物育种中具有重要意义。笔者对影响葫

芦科离体雌核发育技术的几个因素进行了综述, 为今后离体雌核发育技术研究提供一些参考依据。

1 影响因素

1.1 基因型

大量研究表明, 供体材料的基因型是决定离体雌核发育成功的首要因素, 不同基因型的雌核在离体培养过程中再生能力存在着明显差异。在南瓜中发现, 不同基因型供体材料在相同诱导条件下,

收稿日期: 2023-11-06; 修回日期: 2024-01-27

基金项目: 湖南省科技厅重点研发项目(2022NK2007)

作者简介: 张成桃, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为南瓜分子育种。E-mail: 2855184023@qq.com

通信作者: 孙小武, 男, 教授, 主要研究方向为瓜类育种。E-mail: sun0070@139.com

戴思慧, 女, 教授, 主要研究方向为瓜果蔬菜学。E-mail: daisihui@126.com

胚状体的诱导率差异显著^[1-2]。陈玲^[3]也有相似的发现,供试的7份材料中有一品种胚珠难以膨大转绿。在黄瓜的研究中也表明,胚状体的发生因基因型而异^[4],曹冰东等^[5]选用的9个不同基因型的黄瓜在同一条件下进行离体培养,出胚率存在显著差异,最高的为95.93%,最低的为8.15%。在西瓜中,李迎迎^[6]发现,同一诱导培养基上,不同基因型材料的胚珠膨大率有很大的差别,且不同基因型材料胚状体诱导率之间也存在着差异。荣文娟^[7]的研究也表明,基因型对未受精胚珠离体培养的诱导有重要影响。在西葫芦中也有研究表明,同一诱导条件下,不同基因型之间的出胚率有明显差异^[8-10]。说明在葫芦科作物中,供体材料的基因型是影响离体雌核发育的关键因素,而基因型是不可改变的因素,某些基因型在未授粉子房离体培养过程中难以建立稳定性强和重复性好的体系,因此在未授粉胚珠子房离体培养中基因型的选择至关重要。

1.2 培养基与生长调节剂

在葫芦科作物离体雌核培养研究中,大多选用固体培养基,且以MS作为基础培养基,通常添加蔗糖和葡萄糖^[11-13]。翟庆慧^[14]发现,无论是未受精子房,还是未受精胚珠都是在以蔗糖为碳源时的诱导率更高,通常应用3%的蔗糖作为基本碳源^[15-17]。而武习习^[18]在2018年首次对南瓜未受精胚珠采用培养液振荡法培养,并且胚珠愈伤组织基本全部转绿。这说明培养液可能更加适合诱导未受精胚珠。

荣文娟等^[19]发现,西瓜未受精胚珠与未受精胚珠诱导出的愈伤组织接种在不加任何外源激素的MS基本培养基上,全部褐化死亡,冯诚诚等^[12]在苦瓜上也有类似发现。周霞等^[11]也发现,黄瓜未受精子房切片在未添加激素的MS培养基上无明显变化。在西葫芦上,未添加激素也不能诱导出再生植株^[8]。何娅^[20]在南瓜中也有相同发现。前人的研究表明,不添加任何激素的MS培养基对胚珠的诱导作用很小,在培养过程中是需要一定种类及浓度的激素诱导的。在葫芦科离体雌核发育过程中应用较多的激素有以下几种。

2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)是诱导多种植物离体细胞转变为胚性细胞的重要激素。在南瓜中,不少研究表明培养基中未添加一定浓度的2,4-D时,难以诱导胚状体的形成,添加一定浓度的2,4-D就可以诱导出胚状体^[21-22]。而且2,4-D以较高质量浓度 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与其他生长调节剂组合使用时胚状体诱导率较高^[1,23]。说明2,4-D对南瓜离体雌核发

