

(续接 2006 年第 10 期第 43 页)

# 影响油菜游离小孢子培养再生因素的研究进展

黄先群<sup>1</sup> 蒋敏华<sup>1,2</sup> 毛堂芬<sup>3</sup> 李 丽<sup>1</sup> 董颖苹<sup>3</sup> 徐 涵<sup>4</sup>

(1. 贵州省农业生物技术重点实验室 贵阳 550006;

2. 南京农业大学生命科学学院生化与分子生物学 江苏南京 210000;

3. 贵州省农科院生物技术研究所 贵阳 550006; 4. 法国图卢兹综合科学研究所 R IT-AR D)

## 7 胚的培养及植株再生

### 7.1 培养方式

经过高温处理后的小孢子,在 24~25℃ 黑暗条件下静置培养 2~3 周,并保持良好的通气状况,促进胚的形成。胚龄是指从接种到胚被转移至固体培养基上,这段时间的长短<sup>[42]</sup>。诱导植株再生最适合的胚龄是 27 d,0.2~0.3 cm 大小的胚比 0.6~0.8 cm 的胚好<sup>[59]</sup>。当肉眼可见胚状体(球状至鱼雷状早期)后,可以采用以下两种方法进行培养:

(1) 静置培养:将胚直接转入蔗糖浓度为 2% 的固体培养基培养<sup>[35, 48, 59]</sup>(培养基类型有 B<sub>5</sub><sup>[16, 20, 28, 44]</sup>、MS<sup>[32, 49, 72]</sup>、1/2 MS 或 1/2 B<sub>5</sub><sup>[21, 35, 57]</sup>)、22~25℃,和 16 h 光周期条件下培养箱以诱导植株再生。培养基成分和形式对植株再生也很重要,有研究表明,1/2 MS 或 1/2 B<sub>5</sub> 培养基比 MS 或 B<sub>5</sub> 培养基效果要好<sup>[35]</sup>;也有报道认为,胚从 NLN 液体培养基转到半固体 B<sub>5</sub> 培养基培养 3 d 后再转至固体 B<sub>5</sub> 培养基,比从 NLN 液体培养基直接转到固体培养基的培养方式相对较好,可提高胚再生频率<sup>[40]</sup>。

胚培养 5~10 d,如同种子萌发一样,子叶颜色由黄变绿,两极萌动,胚根伸长,并长满白色根毛。进一步培养观察,胚发育成具有 2~4 片真叶的小植株,但有的胚形成茎状绿色组织。这是由于心型胚、鱼雷型胚和子叶胚具有下胚轴结构,形成胚根;另一端形成常具有不完全的二裂片结构,形成胚芽。而球型胚状体和畸型胚状体转移到培养基后,分化不完全,有的只长根不分化苗,有的颜色变褐而死,有的形成白化苗。因此胚状体发育成植株的频率取决于胚状体的类型<sup>[52]</sup>。

(2) 振荡培养:当肉眼可见胚时(球状至鱼雷状早

期),添加或更换新鲜的 NLN 培养基,将胚转移至温度为 24~25℃、转速为 45~50 r/min<sup>[25, 32, 42, 57, 64]</sup>或 60~120 r/min<sup>[16, 20, 40, 47, 72]</sup>条件下暗培养;或在同样温度、40~80 r/min 转速下 12~16 h 光照下培养<sup>[16, 28, 44, 48, 49]</sup>。振荡培养 7~10 天后,胚直接转入固体培养基培养中培养,培养条件同静置培养一致。

有研究认为,振荡培养有利于胚发育,能改善培养基内的通气状况,降低有害代谢物质在胚状体周围的累积,减少畸形胚比例,有助于培养体的同步发育,显著促进幼胚的存活并提高幼胚的质量,从而提高正常的再生植株频率<sup>[42, 65, 78]</sup>。比较静态和振荡培养结果,振荡培养的第 3 周便可获得 41% 的双子叶胚,而静态培养仅为 16%。静态培养获得的胚为灰白色,透明状,振荡培养的胚为黄色、不透明<sup>[48]</sup>。

