

被子植物未受精胚珠与子房离体培养的研究进展

伍成厚^{1,2}, 梁承邨¹, 叶秀麟^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650; 2. 漳州师范学院生物系, 福建 漳州 363000)

摘要:介绍被子植物未受精胚珠与子房离体培养诱导单倍体植株的研究进展。迄今已有9个科21种植物用这一方法诱导出单倍体植株,植物的基因型、外植体的发育程度、接种前的预处理、培养基和培养条件等均能影响诱导率的高低。胚胎学观察揭示大孢子与胚囊内的卵细胞、助细胞和反足细胞均有可能在培养中启动分裂,通过胚状体或愈伤组织形成单倍体植株。本项技术在植物单倍体育种中可发挥重要作用。

关键词:胚珠;子房;愈伤组织;胚状体;单倍体;综述

中图分类号:Q943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-3395(2004)06-0580-07

Progress in Studies on *in vitro* Culture of Unfertilized Ovules and Ovaries in Angiosperms

WU Cheng-hou^{1,2}, LIANG Cheng-ye¹, YE Xiu-lin^{1*}

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Department of Biology, Zhangzhou Normal College, Zhangzhou 363000, China)

Abstract: Gynogenic haploids through unfertilized ovules and ovaries have been reported from 21 species in 9 families since 1976. This review includes the following subjects: induction frequency of haploids depend on genotypes, developmental stage of explants, temperature pretreatment of the explants, medium composition and the conditions of cultivation. Embryological studies reveal that megaspore and such cells as egg, synergid and antipodals in mature embryo sac initiate the division of forming haploid plants through embryogenesis or callus formation. This technique provides an optimal approach to haploid breeding.

Key words: Ovule; Ovary; Callus; Embryoid; Haploid; Review

从未受精胚珠与子房离体培养诱导大孢子或雌配子体的细胞产生单倍体植株与用花药培养一样在单倍体育种上具有实用意义^[1]。自1976年San Noeum从未受精子房培养首次诱导出单倍体植株以来,已从禾本科(Gramineae)的水稻(*Oryza sativa*)^[2]等9科21种植物的未受精胚珠与子房诱导出单倍体植株,禾本科植物5种,茄科(Solanaceae)植物4种,百合科(Liliaceae)植物3种,葫芦科(Cucurbitaceae)植物3种,菊科(Compositae)植物2种,以及藜科(Chenopodiaceae)、杨柳科(Salicaceae)、大戟科(Euphorbiaceae)、石竹科(Caryophyllaceae)植物各1

种。本文拟就这一领域的研究进展加以评述。

1 影响未受精胚珠与子房培养的因素

影响未受精胚珠与子房培养的因素很多,如植物的基因型、外植体的发育程度、培养基、培养条件等。

1.1 植物的基因型

在多种植物培养中,不同基因型在培养中的反应不同。水稻中粳稻的诱导频率一般高于籼稻^[3,4];杂交组合比定型品种诱导率高^[5]。烟草(*Nicotiana*

收稿日期:2003-09-30 接受日期:2004-01-18

基金项目:广东省科技计划项目(C20304和2002A2040801)资助

* 通讯作者 Corresponding author

tabacum)品种“NC89”的胚状体诱导率达86.67%,辽烟1号只有43.33%^[6],而黄花烟草(*Nicotiana rustica*)品种“甘肃黄花烟草”的仅为8%^[7]。非洲菊(*Gerbera jamsonii*)切花型品种间愈伤组织的诱导频率有很大差异,“Fresultane”为8%、“Super Gerbera”12.5%、“K9-8”43.3%;盆栽型17个基因型中有4个不能诱导愈伤组织,7个的诱导率高于3%^[8]。甜菜(*Beta vulgaris*)不同基因型愈伤组织的诱导率介于1%~7.6%,有两个栽培品种和一个野生型材料没有获得再生植株^[9],但不同基因型之间的差异只在特定的培养基上表现出来^[10]。向日葵(*Helianthus annuus*)不同品种在培养中的差异十分显著,大体可以分为3种类型:能诱导孤雌生殖,如“当阳”、“B-11”、“阿尔及利亚”;不能诱导孤雌生殖,但有珠被体细胞增生,如“秭归”、“苏32”、“观赏”、“辽14”;对培养的反应比较迟钝,既无孤雌生殖,体细胞增生亦甚少,如“夫尼姆克”、“兴山”、“米脂”、“天津”^[11]。