育是重要的。但李玲等^[24]在西瓜中发现,在只添加2,4-D的培养基上,愈伤组织不分化,不能获得芽点。

TDZ(Thidiazuron,苯基噻二唑脲)是离体雌核发育过程中常用的生长调节剂。高宁宁等^[25]研究发现,TDZ能够促进胚状体的形成,在 $0.03\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对甜瓜的诱导频率最高。冯诚诚等^[12]在苦瓜上也发现,在诱导培养基中添加TDZ有利于胚状体的发育分化。而柯思佳^[26]发现,在甜瓜中,试验所选的3个不同基因型的材料以MS为基本培养基,不添加TDZ的雌核发育反应率分别为0、4%、8%,而添加 0.02 与 $0.04\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的TDZ其雌核发育反应率为70%~98%,且 $0.04\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的效果好于 $0.02\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。李建欣等^[27]在黄瓜中有类似的发现,在只含有一种激素TDZ的培养基中胚状体很难分化为幼苗,应转接到一定浓度6-BA和NAA的培养基中。唐桃霞等^[28]在西葫芦中也发现TDZ与NAA组合使用时比单独使用时诱导效果更好,其中以 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ+ $0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA时效果最好。

AgNO_3 起到抑制乙烯活性的作用,培养基中加入适量的 AgNO_3 ,能起到促进愈伤组织器官发生或体细胞胚胎发生的作用。其对黄瓜未授粉子房培养中的胚状体发生率起到积极作用^[15,17,29],在南瓜中,孙守如等^[21]发现,没有添加 AgNO_3 的培养基的出胚率最高,显著高于添加 AgNO_3 的处理,随着培养基中 AgNO_3 浓度的增加,未受精胚珠的出胚数大幅下降,说明其对南瓜子房离体培养起到抑制作用^[21]。唐桃霞等^[28]发现,在西葫芦未授粉子房离体培养过程中, AgNO_3 对胚状体诱导不明显,却可以显著减少玻璃化胚的发生,但质量浓度过高会影响胚状体的发生。出现不同现象的原因可能是供体的种类与基因型不同,对 AgNO_3 的敏感程度不一样。

NAA、IAA、6-BA等也广泛应用于葫芦科作物离体雌核培养过程中,所使用的浓度、种类组合在不同的材料中有所不同^[3,8,13-14,22,30]。唐桃霞等^[31]发现,甜瓜胚珠膨大率与内源激素IAA含量呈极显著正相关,说明IAA是参与植物生长发育的重要激素。程慧等^[32]发现,在西葫芦未受精子房的离体培养中,不添加6-BA、NAA或只添加其中任一种激素的处理均不能诱导出胚状体,在2种激素共同存在时均能诱导出胚状体。培养基中不同植物生长调节剂的种类和浓度配比对离体雌核发育的诱导有着极其重要的影响,适宜质量浓度的激素组合会比单独一种激素的效果更佳。但是不同作物甚至不同品种所适用的植物生长调节剂的种类、浓度及组合

有所不同,这需要在今后的研究中不断地完善和更新。

1.3 不同预处理

对未受精子房接种之后进行预处理,不同的处理方法对未受精子房胚珠的诱导效果大不相同。有研究表明,在其他条件相同时,35°C 黑暗热激处理 5 d 的南瓜和西葫芦未授粉子房胚珠的反应效果较好,胚珠膨大率和转绿率较高^[33-35]。李禹琪^[36]和胡芳芳^[37]分别发现,南瓜在 38°C 条件下热激 5 d、西葫芦 35°C 黑暗热激 6 d 时效果最佳。李建欣等^[27]在黄瓜中发现,对 3 个不同基因型的黄瓜 35°C 热激处理 3 d 时,胚状体诱导率均达到最高值,而处理 4 d 的诱导率开始下降,5 d 的为最低。郭晓雨等^[38]研究发现,35°C 热激 4 d 时,黄瓜雌核启动率最高。还有研究发现,黄瓜子房在 4°C 下处理 4 d 时,植株再生率最高^[39]。荣文娟等^[19]发现,西瓜以 35°C 黑暗热激 3 d 为宜,但也有研究发现,35°C 热激处理 4 d 的子房雌核启动率和芽点率是最高的^[24]。闵子杨等^[40]研究发现,在 35°C 黑暗条件下热激 5 d 时,西瓜胚珠出胚率较高。甜瓜在 35°C 热激处理 3 d 时效果最好^[25],也有研究发现,热激处理 4 d 时反应最好^[26],以上研究结果都证明,对西瓜、甜瓜胚珠离体培养较好的热激温度为 35°C。牛明明^[41]研究发现,在甜瓜中 30°C 暗培养 3 d 时为最佳热激处理。苦瓜未授粉子房热激 33°C 处理 3 d 的诱导效果最好,有利于苦瓜胚状体膨大和胚珠转绿^[12]。瓜类作物的最佳热激处理的温度和时间各不相同,可能是由于所选用的供体材料品种不同。Malik 等^[16]对温度预处理和不同浓度 TDZ 之间的相互作用进行研究,发现 0.04 和 0.02 mg·L⁻¹ 的 TDZ,都是 4°C 预冷处理比没有温度预处理的诱导胚状体效果较好。