此外,振荡培养前的转瓶方法,用三角瓶代替培养皿,增加了小孢子的培养空间,改善了瓶内通气条件;同时,添加或更换新鲜培养基,给小胚正常发育补充了新的营养,可使培养中期死亡小孢子解离产生的腐败物质得到去除和稀释,有利于子叶胚的形成,较好地保证了小孢子的正常分裂和胚状体的发育,为弱小的胚状体向子叶胚转化创造了较为有利的生长条件,大大提高了胚状体的诱导频率,从而为绿色子叶胚的高频发生创造了条件<sup>[25, 33]</sup>。从小孢子培养初期更换培养液与不换培养液处理可以看到,换培养液后胚状体产量明显高于不换培养液处理,胚状体产量提高了 0.4~2.6 倍。

### 7.2 低温处理

有研究报道,在胚转移到固体培养基后进行冷击处理,能够促进胚的萌发与胚的直接成苗率<sup>[25, 32, 35, 40, 54]</sup>。余凤群和刘后利报道<sup>[62]</sup>,胚转到固体培养基上经 10℃ 低温培养 10 d 可提高直接成苗率;王汉中等认为<sup>[25]</sup>,胚在 4℃ 冷击处理 10 d 的直接成苗率比未处理 ck 的直接成苗率提高了 2~2.6 倍,胚萌发率与植株再生率最高分别达到了 90.0% 和 58.46%。这些研究表明,对胚的低温诱导是一种很有

收稿日期:2006-07-27。

基金项目:贵州省国际科技合作重点项目[黔科合外 G 字(2005)400107 号];贵州省农业动植物育种专项项目[黔农育专字(2006)027 号];教育部春晖计划(2006 年)基金资助。

作者简介:黄先群(1958~)女,研究员,博士;主要从事农作物生物技术研究。

效的提高植株再生能力的简便、实用方法。

### 7.3 激素

在固体培养基中,有的添加  $GA_3$ <sup>[25,44,48]</sup>、2,4-D 或 NAA<sup>[20]</sup> 进行培养。祁永琼等报道<sup>[44]</sup>,将鱼雷形、子叶形胚转移到附加  $GA_3$  0.1 mg/L,蔗糖浓度为 2% 的固体培养基上,约有 80% 的胚状体再生出植株,其它幼小的胚需要多次继代培养成鱼雷形、子叶形胚。余凤群和刘后利报道<sup>[62]</sup>,1/2MS+0.1 mg/L 6-BA 较  $B_5$ +0.1 mg/L  $GA_3$  利于胚直接发芽。王亦菲等<sup>[42]</sup> 的研究结果表明,在 MS、 $B_5$  基本培养基附加不同浓度的 6-BA、KT、 $GA_3$ ,结果以  $B_5$  附加  $GA_3$  0.5 mg/L,蔗糖浓度为 2% 为宜;MS 培养基上的胚多数不能分化,其余的为畸形苗;在  $B_5$  培养基中附加 0.5 mg/L 6-BA,产生的分化苗为玻璃苗,而附加 KT 则胚不能分化。李超等认为<sup>[52]</sup>,将胚接种于含有 0.05 mg/L 2,4-D 和 0.01 mg/L 6-BA 的 MS 培养基中培养,愈伤组织能快速分化形成不定根和丛芽。然而,和江明等认为<sup>[11]</sup>,胚诱导出来以后,将其转入无激素  $B_5$  培养基中,有利于胚的进一步增大,直接再生出植株或经次生胚继代培养再生植株。

### 7.4 其它措施及添加物

培养基的琼脂浓度对胚的直接成苗有较大影响,在培养基琼脂浓度为 1.2% 和 1.5% 的处理中,胚的直接成苗率比琼脂浓度为 0.8% 处理显著提高;而琼脂浓度为 0.6% 的处理,未能直接成苗;培养基琼脂浓度高于 1.2% 可提高胚的直接成苗率,并以 1.5% 琼脂浓度效果较好<sup>[25]</sup>。当胚在含琼脂 1.5% 的培养基上培养时,会很快发育成植株,高琼脂含量还可降低植物组织的玻璃组织化,这种现象曾在早期低琼脂含量的试验中观察到<sup>[72]</sup>。