不同基因型和地理起源的洋葱(*Allium cepa*)在培养中的诱导率差异明显^[12-15],如:杂交组合的诱导率较高^[13];北欧的品种比南欧和东欧的高^[13],美国起源的类型胚的诱导率分别是欧洲和日本起源的5倍和9倍^[14]。

1.2 外植体的发育程度

外植体的发育程度是一个重要的影响因素。未受精胚珠与子房培养的接种时期有一个较广的范围,而以接近成熟的胚囊较易诱导成功。

Castillio等^[16]从大麦(*Hordium vulgare*)成熟胚囊的胚珠诱导单倍体;黄群飞等^[17]从单核至成熟胚囊的各期大麦子房均可产生雌核发育胚,以八核至成熟胚囊期的诱导频率较高。接种水稻大孢子时期的子房不能诱导雌核发育愈伤组织,而单核至成熟胚囊期的子房均能产生雌核发育愈伤组织^[3-5],且以单核至四核时期诱导率较高^[4]。烟草^[6,18,19]、黄花烟草^[7]、洋葱^[20-22]从大孢子母细胞至成熟胚囊期均能诱导单倍体植株。大卫百合(*Lilium davidii*)孢原细胞至大孢子母细胞时期的子房离体培养也可产生单倍体植株^[23]。

玉米(*Zea mays*)^[24,25]、黄瓜(*Cucumis sativus*)^[26]、向日葵^[11,27,28]等植物只能从雌配子体晚期或成熟胚囊期的胚珠与子房培养诱导孤雌生殖。

1.3 接种前的预处理

接种前的低温预处理可能有利于某些植物未

受精胚珠与子房离体培养时形成单倍体植株。阎华等^[29]将向日葵花序在2~4℃冰箱中预处理24或48h,能明显地提高孤雌生殖的诱导频率,同时抑制珠被产生愈伤组织。4℃的低温处理对甜菜^[30]未受精胚珠诱导单倍体植株也有促进作用。

周端等^[23,31]接种水稻子房后给以6d的低温(12~13℃)处理,成功诱导出单倍体植株。但以后进行重复实验时,无论接种前或接种后进行低温处理,诱导率均未超过或甚至低于未处理的对照^[4]。稻穗在4~8℃下处理24h后,“红旗16号”品种的胚囊发育表现出多种丧失极性的异常变化,这些变化显然并不能引起雌核发育^[32]。4℃低温处理也不能增加西葫芦(*Cucurbita pepo*)未受精胚珠离体培养的单倍体植株诱导率^[33]。

黄瓜^[26]未受精子房培养前进行35℃高温预处理可以提高单倍体的诱导率。从15℃恒温栽培的洋葱植株取花蕾,用未受精子房进行培养,诱导率是10℃或12.7~25℃不恒温栽培植株的10倍^[34]。

1.4 培养基

1.4.1 基本培养基

未受精胚珠与子房培养通常采用Miller、N₆、MS、H、White等基本培养基或其改良型。阎华等^[11]在向日葵未受精胚珠培养中,二个供试品种对于MS、N₆和改良White3种培养基的反应基本一致,他们认为基本培养基的选择并非诱导向日葵孤雌生殖的决定因素;而薏苡(*Ciox lacrynajobi*)^[35]则以H培养基较合适。

NH₄⁺浓度明显影响棉花未受精胚珠离体纤维的诱导率^[36],向日葵^[37]的未受精胚珠培养分化过程中需要高浓度的KNO₃(5g L⁻¹)。百合^[23]子房培养时将维生素B₁的浓度提高到4mg L⁻¹,烟草^[7]未受精子房离体培养时增加B族维生素、肌醇和甘氨酸的使用量也可以提高出苗率;添加Adnine SO₄(0.3mg L⁻¹)有利于洋葱幼花的培养^[22]。在培养基中添加百合汁能促进青稞未受精子房胚状体的形成和植株的分化^[38]。2%的活性碳有利于烟草未受精子房诱导胚状体并具有壮苗作用^[9],而在甜菜子房培养时添加0.5%的活性碳对愈伤组织的诱导不利^[9]。洋葱幼花培养中添加腐胺(2mmol/L)和亚精胺(0.1mmol/L)有利于胚的诱导,在培养后期单独加入0.1mmol/L亚精胺还可促进胚发育成植株^[39]。培养基中添加100g L⁻¹的椰子汁有利于大麦单倍体的诱导^[16],而添加2%的椰子汁反而对烟草胚状体的诱导不利^[9]。