1.4 其他因素

在葫芦科作物离体雌核培养过程中,还有供体栽培季节、子房发育阶段等影响因素。有研究表明,秋季栽培条件下更有利于离体雌核诱导胚状体的产生,秋播材料诱导频率最高^[42-43]。而魏爱民等^[44]研究了黄瓜在不同生长季节离体雌核发育的单倍体胚胎发生率和植株再生率的差别,结果表明,在温度相对较高的 6 月下旬、7 月上旬以及 9 月份播种,其单倍体胚胎发生率及植株再生率明显高于其他月份。韩丽华^[45]研究发现,甜瓜离体雌核的诱导效果,春季好于秋季。陈解放^[46]分析实质上是季节变化影响了植株的生活环境,进而改变了供体植株

的生长状态,改变了外植体的生理状态,从而影响了未受精胚珠的诱导频率。

陈学军等^[47]发现,其他诱导条件相同时,对西葫芦开花当日、开花前 3 d 及开花后 2 d 的未受精胚珠的诱导率进行比较,发现开花当日的未受精胚珠愈伤组织的诱导率最高,达 14.2%,开花前 3 d 的未受精胚珠次之,而开花后 2 d 的未受精胚珠最低。在南瓜中李禹琪^[36]发现开花当天的外植体膨大转绿率可达到 100%,愈伤诱导率达 57.5%,高于开花前 1 d 的膨大转绿率 85% 及愈伤诱导率 32.5%。闵子杨等^[1]和孙守如等^[21]也有类似的发现。但也有研究发现,开花前 1 d 与开花当日的胚珠膨大转绿率相差不大^[3,36]。而诱导子房片厚度为 1 mm 时,胚珠诱导效果较好^[32,36]。

还有研究发现,西瓜未受精子房培养的最佳诱导时间为 13 d^[48],找到合适的时间转接胚状体,也是提高诱导率的因素之一。

1.5 再生植株的驯化移栽

组培苗从所处的无菌环境到外界环境,光照、温度、湿度等自然环境条件都发生了巨大的变化,幼苗需要一个适应过程。而再生植株的苗龄、质量、驯化方式、移栽时的温度和基质对再生植株的成活率都有不同程度的影响。

在南瓜上,李石恒等^[49]在其他条件相同的情况下分别在 3、5、7 片真叶时移栽组培苗,其中以 5 片真叶时移栽成活率最高。赵晓菲等^[50]发现,西葫芦再生苗长出 5~6 片真叶的再生植株适应性好,驯化移栽成活率高达 90.0%,为再生苗驯化移栽的最佳时期。宋金亮^[35]在西葫芦上的炼苗方式为,先松瓶口炼苗 2 d,再完全打开瓶口 3 d,试管苗的移栽成活率最高达 90%。甜瓜的组培苗生根后移栽到栽培基质中加盖塑料薄膜保湿,在室温中驯化 1~2 周^[51]。施先锋等^[52]发现,甜瓜在温室中炼苗 5~7 d,逐渐加强光照,再移栽到大棚或大田中生长,成活率在 85% 以上。黄瓜再生植株在 7 d 左右短期驯化后可移栽田间^[53]。宣杨等^[54]对西瓜再生苗驯化 3~5 d 就移栽到无菌基质中,当长出 2~3 片新叶时栽到花盆中,成活率在 90% 以上。说明葫芦科中不同作物的驯化移栽方式不尽相同,在今后找到适合各种作物驯化移栽的方法也尤为重要。

2 再生植株的倍性及加倍技术

2.1 再生植株的倍性

离体雌核培养后的再生植株均为单倍体是至

关紧要的,再生植株理论上起源于胚囊细胞,所以再生植株应该是单倍体和自然加倍的双单倍体,但也有可能是由珠心、珠被等体细胞发育而成的二倍体^[55],也存在自发形成多倍体植株的现象。