胚部分干燥能提高油菜小孢子培养胚萌发与植株再生率,而且效果与干燥时间有关。胚干燥处理 1 d 或 2 d 能明显促进胚萌发与植株再生。切除胚状体子叶,可有效地促进胚萌发与植株再生。切除全部子叶具有更好的效果<sup>[35]</sup>。

另外,在研究中还发现 L-脯氨酸具有促进小孢子脱分化启动、使小孢子首次有丝分裂发生时间提前作用,这可能与脯氨酸能提高小孢子的抗逆性、增强小孢子的活力有关<sup>[42]</sup>;20 mg/L 浓度的多菌灵和链霉素可以提高胚状体的成苗率等<sup>[21]</sup>。

## 8 小孢子的诱变

用于油菜离体小孢子或小孢子胚产生突变的方法有化学和物理的方法。常用的诱变剂有叠氮化钠 (so-

dium azide,  $NaN_3$ )、乙基亚硝基尿 (ethylnitrosourea, ENU) 和甲基磺酸乙酯 (ethylmethane sulfonate, EMS) 等,物理诱变剂如 X、射线和 UV 紫外线<sup>[82]</sup>。

小孢子培养有利于在单细胞单倍体水平上进行抗性突变体筛选和新种质资源的选育。如油菜菌核病菌能分泌毒素,特别是毒素类似物草酸在致病性中的作用已得到肯定和证实,这就为直接在单细胞单倍体水平进行抗菌核病材料的筛选创造了有利条件,可以在培养时直接将草酸作为抗性诱变剂进行筛选<sup>[8,9,46]</sup>。这不仅简化了筛选程序,也有助于直接将小孢子培养技术应用于油菜抗菌核病的育种工作<sup>[8]</sup>。分离小孢子最佳应用诱变剂的时期是小孢子刚分离时的单核期,以尽量使胚纯合而避免产生杂合体。诱变处理必须首先建立以小孢子出胚产量为依据的半致死曲线 (LD 50)。而材料不同半致死时间也不同,如 UV 的半致死时间从 6~20 s 不等<sup>[83-86]</sup>。Zhang 等<sup>[87]</sup> 用经 UV 诱导过的分离小孢子胚状体,在含 30%~40% 根腐菌的培养基中选择培养,后代筛选出抗根腐病的突变体材料。在甘蓝型油菜中,亲本硫苷含量为 99  $\mu\text{mol/L}$ ,小孢子用 UV 处理后,突变体最低含量为 16  $\mu\text{mol/L}$ ,降低了约 5 倍。在埃塞俄比亚芥中,亲本平均硫苷含量为 80.6  $\mu\text{mol/L}$ ,小孢子经 UV 诱导后,获得了平均硫苷含量为 37.5  $\mu\text{mol/L}$  的突变体,降低了近一半<sup>[86]</sup>。

射线对油菜离体小孢子胚的发生和发育均有很大的抑制作用,40 Gy 可作为小孢子诱变的参照剂量。采用 X 射线 80~120 Gy 较适宜油菜小孢子诱变,120 Gy 以上的 X 射线对甘蓝型油菜小孢子胚的发生有显著的阻碍作用<sup>[10]</sup>。Swanson 等<sup>[12]</sup> 用射线和乙基—亚硝基脲诱变甘蓝型油菜小孢子和原生质体获得了耐除草剂材料。

和江明等报道<sup>[7]</sup>,用 EMS 诱变甘蓝型油菜的小孢子获得了高油酸 (80.3%) 的甘蓝型油菜;EMS 的半致死剂量 (LC 50) 处理时间为 24 h,处理浓度为 2.5 mmol/L。Barro 等<sup>[88]</sup> 用 EMS 诱变埃塞俄比亚芥小孢子,使再生植株的种子芥酸含量变异很大。