1.4.2 外源激素

培养基中通常需添加细胞分裂素和生长素等外源激素。水稻子房在无激素条件下通常不膨大,不产生愈伤组织, MCPA (2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid, 2-甲基-4-氯苯氧乙酸) 在 0.125–8.0 mg L⁻¹ 范围内, 子房膨大率随 MCPA 浓度的提高而递增, 但诱导雌核发育则以较低浓度 (0.125–0.5 mg L⁻¹) 为宜, 过高反而不利^[64]; 采用 2,4-D 2 mg L⁻¹ 也能诱导水稻的雌核发育^[9]。进一步的研究发现, 水稻无配子原胚的诱导不完全依赖外源激素, 但原胚的继续生长则需要适当的外源激素^[47]。大麦在 0.5 mg L⁻¹ MCPA + 1 mg L⁻¹ IAA + 1 mg L⁻¹ BA 或 1–2 mg L⁻¹ MCPA + 1 mg L⁻¹ NAA + 0.5 mg L⁻¹ KT 均可诱导胚胎发生, 但试验未报道不同激素水平诱导效果的差异^[17], Castillo 等^[64]认为大麦子房培养最适宜的激素浓度是 0.12 mg L⁻¹ MCPA + 0.49 mg L⁻¹ IAA + 0.99 mg L⁻¹ BA, 植株再生频率达到 6.61%。小麦 (*Triticum aestivum*)^[57] 子房在含 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D 培养基中培养 30 d, 有 28 个子房长出愈伤组织, 占接种子房数的 10.93%; 有 5 个子房长出愈伤组织后分化出了绿色植株, 占接种子房数的 1.93%。青稞^[38]在只含 2 mg L⁻¹ 2,4-D 的培养基上培养时, 愈伤组织的诱导率为 7.27%, 在 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 4 mg L⁻¹ BA 上的诱导率为 26.86%。

百合诱导愈伤组织需很高的生长素浓度 (4.0–8.0 mg L⁻¹ 2,4-D), 而植株再生需要的浓度则低一些 (1.0 mg L⁻¹ 2,4-D)^[23]。洋葱从幼花直接诱导胚需添加 2 mg L⁻¹ 2,4-D 和 2 mg L⁻¹ BA, 胚生长则不需外源激素^[144], 添加 GA₃ (1 mg L⁻¹) 或 ABA (1 mg L⁻¹) 不利于幼胚的诱导^[22]。吴伯骥等^[7]认为同时采用 0.5 mg L⁻¹ IAA 与 2 mg L⁻¹ BA 对烟草未受精子房诱导胚状体是必需的, 而潘莉等^[19]认为单独使用 0.05–2.0 mg L⁻¹ 2,4-D 或 1.0–4.0 mg L⁻¹ BA 均可从烟草未受精子房诱导胚状体。

外源激素的轻微改变对玉米^[29]、甜菜^[9]的诱导效果影响不大。向日葵诱导胚状体的产生甚至不需要添加外源激素^[29], 只有在植株再生阶段需添加不同种类和浓度的外源激素^[37]。

1.4.3 碳源

在未受精胚珠与子房培养中, 通常以蔗糖作为培养基中的碳源, 其浓度因培养材料不同而有很大的差异, 低的为 2%–3%, 高的达到 10%–14%。水稻以 3%–6% 较适宜, 浓度过高或过低均不利于雌核

发育^[3]。适当提高蔗糖浓度 (12%) 有利于向日葵孤雌生殖, 降低蔗糖浓度则适于珠被绒粘层胚状体与珠被愈伤组织的生长^[29]。杨树 (*Populus × simonigra*) 的未传粉子房培养时, 蔗糖浓度由 5% 提高到 10% 时, 雌核发育频率提高, 体细胞愈伤组织减少^[42]。

同一植物, 在诱导培养时培养基常含较高浓度的蔗糖 (百合 6%–8%, 青稞 5%–6%), 而分化培养基的蔗糖含量较低 (百合 4%–5%, 青稞 2%–3%)^[23,38]。洋葱胚的诱导用较高的蔗糖浓度 (10%), 而幼胚的生长只需 6% 的蔗糖, 生根培养时只需 4% 的蔗糖^[4]。

郑泗军等^[43]用棉花未受精胚珠进行离体培养时测试了蔗糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、果糖和半乳糖 6 种不同的碳源, 结果表明葡萄糖比蔗糖更适合诱导棉花未受精胚珠离体的发育。