在西瓜上,李迎迎^[6]得到4株完整的再生植株,通过倍性鉴定表明有1株是四倍体,其余3株是单倍体和二倍体的嵌合体植株。龚思等^[42]利用染色体计数法与流式细胞仪检测2种方法对36株再生植株进行了倍性鉴定,结果发现,其中35株为单倍体,只有1株为二倍体,这与Zou等^[48]在西瓜单倍体培养试验中再生植株倍性鉴定结果相似。西瓜离体雌核培养后的再生植株为单倍体的概率很大。

在南瓜上,闵子杨等^[1]通过胚状体发育成完整的幼苗,对其中移栽成活的35株再生植株进行倍性鉴定,结果发现有28株为二倍体或双单倍体,7株为单倍体。孙守如^[22]对5株南瓜进行根尖染色体观察,结果表明,其中4株染色体处于30~40条之间,推测为混倍体,1株观察到的最多染色体数为21条,判定此株为单倍体。武习习^[18]获得了胚状体再生植株36株,其中有28株再生苗由未经秋水仙素处理的胚珠产生,8株由经秋水仙素处理的胚珠产生,这两种情况下的再生植株都出现单倍体、二倍体或双单倍体和多倍体或混倍体,其中单倍体数量最少。说明南瓜离体雌核再生植株为单倍体的比率较低。

周霞等^[11]选用3份黄瓜供试材料通过离体雌核培养获得再生植株,经流式细胞仪分析鉴定其倍性分别为单倍体、二倍体和四倍体。曹冰东等^[5]获得的再生植株分别被鉴定为单倍体、二倍体、双单倍体及三倍体。高宁宁等^[25]对3个甜瓜品种的再生植株进行倍性测定,结果显示同时存在单倍体、二倍体、三倍体及混倍体,其中二倍体占比较大,在50%及以上,单倍体次之,三倍体和嵌合体占比最小。葫芦科离体雌核发育过程中自发形成多倍体植株的现象很普遍,不同品种之间发生此现象的概率各不相同,其再生植株产生不同倍性的原因还需要进一步深入研究。

2.2 加倍技术

由于单倍体植株是高度不育的,为了在农业生产中发挥单倍体的实际价值,单倍体植株需要进行加倍。单倍体加倍技术主要有自发加倍和人工加倍,而染色体自发加倍的能力取决于物种和基因型^[56]。目前,用于单倍体植株加倍的抗有丝分裂化学试剂有秋水仙碱、甲基氨丙磷(AMP)、普罗胺、普

蔡姆、米扎林和氟乐灵等,其最常见且应用最广泛的方法就是秋水仙素处理。

在西瓜中,Sari等^[57]用0.5%和1.0%秋水仙素处理西瓜单倍体植株1、2、4、6h,结果表明0.5%秋水仙素处理4h或1.0%秋水仙素处理2h均可获得二倍体植株。施先锋等^[58]也通过秋水仙素对3个不同西瓜品种的幼苗染色体进行加倍处理,结果表明,秋水仙素诱导3个品种均得到了四倍体,0.3%的秋水仙素处理幼苗的变异率较高,但3个品种的变异率不相同,其中以0.3%秋水仙素处理黄小玉母本的变异率最高,说明秋水仙素对不同品种的加倍效果不同。有人用不同浓度的秋水仙素和氟乐灵进行培养基加倍、浸芽加倍、滴生长点加倍3种加倍方法研究单倍体植株诱导二倍体植株的效果,浸芽法加倍效果最佳,其中秋水仙素诱导加倍时植株的存活率均达到100%,氟乐灵诱导加倍时植株的致死率最高达到100%,该结论表明秋水仙素更适用于单倍体植株加倍^[59]。