此外,也可直接将分离的小孢子在含有除草剂的培养基中筛选、萌发,如用 0.25 mmol/L 草甘膦筛选抗草甘膦突变体,用类似的办法也可以进行抗菌核病和抗根腐病等抗病突变材料的筛选<sup>[89]</sup>。刘勇等<sup>[8]</sup>、陈微等<sup>[90]</sup> 用草酸为选择压筛选油菜抗菌核病突变材料均获得成功<sup>[8,90]</sup>。石淑稳等通过化学诱变方法从突变体中找到甘蓝型油菜长角果和矮秆突变体。Meller 等<sup>[91]</sup> 用 ABA 作为小孢子培养选择压进行高油酸和低

油酸胚状体的筛选等。

## 9 油菜游离小孢子培养体系

目前,大多数文献报道的油菜游离小孢子培养体系大致如下:

取主花序第 1 朵花开后 3~7 d, 2~4 mm 花蕾 (主轴和一次分支) 4 低温预处理 1~3 d) 镜检, 确定单核期 (或二核早期) 小孢子占 70% 以上的花蕾消毒、破碎、离心、分离小孢子 (B<sub>5</sub>-13 洗液) NLN-16 (或 NLN-13%) 培养基 (含 10~50 mg/L 秋水仙碱)、30~35 恒温箱中暗培养 24~48 h 用 NLN-13 培养液洗 1 次 25 左右、NLN-13 培养液中暗培养约 3 周 (培养密度 1~2 蕾 /ml) 当肉眼可见胚时, 移至摇床暗培养 7~10 d (50~80 r/min, 24~26 ) 小孢子胚在固体培养基上发育 形成再生双单二倍体植株。

## 10 展 望

油菜小孢子胚胎发生、双单倍体技术为油菜单倍体育种提供了实用、高效的生物技术平台。但许多品种, 特别是生产上需要改良应用的品种仍然表现出低的诱导率, 有些甚至不能诱导产生 DH 群体。为克服小孢子发生阻遏型品系诱导率低的困难, 法国图卢兹综合科学研究所和中国农科院已分别启动了植物小孢子胚胎发生的代谢组学研究, 力求以分子生物学技术克服这一困难。另外, 植物小孢子胚胎发生的分子标记、基因芯片和蛋白质芯片技术也将为克服小孢子胚胎发生的障碍提供有力的分子生物学工具。相信在不久的将来, 小孢子胚胎发生的诱导技术将会极其广泛地应用于油菜及其它作物的单倍体育种中。