1.4.4 固体与液体培养基

迄今所有子房与胚珠培养的成功试验几乎都是在固体培养基上进行的。只有水稻子房^[2-4,31,32,44-46]、向日葵胚珠^[11,28,29]除在固体培养基外, 在液体培养基上进行漂浮培养也获得成功。比较试验证明, 水稻进行漂浮培养效果较佳^[2], 而向日葵漂浮培养的效果不如固体培养基^[11]。

1.5 培养条件

培养温度一般保持在 25–28℃, 有的植物需较高或较低的温度, 如洋葱 20–22℃^[13], 而棉花未受精胚珠在 31±2℃ 培养也能很好诱导未受精胚珠的离体发育^[43]。有的植物则需要采取不同的昼夜培养温度; 如薏苡^[35]白天 21–25℃, 晚上 16–20℃; 洋葱^[22]白天 27℃, 夜间 24℃ 可很好诱导未受精胚珠的离体发育。

培养期间的光照条件也有较大影响。马铃薯 (*Solanum tuberosum*)^[48]子房诱导培养需在散射光或黑暗条件下进行; 分化阶段则用日光灯每日照射 8 h (约 2 000 lx)。百合^[23]在 800–1 200 lx 下诱导培养, 分化培养在 2 000–3 000 lx 下。洋葱胚的诱导采用白天光照 16 h, 光强 2 000 lx, 随后的植株诱导则需 1 500 lx 光强^[22]; 但也可一直采用光照 16 h d⁻¹, 光强 4 000 lx^[14]。

水稻未受精子房培养中, 周嫦等^[23,31,45]采用黑暗条件, 郭仲琛采用 2 000 lx 光照^[5], 均诱导了单倍体植株。有研究认为^[47], 水稻无配子生殖原胚的诱导对有无光照没有严格要求, 但原胚的继续生长和发育则需要黑暗条件下才能顺利进行。

烟草未受精子房培养, 在黑暗^[6]或光照^[6,19,50]下均

能诱导胚状体,但在黑暗条件下,胚状体产生的数量较少并逐渐白化,而适当的光照(1 500 lx,12 h d⁻¹)可以使胚状体转为绿色并提高诱导数量^[9]。

2 雌核发育的胚胎学

未受精胚珠与子房离体培养出单倍体植株的事实符合从大孢子或胚囊内的单倍体细胞起源的理论预期。为了查明其确切起源与发育过程,还必须借助胚胎学观察。

2.1 雌核发育的起点

周嫦等^[3]认为水稻未受精子房在接种早期胚囊继续沿配子体途径发育,形成成熟的胚囊后才由珠孔端的卵器启动发育形成原胚。郭仲琛^[5]也证明:水稻未受精子房发育的胚状体位于胚囊珠孔端,可能起源于卵器;反足细胞也可能形成具分生特点的细胞团。田惠桥等^[4]进一步的观察表明助细胞是胚囊原胚的主要来源,卵细胞没有胚胎发育的前途;反足细胞在很少的情形能形成类似原胚或愈伤组织的构造,但在数量上比由助细胞形成的要少得多。李国民等^[6]认为在离体培养过程中是由于胚囊游离核分裂轴向和细胞空间排列方位的改变导致各种变态胚囊的形成,在此基础上才启动助细胞的无配子生殖。

向日葵^[29]未受精胚珠培养时胚状体来自卵细胞,韭菜(*Allium tuberosum*)^[49]未传粉子房从卵细胞和反足细胞可经相似的早期胚胎发生过程再生单倍体植株。黄群飞等^[7]通过对大麦的观察,认为多数情况下胚是起源于卵器,反足器也有胚胎发生的可能。

用百合未受精子房培养的单倍体是来自大孢子的非正常发育^[23]。烟草可以通过大孢子与成熟胚囊的卵细胞两条不同的途径^[6,7,18,19,50]发育;当子房处于大孢子母细胞或大孢子时期进行接种,单倍体多起源于大孢子,当子房处于成熟胚囊期时单倍体多起源于卵细胞^[6];虽然接种不同发育时期的子房均可诱导出单倍体植株,但以中晚期的子房诱导率较高^[19]。

肖三元等^[51]从橡胶树(*Hevea brasiliensis*)未受精子房、胚珠诱导出小植株,但无证据表明是否为单倍体植株。而杨晓泉等^[52]用切片观察认为橡胶树未受精胚珠诱导的愈伤组织和胚状体均为孢子体起源。