在甜瓜中,贾媛媛等^[60]对甜瓜单倍体进行不同方式的诱导处理,秋水仙素溶液离体浸泡和秋水仙素加入培养基离体培养甜瓜单倍体两种方法诱导双单倍体,试验结果表明离体浸泡处理后植株的成活率较高,均在83%以上,其中0.025%秋水仙素溶液浸泡8h的效果最好,0.1%秋水仙素溶液浸泡处理的效果较差,没有得到加倍植株。薛皓等^[61]研究发现,用秋水仙素对单倍体试管苗加倍时成株率较低,加倍效率仅有16.6%,而对移栽成活的单倍体植株加倍时用0.5%秋水仙素+2%DMSO浸泡生长点2h,成株率达100%、加倍效率达37.5%,主要原因可能是秋水仙素对幼嫩试管苗的毒害作用较大,使其生长点枯死,从而导致了整个植株的死亡;还发现 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA能同时提高单倍体再生率和自然加倍率。陈建伟^[62]用不同浓度的秋水仙素对单倍体茎尖进行处理,发现在0.1%~1%的秋水仙素范围内,秋水仙素处理质量分数越高,茎尖存活率越低,发现0.4%秋水仙素+4%DMSO处理下部分植株成功实现了染色体加倍,加倍成功率为20%,秋水仙素质量分数在0.5%以上,存活率迅速降低,甚至全部死亡,因此秋水仙素质量分数在0.1%~0.4%之间比较适合单倍体加倍。说明秋水仙素对不同材料、不同单倍体植株部位的染色体加倍效果存在着差异。

章鹏等^[63]以南瓜为材料将氟乐灵与秋水仙素进行比较,两者的诱导率最高分别达到15%和13.3%,

与孙守如^[22]试验得到的结果一致,虽然2种试剂差异并不显著,但是氟乐灵价格相对低廉,且毒性较小,因此可以代替秋水仙素用于南瓜单倍体植株加倍。韩毅科^[64]发现,在黄瓜双单倍体诱导纯合四倍体的加倍试验中,0.2%秋水仙素+1.5%DMSO滴苗处理,相对于另外添加羊毛脂膏的效果较明显,加倍频率达18.2%。

单倍体植株的加倍率因物种、采用的技术及诱导的方式不同而不同,在今后的研究中还需要不断探究。目前,单倍体植株染色体加倍主要采用秋水仙素处理,但秋水仙素存在毒性较强、危及人体健康、污染环境、用量较大、价格较高等弊端,需要寻找安全、无污染、低价格的一些加倍试剂。对加倍技术进行不断地完善和更新,使人们在今后的育种工作中更加容易、快速地获得四倍体和双单倍体。

3 问题与展望

目前,葫芦科作物未授粉子房和胚珠离体培养虽取得了大量的研究成果,但大部分研究工作仅限于选择适应的基因型、合适的培养基配方、预处理、供体栽培季节、子房发育阶段等方面。对这些影响因素进行了初步阐述,发现这些影响因素并不是孤立存在的,各影响因素之间相互影响、相互制约,共同对葫芦科作物雌核离体培养发育产生影响。但由于缺乏对诱导机制的理论研究,方法和效果都存在不稳定性,需要进一步完善。日后应从机制上进行深入的研究,加深对离体雌核诱导机制的认识,建立更完整的体系,为后续葫芦科作物离体雌核发育的研究提供参考依据。