### 参考文献

- 孙志栋, 王为德, 毛根富, 等. 作物单倍体研究和应用进展. 网刊, 2001, 5 (1): 376
- Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *B. rassica napus* L. [J]. *Z Pflanzenphysiol*, 1982, 105: 427 - 434.
- 陈正华, 寸守铄, 陈之征, 等. 用细胞工程技术选育油菜“双低”新品种. 植物细胞工程与育种, 北京工业大学出版社出版. 1990
- 吴江生, 石淑稳, 周永明, 等. 甘蓝型双低油菜品种华双 3 号的选育和研究. 华中农大学学报, 1999, 18 (1): 1~4.
- 王汉中, 刘贵华, 郑元本, 等. 抗菌核病双低油菜新品种中双 9 号的选育. 中国油料作物学报, 2002, 24 (4): 71~73.
- 何冬丽, 杨光圣. 甘蓝型油菜单倍体离体诱变及其效应的 AHP 分子标记检测. 中国油料作物学报, 2004, 26 (2): 10~14
- 和江明, 王敬乔, 陈薇, 等. 用 EMS 诱变和小孢子培养快速获得甘蓝型油菜高油酸种质材料的研究. 西南农业学报, 2003, 16 (2): 34~36
- 刘勇, 刘红雨, 曾正宜. 利用小孢子培养技术筛选油菜抗菌核病材料. 西南农业学报, 1997, 10 (1): 108~112
- 黄剑华, 陆瑞菊, 周志疆, 等. 应用小孢子和花药培养技术筛选油菜抗菌核病材料. 植物生理学通讯, 2001, 37 (3): 226~227.
- 石淑稳, 周永明, 王晨, 等. 射线和 X 射线对甘蓝型油菜小孢子胚状体再生的影响. 中国油料作物学报, 2004, 26 (2): 6~9.
- 和江明, 王敬乔, 陈薇, 等. EMS 对甘蓝型油菜离体小孢子胚胎发生能力的影响. 西南农业学报, 2004, 17 (6): 690~693.
- Swanson E B, Coumans M P, Brown G L, et al. The characterization of herbicide tolerant plants in *B. rassica napus* L. after in vitro selection of microspores and protoplasts [J]. *Plant Cell Rep*, 1988, 7: 83 - 87.
- 王新发, 王汉中, 刘贵华, 等. 具双价基因的甘蓝型油菜游离小孢子的遗传转化. 农业生物技术学报, 2004, 12 (2): 138~142
- 陈军, 王兰岚, 刘澄清, 等. 用激光微束穿刺法转化甘蓝型油菜小孢子的研究. 激光生物学报, 1998, 7 (2): 103~107.
- 余凤群. 芸薹属植物未成熟小孢子培养技术的研究和应用. 中国油料, 1994, 6 (2): 70~73
- 周永明, Scarth R. 甘蓝型油菜和白菜型油菜种间杂种的小孢子培养. 植物学报, 1995, 37 (11): 848~855.
- 饶勇, 徐涵, 毛堂芬, 等. 单倍体育种技术在油菜育种材料创新上的应用研究 I 甘蓝型油菜游离小孢子胚状体的诱导发生. 种子, 2003, 22 (1): 66~67.
- Gland A, Lichter R, Schweiger H G. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore culture of *B. rassica napus* L. [J]. *J Plant Physiol*, 1988, 132: 613 - 617.
- 张凤兰, 高田义人. 甘蓝型油菜小孢子培养胚发生能力的遗传分析. 华北农学报, 2001, 16 (1): 27~32
- 朱家成, 文雁成, 张书芬, 等. 甘蓝型油菜游离小孢子培养技术研究. 河南农业科学, 2001 (11): 4~5.
- 李秀萍, 杜德志. 春性甘蓝型油菜小孢子培养技术初探. 青海农业科技, 1997 (3): 17~19.
- 周永明, Scarth R. 甘蓝型油菜和芥菜型油菜杂种小孢子培养获得再生植株. 作物学报, 1996, 22 (4): 399~403.
- 余凤群, 刘后利. 供体材料和培养基成份对甘蓝型油菜小孢子胚状体产量的影响. 华中农业大学学报, 1995, 14 (4): 327~332
- Ohkawa Y, Nakajima K, Keller W A. Ability to induced embryoid in *B. rassica napus* cultivars [J]. *Japan J Breed*, 1987, 37 (2): 44 - 451.