已有的试验表明:由大孢子或胚囊内的卵细

胞、助细胞和反足细胞均可不同程度地诱导雌核发育。

此外,离体培养时水稻有些胚囊的中央细胞可产生类似胚乳游离核的构造,游离核的数目有的较少,有的较多并成片分布,有的甚至在局部区域开始形成细胞,但没有看到像体内胚乳那样大规模形成细胞与积累淀粉的情况,也没有看到它们形成原胚的迹象^[31]。在大麦^[17]、向日葵^[28]、异株女娄菜(*Melandrium album*)^[53]、黄花羽扇豆(*Lupinus luteus*)^[54]、香堇菜(*Viola odorata*)^[55]等植物也观察到未受精的极核分裂成类似胚乳游离核的构造,但没有证据表明它们能充当哺乳组织或本身再生植株。

2.2 雌核发育的特点

雌核的发育可通过胚状体与愈伤组织两条途径。甜菜未受精胚珠首先产生愈伤组织,除去愈伤组织并将外植体转入不含2,4-D的培养基后才能诱导植株再生^[9];百合^[23]、烟草^[6,7,56-58]未受精子房培养时有胚状体与愈伤组织两条途径。

黄群飞等^[7]观察到大麦胚囊原胚的发育与体内合子胚的发育相似,同样经历原胚发育与胚的分化两个阶段,所分化的胚状体多数类似禾本科的合子胚,有顶生的盾片和侧生的胚芽鞘和胚芽原始体,但有两例分化不正常的胚状体,其顶部扁化,具有两个侧生的突起。

水稻未传粉子房培养早期的原胚多呈梨形,与体内合子原胚的形态颇相似。原胚长大后,在珠孔端出现弧带形的分生组织区,显示一定程度的组织分化,但不发生胚器官的分化。这样巨大而不分化的原胚,与水稻体内正常形态的合子胚迥然不同。原胚主要是发育为愈伤组织,极少数情况下分化为胚状体^[45]。

2.3 离体孤雌生殖的组织化学和超微结构研究

向日葵离体孤雌生殖原胚发生初期的组织化学特征和体内合子胚相近;在后期,两者的淀粉动态呈现显著的差异,这可能是前者不能顺利分化的一种生理表现^[59]。

阎华等^[27]对向日葵未受精胚珠诱导的孤雌生殖过程超微结构的观察,发现卵细胞在离体条件下被激活,发生细胞核移位,极性丧失,细胞器增多并转变成活动状态,液泡化程度增大,合点端形成细胞壁等一系列变化,预示即将启动孤雌生殖。孤雌生殖的原胚具有合子原胚的基本特征,如核糖体密

集,线粒体、内质网、高尔基体丰富而呈活动状态,液泡分散,油滴消失,原胚外周壁上无胞间连丝而内部细胞壁上有胞间连丝等。但也表现出一些不同的特点,如部分原胚发生极性颠倒即胚柄朝合点端,胚朝珠孔端,有自体吞噬活动,有壁的自由生长和不完全壁的形成,出现游离核分裂等。

3 试验技术的改良

3.1 染色体倍性的观察

早期通常采用根尖染色体计数来确定再生植株的倍性,后来利用流式细胞仪来分析再生植株的倍性以减少试验的工作量^[8,14,26]。也有采用同工酶分析^[9,14,60]、叶尖染色体计数与下表皮气孔保卫细胞的叶绿体计数来确定再生植株的染色体倍性^[9]或直接从切片材料鉴定正在发育的胚状体的倍性等^[28]。

3.2 切片方法的简化

为了确定诱导产物的起源,必须用显微观察方法加以鉴别,但是如果用常规石蜡切片方法,工作量大。杨弘远等^[11,61]在实验中采用了3种简化的切片方法,减轻了试验的工作量,可比较容易进行大规模的切片观察:

①“爱氏苏木精整体染色-石蜡切片技术”,用整体染色代替片染,以减少染色的工作量,此法成功应用于水稻^[31,32,44-47]、大麦^[17]和向日葵^[28,29];

②“爱氏苏木精整体染色-透视选择-石蜡切片技术”,简称“透视选择法”,可以从向日葵^[11]培养30d的材料中筛选出具胚状体的胚珠,多数空胚珠被淘汰,大大减轻了切片的工作量;

③“爱氏苏木精整体染色-冬青油透明技术”,简称“冬青油透明法”,使向日葵、烟草、水稻等培养初期胚珠的鉴别得以简化,所观察的胚珠无需切片,对于需要着重研究的材料还可在整体观察后进行石蜡切片^[11,61]。