单倍体植株的驯化和加倍也尤为重要,其驯化结果和加倍效果,根据所采用的方法、技术和选用的材料不同也有所不同。在今后的试验中还需要不断的探索与发展。

参考文献

- [1] 闵子扬,李涵,邹甜,等.南瓜未授粉子房离体培养及植株再生[J].植物学报,2016,51(1):74-80.
- [2] ZOU T, SONG H J, CHU X, et al. Efficient induction of gynogenesis through unfertilized ovary culture with winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) [J]. Scientia Horticulturae, 2020, 264: 109152.
- [3] 陈玲.南瓜未授精子房(胚珠)离体培养的研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [4] BAKTEMUR G, KELES D, KARA E, et al. Effects of genotype and nutrient medium on obtaining haploid plants through ovary culture in cucumber[J]. Molecular Biology Reports, 2022, 49(6):5451-5458.
- [5] 曹冰东,付文苑,唐兵,等.黄瓜未授粉子房离体培养条件的优化及植株再生[J].中国瓜菜,2022,35(5):8-16.
- [6] 李迎迎.西瓜未授粉子房离体培养技术的研究[D].郑州:河南农业大学,2017.
- [7] 荣文娟.西瓜未受精胚珠离体培养研究[D].北京:中国农业科学院,2015.
- [8] 葛志东.西葫芦未授粉子房离体培养研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2009.
- [9] 徐静.西葫芦雌核离体高效培养体系的建立[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2007.
- [10] 孙松松.利用单倍体诱导技术进行西葫芦抗WMV种质创新[D].河北邯郸:河北工程大学,2015.
- [11] 周霞,张璐,周俊国,等.黄瓜未授粉子房离体培养获得胚囊再生植株[J].园艺学报,2020,47(3):455-466.
- [12] 冯诚,陈小凤,黄熊娟,等.苦瓜未授粉子房的胚状体诱导[J].分子植物育种,2020,18(9):2994-3001.
- [13] 王云龙.西葫芦未授精子房、胚珠离体诱导再生植株技术优化研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2015.
- [14] 翟庆慧.南瓜未授精子房和未受精胚珠离体培养研究[D].郑州:河南农业大学,2009.
- [15] DIAO W P, JIA Y Y, SONG H, et al. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers[J]. Scientia Horticulturae, 2009, 119(3):246-251.
- [16] MALIK A A, CUI L, ZHANG S X, et al. Efficiency of SSR markers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture[J]. Horticultural Science, 2011, 38(1):27-34.
- [17] LI J W, SI S W, CHENG J Y, et al. Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus*[J]. Biologia Plantarum, 2013, 57(1):164-168.
- [18] 武习习.南瓜未受精胚珠液体培养技术探究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2018.
- [19] 荣文娟,刘君璞,朱迎春,等.西瓜未受精胚珠离体培养若干影响因素的研究[J].中国瓜菜,2015,28(3):9-13.
- [20] 何娅.南瓜未授精子房离体诱导植株方法研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2015.
- [21] 孙守如,章鹏,胡建斌,等.南瓜未受精胚珠的离体培养及植株再生[J].植物学报,2013,48(1):79-86.
- [22] 孙守如.观赏南瓜未授精子房、胚珠离体培养及其机理研究[D].郑州:河南农业大学,2011.
- [23] 张蕾琛,孙楠,王迎儿,等.南瓜未授粉子房和胚珠离体培养影响因素[J].浙江农业科学,2019,60(9):1556-1560.
- [24] 李玲,闵子扬,童龙,等.西瓜未授粉子房的离体培养[J].中国瓜菜,2014,27(6):6-10.
- [25] 高宁宁,李晓慧,康利允,等.厚皮甜瓜未授精子房离体培养获得胚囊再生植株[J].果树学报,2020,37(7):1036-1045.
- [26] 柯思佳.不同抗性甜瓜接种蔓枯病菌后的光合特性分析及甜瓜未授粉子房离体培养研究[D].南京:南京农业大学,2019.
- [27] 李建欣,葛桂民,庞淑敏,等.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[J].北方园艺,2012(23):131-134.