- 25 王汉中,王新发,刘贵华,等.甘蓝型杂交油菜亲本的小孢子培养技术研究.中国油料作物学报,2004,26(1):1~4.
- 26 Mathias R. Production of haploids in oilseed rape (*B. rassaica napus* L.) by improved microspore culture. 7th Intern Rape-seed Cong., Poland, 1988: 158~161.
- 27 Lionneton E, Beuret W, Delaitre C, et al. Improved microspore culture and doubled 2 haploid plant regeneration in brown condiment mustard (*B. rassaica juncea*) [J]. Plant Cell Reports, 2001, 20: 126~130.
- 28 顾宏辉,张冬青,周伟军.换培养液和秋水仙碱处理对白菜型油菜小孢子胚胎发生的影响.作物学报,2004,30(1):78~81.
- 29 Ferrie AMR, Epp DJ, Keller WA. Evaluation of *B. rassaica rapa* L. genotypes for microspore culture response and identification of a highly embryogenic line [J]. Plant Cell Reports, 1995, 14: 580 - 584.
- 30 Cao M Q, Li Y, Liu F, et al. Application of anther culture and isolated microspore culture to vegetable crop improvement [J]. Acta Horticulturae, 1995, 392: 27 - 38.
- 31 宋来强,贺兴文,邹晓芬,等.甘蓝型油菜小孢子胚状体诱导的主要影响因素研究.江西农业学报,1998,10(2):66~69.
- 32 张冬青,顾宏辉,张尧峰,等.双低油菜浙双 72 的小孢子培养与植株再生研究.浙江农业学报,2003,15(4):219~222.
- 33 胡武强,朱彦涛.甘蓝型油菜小孢子子叶胚的高频发生.陕西农业科学,1997(4):8~9.
- 34 刘泽,周永明,石淑稳,等.甘蓝型油菜离体小孢子胚胎发生能力的遗传分析.作物学报,2000,26(1):104~109.
- 35 张国庆,许玲,周伟军.甘蓝型油菜小孢子诱导胚冷击、干燥与去子叶处理提高植株再生率研究.食物与能源安全战略中的中国油料.中国作物学会油料作物专业委员会第五届学术年会论文集,中国作物学会油料作物专业委员会编.上海:中国农业科学出版社,2004(11),285~291.
- 36 Aijisaka H, Kuginuki Y, H da KShiratori, et al. Mapping of loci affecting the cultural efficiency of microspore culture of *B. rassaica rapa* L. *Syn campestris* L. using DNA polymorphism. Breed Sci, 1999, 49: 187 - 197.
- 37 Truco MJ, Quiros CF. Structure and organization of the B genome based on a linkage map in *B. rassaica nigra*. Theor Appl Genet, 1994, 89: 590 - 598.
- 38 Cloutler S, Cappadocia M, Landry BS. Study of microspore-culture responsiveness in oilseed rape (*B. rassaica napus* L.) by comparative mapping of a F<sub>2</sub> population and two microspore-derived populations. Theor Appl Genet 1995, 91: 841 - 848.
- 39 Zhang FL, Takahata Y. Inheritance of microspore embryogenic ability in *B. rassaica* crops [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 254 - 258.
- 40 李恂,官春云,陈社元,等.油菜小孢子培养和双单倍体育种研究.影响甘蓝型油菜和芥菜型油菜种间杂种胚产量的因素.作物学报,2003,29(5):744~749.
- 41 官春云.油菜小孢子培养和双单倍体育种研究 I 供体植株和小孢子密度对小孢子培养的影响.作物学报,1995,21(6):665~670.
- 42 王亦菲,陆瑞菊,孙月芳,等.大田油菜游离小孢子培养高频胚状体诱导及植株再生.中国农学通报,2002,18(1):20~23.
- 43 朱彦涛,李殿荣,杨淑慎.低温预处理和基因型对甘蓝型油菜小孢子胚胎发生的影响.西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(5):88~94.
- 44 祁永琼,林良斌,董娜,等.甘蓝型油菜小孢子再生体系的优化研究.云南农业大学学报,2005,20(1):6~10.
- 45 李恂.油菜小孢子培养研究进展.食物与能源安全战略中的中国油料——中国作物学会油料作物专业委员会第五届学术年会论文集,中国作物学会油料作物专业委员会编.上海:中国农业科学出版社,2004(11),351~355.
- 46 刘勇,刘红雨,曾正宜.甘蓝型油菜 (*B. rassaica napus*) 小孢子胚状体的诱导和培养.西南农业学报,1997,10(1):1~5.
- 47 石淑稳,周永明,吴江生,等.甘蓝型油菜小孢子培养、染色体加倍、试管苗继代越冬和田间移栽配套技术的研究及其在油菜育种中的应用.中国农学通报,2001,17(2):57~59.
- 48 Polsoni L. 甘蓝型油菜小孢子批量培养技术——突变体选择研究.中国油料,1989(3):86~87.
- 49 牛应泽,刘玉珍,汪良中,等.人工合成甘蓝型油菜游离小孢子培养及其植株再生研究初报.四川农业大学学报,1999,17(2):167~171.
- 50 陈军,陈正华,刘澄清,等.甘蓝型油菜游离小孢子培养的胚胎发生.遗传学报,22(4):307~315.
- 51 余凤群,傅丽霞,刘后利,等.油菜小孢子胚发生的超微结构和胚状体形态.西北植物学报,1997,17(2):181~186.
- 52 李超,饶勇,陈静,等.单倍体育种技术在油菜育种材料创新上的应用研究.胚状体培育及试管苗越冬种子.种子,2004,23(6):68~70.
- 53 周伟军,唐桂香,张国庆,等.甘蓝型油菜小孢子秋水仙碱处理提高双单倍体频率研究.中国农业科学,2002,35(4):410~414.
- 54 周伟军,毛碧增,顾宏辉,等.秋水仙碱及热击与低温诱导对油菜小孢子胚状体成苗率的影响.作物学报,2002,28(3):369~373.
- 55 Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *B. rassaica napus*. Z Pflanzenphysiol 1982, 105: 427 - 434.
- 56 Keller W. A., Armstrong K. C. 通过花药和小孢子培养产生甘蓝型油菜单倍体.国外农学-油料作物,1985(1):13~15.
- 57 顾宏辉,楼健,周伟军.秋水仙碱在油菜小孢子培养中的应用研究进展.中国油料作物学报,2003,25(2):103~106.
- 58 Chen Z Z, Snyder Z G. 采用甘蓝型油菜离体小孢子染色体加倍来提高双单倍体植株的生产效率.作物研究,1998(4):34~36.