4 展望

未受精胚珠与子房培养在多种植物中获得成功,表明它有希望成为与花药培养并行不悖的技术而在植物改良中发挥作用。对雄性不育的植物^[9,48],未受精胚珠与子房培养可能提供一条产生单倍体的有效途径,在单倍体育种方面有较好的应用前景。未受精胚珠与子房培养还可用于植物的基因转化^[62],通过向未受精子房显微注射外源基因,外源DNA具有较高的转化率,较容易形成再生植株。

参考文献

- [1] Hu S Y (胡适宜). Embryology of Angiosperms [M]. Beijing: Higher Education Press, 1982. 209-211. (in Chinese)
- [2] Zhou C (周嫦), Yang H Y (杨弘远). *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of *Oryza sativa* L. [J]. Acta Genet Sin (遗传学报), 1980, 7(3):287-288. (in Chinese)
- [3] Zhou C (周嫦), Yang H Y (杨弘远). Studies on the *in vitro* induction of callus from embryo sacs of rice [J]. Hereditas (遗传), 1981, 3(5):10-12. (in Chinese)
- [4] Zhou C (周嫦), Yang H Y (杨弘远), Tian H Q (田惠桥), et al. Culture of unpollinated ovaries in rice [J]. J Wuhan Univ (Nat Sci) (武汉大学学报自然科学版), 1983, (4):146-153. (in Chinese)
- [5] Kuo C S (郭仲琛). The preliminary studies on culture of unfertilized ovary of rice *in vitro* [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1982, 24(1):33-38. (in Chinese)
- [6] Pan L (潘莉), Zheng Q J (郑奇君). Pathways and factors affecting haploid plant production from unpollinated ovaries of *Nicotiana tabacum* L. [J]. Acta Agri Univ Henan (河南农业大学学报), 1999, 33(1):48-52. (in Chinese)
- [7] Wu B J (吴伯骥), Cheng K C (郑国谔). Cytological and embryological studies on haploid plant production from cultured unpollinated ovaries of *Nicotiana tabacum* L. [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1982, 24(2):125-129. (in Chinese)
- [8] Miyoshi K, Asakura N. Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*) [J]. Plant Cell Rep, 1996, 16:1-5.
- [9] Van Geyt J, Speckmann Jr G J, D'Halluin K, et al. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1987, 73:920-925.
- [10] Doctrinal M, Sangwan R S, Sangwan-Norreel B S. *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1989, 17:1-12.
- [11] Yan H (阎华), Zhou C (周嫦), Yang H Y (杨弘远). Experimental studies on several factors affecting unfertilized ovule culture in sunflower [J]. J Wuhan Bot Res (武汉植物学研究), 1988, 6(4):319-326. (in Chinese)
- [12] 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* L.) [J]. Euphytica, 1990, 47:241-247.
- [13] Geoffriau E, Kahane R, Rancillac M. Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.) [J]. Euphytica, 1997, 94:37-44.
- [14] Bohanec B, Jakše M. Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions [J]. Plant Cell Rep, 1999, 18:737-742.
- [15] Bohanec B, Jakše M, Ihan A, et al. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants [J]. Plant Sci, 1995, 104:215-224.
- [16] Castillo A M, Cistué L. Production of gynogenic haploids of *Hordeum vulgare* L. [J]. Plant Cell Rep, 1993, 12:139-143.