- [28] 唐桃霞,程永安,张恩慧,等.外源添加物对西葫芦胚状体诱导效果研究[J].西北农业学报,2015,24(6):84-89.
- [29] 刁卫平.不同倍性黄瓜(*Cucumis sativus* L.)材料的创制及遗传分析[D].南京:南京农业大学,2009.
- [30] 李伟,程永安,张恩慧,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.
- [31] 唐桃霞,孔维萍,任凯丽,等.热激对甜瓜未授粉子房培养胚珠膨大期内源激素的影响[J].寒旱农业科学,2023,2(1):53-58.
- [32] 程慧,程永安,张恩慧,等.西葫芦未授精子房离体培养的影响因素[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2013,41(11):100-104.
- [33] 邓英,唐兵,吴康云,等.南瓜未授粉子房培养形成再生植株的研究[J].西北植物学报,2018,38(2):381-385.
- [34] 张加一.南瓜未受精胚珠再生植株方法研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2016.
- [35] 宋金亮.西葫芦雌核离体培养条件的优化及植株再生[D].郑州:河南农业大学,2018.
- [36] 李禹琪.南瓜未受精胚珠离体培养影响因子研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2017.
- [37] 胡芳芳.西葫芦单倍体育种技术优化研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2016.
- [38] 郭晓雨,宋晓飞,李晓丽,等.旱黄瓜未授粉子房雌核诱导技术体系研究[J].安徽农业科学,2020,48(5):51-54.
- [39] DEND Y, TANG B, ZHOU X. et al. Direct regeneration of haploid or doubled haploid plantlets in cucumber (*Cucumis sativus* L.) through ovary culture[J]. Plant Cell Tiss and Organ Culture, 2020, 142: 253-268.
- [40] 闵子扬,邹甜,阮万辉,等.西瓜离体雌核发育诱导单倍体植株再生[J].分子植物育种,2019,17(13):4404-4409.
- [41] 牛明明.甜瓜离体雌核发育诱导单倍体研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2012.
- [42] 龚思,梁少华,严静怡,等.西瓜未授精子房离体培养技术[J].中国瓜菜,2019,32(5):17-21.
- [43] 谢冰,王秀峰,樊治成.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[J].中国农业科学,2006,39(1):132-138.
- [44] 魏爱民,韩毅科,杜胜利,等.供体植株栽培季节和栽培方式对黄瓜未授精子房离体培养的影响[J].西北农业学报,2007,16(5):141-144.
- [45] 韩丽华.厚皮甜瓜未受精胚珠离体培养技术[D].河北保定:河北农业大学,2004.
- [46] 陈解放.南瓜未受精胚珠离体培养体系的优化[D].郑州:河南农业大学,2010.
- [47] 陈学军,邢国明,陈竹君.西葫芦未授粉胚珠离体培养和植株再生[J].浙江农业学报,2000,12(3):165-167.
- [48] ZOU T, SU H N, WU Q. et al. Haploid induction via unfertilized ovary culture in watermelon[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2018, 135(2): 179-187.
- [49] 李石恒,王萍.籽用美洲南瓜离体快繁技术研究[J].北方农业学报,2022,50(5):96-104.
- [50] 赵晓菲,程永安,张恩慧,等.西葫芦双单倍体自交一代离体再生研究[J].西北农业学报,2014,23(6):134-140.
- [51] 高宁宁,赵卫星,康利允,等.不同基因型甜瓜再生体系的比较[J].北方园艺,2023(10):24-30.
- [52] 施先锋,孙玉宏,陈钢,等.甜瓜子叶组织培养与植株再生体系建立的研究[J].北方园艺,2010(20):133-135.
- [53] 王焯,顾兴芳,张圣平,等.黄瓜未受精胚珠离体培养及单倍体植株再生[J].园艺学报,2015,42(11):2174-2182.
- [54] 宣杨,徐洪国,仲娟娟,等.小果型西瓜快速繁殖技术研究[J].黑龙江农业科学,2017(11):45-47.
- [55] 邹甜,孙波,王志伟,等.葫芦科植物离体雌核发育研究进展[J].中国瓜菜,2017,30(10):1-5.
- [56] AHMADI B, EBRAHIMZADEH H. *In vitro* androgenesis: Spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants[J]. Plant Cell Reports, 2020, 39: 299-316.
- [57] SARI N, ABAK K. Effect of colchicine treatment with different doses and periods of *in vitro* chromosome doubling in haploid watermelon[J]. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 1996, 20(6): 555-559.
- [58] 施先锋,彭金光,王宏太,等.秋水仙素诱导西瓜多倍体的研究[J].长江蔬菜,2010(8):17-19.
- [59] 李海伦,高宁宁,李晓慧,等.不同诱导剂和诱导方法对西瓜单倍体染色体加倍效果的比较研究[J].中国瓜菜,2024,37(1):25-31.
- [60] 贾媛媛,张永兵,刁卫平,等.双单倍体甜瓜的获得及其初步定性研究[J].江苏农业科学,2008,36(1):116-118.
- [61] 薛皓,王建设,刘世鹏,等.甜瓜单倍体加倍技术研究[J].安徽农业科学,2008,36(29):12656-12658.
- [62] 陈建伟.辐射花粉授粉诱导获得单倍体黄瓜植株及其染色体加倍[D].南京:南京农业大学,2020.
- [63] 章鹏,孙守如,陈解放,等.氟乐灵诱导南瓜染色体加倍初步研究[J].河南农业大学学报,2011,45(1):42-45.
- [64] 韩毅科.黄瓜(*Cucumis sativus* L.)倍性鉴定及染色体加倍技术研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2001.