- 59 刘雪平,刘志文,涂金星,等.甘蓝型油菜小孢子培养技术的几项改进.遗传,2003,25(4):433~436
- 60 Zhao J P, Simmonds D H, Newcomb W. High frequency production of doubled haploid plants of *B rassic a napus* cv Topas derived from colchicine-induced microspore embryogenesis without heat shock [J]. Plant Cell Reports, 1996, 15: 668 - 671.
- 61 Hansen N J P, Andersen S B. In vitro chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *B rassic a napus* microspore culture [J]. Euphytica, 1996, 88: 159 - 164.
- 62 余凤群,刘后利.提高甘蓝型油菜小孢子胚状体成苗率的某些培养因素研究.作物学报,1997,23(2):165~170
- 63 Iqbal MCM, Mollers C, Robbelen G Increased embryogenesis after colchicine treatment of microspore cultures of *B rassic a napus* L. J Plant Physiol, 1994, 143: 222 - 226
- 64 Mollers C, Iqbal M C M, Robbelen G Efficient production of doubled haploid *B rassic a napus* plants by colchicine treatment of microspores [J]. Euphytica, 1994, 75: 95 - 104.
- 65 田保明.油菜单倍体培养研究进展.中国农学通报,1994,10(5):26~30
- 66 Xu Han X, Jing H. C, Cheng X-F, Iwanowska A., Kieft H, Bergervoet JHW, Groot SPC, Bino RJ, van Lanmeren AAM. Polyploidization in embryogenic microspore cultures of *B rassic a napus* L. cv Topas enables the generation of doubled haploid clones by somatic embryogenesis Protoplasma, 1999, 208: 240 - 247.
- 67 王晨,吴江生,石淑稳,等.甘蓝型油菜离体小孢子染色体加倍及其基因型的反应.食物与能源安全战略中的中国油料中国作物学会油料作物专业委员会第五届学术年会论文集,中国作物学会油料作物专业委员会编,上海:中国农业科学出版社,2004(11):324~329.
- 68 石淑稳,周永明,吴江生.秋水仙碱处理油菜离体小孢子的染色体加倍效应.华中农业大学学报,2002,21(4):329~333.
- 69 石淑稳,吴江生,周永明,等.甘蓝型油菜小孢子单倍体二倍化技术的研究.中国油料作物学报,2002,24(1):4~5.
- 70 周伟军,毛碧增,唐桂香,等.甘蓝型油菜小孢子再生植株染色体倍数检测研究.云南农业大学学报,2002,20(1):6~10
- 71 Zaki M, Dickinson H. Modification of cell development in vitro: the effect of colchicine on anther and isolated microspore culture in *B rassic a napus* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 40: 255 - 270.
- 72 Mathias R. 用甘蓝型油菜离体小孢子培养胚状体的改良方法.农业新技术新方法译丛,1989,26(3):39~40
- 73 Chen Z Z, Snyder S, Fan Z G, et al Efficient production of doubled haploid plants through chromosome doubling of isolated microspores in *B rassic a napus* [J]. Plant Breeding, 1994, 113: 217 - 221.
- 74 郭世星,牛应泽,余学杰,等.活性炭对甘蓝型油菜 (*B rassic a napus* L.)小孢子胚胎发生的影响.种子,2005,24(7):37~39.
- 75 王蒂,冉毅东,王汉宁,等.不同培养基对甘蓝型油菜花药和花粉培养的效应比较.中国油料,1996,18(2):1~3.