- [17] Huang Q F (黄群飞), Yang H Y (杨弘远), Zhou C (周嫦). Embryological observations on ovary culture of unpollinated young flowers in *Hordeum vulgare* L. [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1982, 24(4):295-300. (in Chinese)
- [18] Zhu Z C(祝仲纯), Wu H S(吴海珊), An Q K(安庆坤). Study on the culture of unpollinated ovaries of *Nicotiana tabacum* and its cytology [J]. Acta Genet Sin (遗传学报), 1984, 11(4):281-287. (in Chinese)
- [19] Pan L (潘莉), Yang T Z (杨铁钊). Studies on the induction of embryoid from unpollinated ovaries of *Nicotiana tabacum* L. [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin (西北植物学报), 2000, 20(1):59-63. (in Chinese)
- [20] Muren R C. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion [J]. Hort Sci, 1989, 24(5):833-834.
- [21] Musial K, Bohanec B, Przywara L. Embryological study on gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.) [J]. Sex Plant Reprod, 2001, 13:335-341.
- [22] Campion B, Alloni C. Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1990, 20:1-6.
- [23] Gu Z P (谷祝平), Cheng K C (郑国锟). *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of lily and its embryological observations [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1983, 25(1):24-28. (in Chinese)
- [24] Huang G Z (黄国中), Gu M G (谷明光). *In vitro* production of parthenogenetic seeds from the unpollinated ears of maize [J]. Acta Genet Sin (遗传学报), 1995, 22(3):230-238. (in Chinese)
- [25] Ao G M (敖光明), Zhao S X (赵世绪), Li G H (李广华). *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of corn (*Zea mays* L.) [J]. Acta Genet Sin (遗传学报), 1982, 9(1):281-283. (in Chinese)
- [26] Gémes-Juhász A, Balogh P, Ferenczy A, et al. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Plant Cell Rep, 2002, 21:105-111.
- [27] Yan H (阎华), Yang H Y (杨弘远). An ultrastructural study on the *in vitro* parthenogenesis in sunflower [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1989, 31(1):1-6. (in Chinese)
- [28] Yan H (阎华), Wu Y (吴燕), Chen X M (陈小民), et al. Microscopical observations on the embryoid formation in cultured unfertilized ovaries of *Helianthus annuus* L. [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1985, 27(1):13-18. (in Chinese)
- [29] Yan H (阎华), Dong J (董健), Zhou C (周嫦), et al. Regulation of *in vitro* parthenogenesis and somatic proliferation in sunflower by several factors [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1987, 29(6):580-587. (in Chinese)
- [30] Gürel S, Gürel E, Kaya Z. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) [J]. Plant Cell Rep, 2000, 19:1155-1159.
- [31] Zhou C (周嫦), Yang H Y (杨弘远). *In vitro* embryogenesis in unfertilized embryo sacs of *Oryza sativa* L. [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1981, 23(3):176-180. (in Chinese)
- [32] Tian H Q (田惠桥). The abnormal development of embryo sacs during cold treatment and ovary culture in *Oryza sativa* L. [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin (西北植物学报), 1983, 3(1):61-64. (in Chinese)
- [33] Metwally E I, Moustafa S A, El-Sawy B I, et al. Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1998, 52:117-121.
- [34] Puddephat I J, Robinson H T, Smith B M, et al. Influence of stock plant pretreatment on gynogenic embryo induction from flower buds of onion [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1999, 57:145-148.
- [35] Li W M (李伟民), Zhang B (张彬). *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of *Coix lacrymajobi* L. [J]. Hereditas (遗传), 1984, 6(3):5-6. (in Chinese)
- [36] Jiang S L (蒋淑丽), Zheng S J (郑泗军), Hong C X (洪彩霞), et al. Effects of NH_4^+ concentration on fiber development from unfertilized cotton ovules *in vitro* [J]. J Zhejiang Univ (Agri & Life Sci) (浙江大学学报农业与生命科学版), 1999, 25(4):353-356. (in Chinese)
- [37] Hua L (华琳), Yang H Y (杨弘远). Regeneration of plantlets *in vitro* cultured unfertilized ovules of sunflower (*Helianthus annuus* L.) [J]. J Wuhan Bot Res (武汉植物学研究), 1991, 9(3):299-300. (in Chinese)
- [38] Gu Z P (谷祝平), Cheng K C (郑国锟). *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of highland barley [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1984, 26(5):549-551. (in Chinese)
- [39] Martínez L E, Agüero C B, López M E, et al. Improvement of *in vitro* gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines [J]. Plant Sci, 2000, 156:221-226.
- [40] Wang C C (王敬驹), Kuang B J (匡柏健). Induction of haploid plants from the female gametophyte of *Hordeum vulgare* L. [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1981, 23(4):329-330. (in Chinese)
- [41] Jakše M, Bohanec B, Ihan A. Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (*Allium cepa* L.) cultivars and analysis of regenerants [J]. Plant Cell Rep, 1996, 15:934-938.
- [42] Wu K X (吴克贤), Xu M Z (徐妙珍). Induction of maternal haploid plants from unpollinated ovaries of poplar *in vitro* [J]. Acta Genet Sin (遗传学报), 1984, 11(1):47-51. (in Chinese)
- [43] Zheng S J (郑泗军), Jiang S L (蒋淑丽), Hong C X (洪彩霞), et al. Effects of carbohydrate sources and genotypes on *in vitro* fiber development from unfertilized cotton ovules [J]. Acta Gossypii Sin (棉花学报), 1996, 8:301-304. (in Chinese)
- [44] Tian H Q (田惠桥), Yang H Y (杨弘远). Synergid apogamy and egg cell anomalous division in cultured ovaries of *Oryza sativa* L. [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1983, 25(5):403-408. (in Chinese)
- [45] Tian H Q (田惠桥), Yang H Y (杨弘远). Morphogenetic aspects of gynogenetic embryoid and callus in ovary culture of *Oryza sativa* L. [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1984, 26(4):372-375. (in Chinese)
- [46] Li G M (李国民), Yang H Y (杨弘远). Further embryological studies on the *in vitro* apogamy in *Oryza sativa* L. [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1986, 28(3):229-234. (in Chinese)
- [47] He C P (何才平), Yang H Y (杨弘远). On the stability of synergid