- 76 余凤群,刘后利,付丽霞,等.甘蓝型油菜游离小孢子培养中挽救小胚状体的研究.华中农业大学学报,1995,14(6):522~526
- 77 石淑稳,李再云,刘后利.甘蓝型油菜与诸葛菜的杂种小孢子胚发生和小苗的形态.中国油料,1994,16(1):63~64
- 78 牛应泽,刘玉珍,郭世星.提高甘蓝型油菜游离小孢子产胚率的研究.西南农业学报,2002,15(1):24~27.
- 79 余凤群,傅爱汝,刘后利.甘蓝型油菜小孢子胚状体发生的细胞学观察.武汉植物学研究,1998,16(3):197~202
- 80 杨光圣,瞿波,傅廷栋.甘蓝型油菜显性细胞核雄性不育宜3A花药发育的解剖学研究.华中农业大学学报,1999,18(5):405~408
- 81 余凤群,刘后利.甘蓝型油菜几个品种花药发育的细胞学研究.中国油料,1988(4):23~25.
- 82 顾宏辉,张冬青,张国庆,等.油菜离体小孢子诱变育种研究进展.浙江农业学报,2003,15(5):318~322
- 83 Ahand I, Day JP, Macdonald MV, et al Haploid culture and UV mutagenesis in rapid cycling *B rassic a napus* for the generation of resistance to chlorosulfuron and *A ltemaria brassicicola* [J]. Annals of Botany, 1991, 67: 521 - 525.
- 84 Fletcher R, Coventry J, Kott LS Doubled haploid technology for winter and winter *B rassic a napus* [M]. Guelph, Ontario, Canada: OAC Publication, University of Guelph, 1998
- 85 Teresa CT, Laurencja S, Jan K An in vitro mutagenesis selection system for *B rassic a napus* L. [A] Proceedings of the 10th international rapeseed congress [C]. Canberra, Australia, 1999.
- 86 Barro F, Fernandez 2 Escobar J, De la Vega M, et al Modification of glucosinolate and erucic acid contents in doubled haploid lines of *B rassic a carinata* by UV treatment of isolated microspores [J]. Euphytica, 2002, 129: 1 - 6
- 87 Zhang FL, Takahata Y Microspore mutagenesis and in vitro selection for resistance to soft rot disease in Chinese cabbage (*B rassic a campestris* L. ssp. *pekinensis*) [J]. Breeding Science, 1999, 49: 161 - 166
- 88 Barro F, Fernandez J E, Dela MV, et al Doubled haploid lines of *B rassic a carinata* with modified erucic acid content through mutagenesis by EMS treatment of isolated microspores [J]. Plant Breeding, 2001, 120: 262 - 264.
- 89 Polsoni L, Kott LS, Beversdorf WD. Large scale microspore culture technique for mutation selection studies in *B rassic a napus* L. [J]. Canadian Journal of Botany, 1988, 66: 1 681 - 1 685.
- 90 陈微,李名扬,李宣源.离体茎尖诱变筛选油菜耐草酸变异体[J].西南农业学报,2001,14(2):31~33.
- 91 Meller C, R ücker B, Stelling D, et al In vitro selection for oleic and linoleic acid content in segregating populations of microspore derived embryos of *B rassic a napus* [J]. Euphytica, 2000, 112: 195 - 201.