- apogamy in rice ovary culture and its developmental conditions [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 1988, 6(3):203-208. (in Chinese)
- [48] Tao Z R (陶自荣), Liu M S (刘敏颂), Zhu Z C (祝仲纯). Induction of dihaploid plants from unpollinated ovaries of potato *in vitro* [J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1988, 15(5):329-334. (in Chinese)
- [49] Tian H Q (田惠桥), Yang H Y (杨弘远). Haploid embryogeny and plant regeneration in unpollinated ovary culture of *Allium tuberosum* [J]. *Acta Biol Exp Sin* (实验生物学报), 1989, 22(2): 139-143. (in Chinese)
- [50] Zhu Z C (祝仲纯), Liu Z Y (刘振岳), Wu H S (吴海珊), et al. Development of embryoid from the unpollinated ovary of *Nicotiana tabacum* cultured *in vitro* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1981, 23(6):499-501. (in Chinese)
- [51] Xiao S Y (肖三元), Chen Z H (陈正华). A preliminary report on the regenerated plants from unpollinated ovaries and ovules of *Hevea brasiliensis* [J]. *J Yunnan Trop Crop Sci* (云南热作科技), 1994, 17(3):18-20. (in Chinese)
- [52] Yang X Q (杨晓泉), Fu J R (傅家瑞). The origin of callus and embryoid in cultured unfertilized ovules of *Hevea brasiliensis* [J]. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 1997, 5(4):65-68. (in Chinese)
- [53] M6l R. *In vitro* gynogenesis in *Melandrium album*: from parthenogenetic embryos to mixoploid plants [J]. *Plant Sci*, 1992, 81:261-269.
- [54] M6l R, Betka A, Wojciechowicz M. Induction of autonomous endosperm in *Lupinus luteus*, *Helleborous niger* and *Melandrium album* by *in vitro* culture of unpollinated ovaries [J]. *Sex Plant Reprod*, 1995, 8:273-277.
- [55] Wijowska M, Kuta E, Przywara L. Autonomous endosperm induction by *in vitro* culture of unfertilized ovules of *Viola odorata* L. [J]. *Sex Plant Reprod*, 1999, 12:164-170.
- [56] Pan L (潘莉), Liu Z C (刘宗才), Xi J A (喜进安). The effects of exogenous hormone on cultured unpollinated ovaries of *Nicotiana tabacum* L. [J]. *Acta Agri Univ Henan* (河南农业大学学报), 1998, 32(2):167-170. (in Chinese)
- [57] Zhu Z C (祝仲纯), Wu H S (吴海珊). *In vitro* production of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum* [J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1979, 6(2):181-183. (in Chinese)
- [58] Zhu Z C (祝仲纯), Wu H S (吴海珊). Induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of *Nicotiana tabacum* cultured *in vitro* [J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1981, 8(1):63-65. (in Chinese)
- [59] Wei Z Y (魏正元), Yang H Y (杨弘远). Histochemical studies on *in vitro* parthenogenesis in *Helianthus annuus* L. [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1986, 28(2):117-122. (in Chinese)
- [60] Campion B, Bohanec B, Javornik B. Gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.): evidence of their homozygosity [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91:598-602.
- [61] Yang H Y (杨弘远). The use of a whole stain-clearing technique for observations on embryo sac, embryo, endosperm and embryoid [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1986, 28(6):575-581. (in Chinese)
- [62] Luo Z X (罗忠训), Wan S Q (万树青), Xia G X (夏桂先), et al. Study on microinject exogenous genes into unpollinated ovaries in *Oryza sativa* L. [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 1987, 32(11): 863-865. (in Chinese)