

耐寒结球甘蓝小孢子培养及其发育过程

曾爱松¹ 高兵¹ 宋立晓¹ 张云霞¹ 李健琦² 严继勇^{1*}

(1. 江苏省农业科学院 蔬菜研究所,南京 210014;

2. 青岛常春藤作物科学有限公司,山东 青岛 266109)

摘要 以6份耐寒结球甘蓝杂交F₁为试验材料,研究其胚胎发生过程及胚胎发生的诱导条件,为耐寒甘蓝材料的小孢子培养,以及其他芸薹属小孢子胚胎体系的建立及优化提供理论依据。采用4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色方法对小孢子体内和体外的发育及胚胎发生过程、特征进行观察;NLN-13培养基中添加阿拉伯半乳糖(Arabinogalactan,AG)和阿拉伯半乳糖蛋白(Arabinogalactan-protein,AGP)对小孢子培养胚胎发生率的影响进行统计分析;小孢子体内正常发育方向是单核小孢子经历2次不对称核分裂后发育成三核成熟花粉,小孢子单核晚期对应的花蕾长度主要集中在3.5~4.5 mm;体外培养中,热胁迫(32.5℃)诱导小孢子从配子体发育途径向胚胎发生途径转换,只有少数胚性细胞最终发育成为胚状体;供试材料中有5份材料获得胚状体,材料间出胚量差异较大,其中‘寒玉37’出胚量最高,为每蕾22.5个;在NLN-13培养基中添加10 mg/L AG或10 mg/L AGP,可以促进耐寒甘蓝胚状体发生。32.5℃热胁迫1 d可有效诱导耐寒甘蓝小孢子培养中的胚胎发生,10 mg/L AG或10 mg/L AGP促进胚胎诱导。

关键词 耐寒甘蓝;小孢子培养;胚胎发生;发育途径

中图分类号 S 635

文章编号 1007-4333(2015)02-0086-07

文献标志码 A

Studies on isolated microspore culture and embryo developmental pathway in cold-tolerant white cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)

ZENG Ai-song¹, GAO Bing¹, SONG Li-xiao¹, ZHANG Yun-xia¹, LI Jian-qi², YAN Ji-yong^{1*}

(1. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. Qingdao Bioivy Crop Science Co. Ltd, Qingdao 266109, China)

Abstract Microspore embryogenesis and culture conditions which affected microspore-derived embryos were studied with six F₁ hybrids of white cabbage with cold tolerance. The aim was to construct and optimize microspore culture system of cold-tolerant white cabbage and other *Brassica* species hybrids. The microspores development and embryogenesis of six F₁ hybrids of the white cabbage *in vivo* and *in vitro* were investigated with 4',6-diamidino-2-phenylindol staining technique. The effects of arabinogalactan (AG) and arabinogalactan-protein (AGP) on embryo yield were estimated by statistical analysis. The microspore developmental stages from uninucleate, bicellular to mature pollen were observed *in vivo*, which underwent twice asymmetrical nuclear division. Flower bud length corresponding to late uninucleate microspores stage from 3.5 to 4.5 mm. Under temperature stress (32.5℃), *in vitro* microspores could be induced to deviate from their gametophytic development and switch to embryogenesis. A small portion of responsive microspores could develop into embryoid during isolated microspore culture. The outputs with various materials were obviously different. One of the six materials had no embryos. But ‘Hanyu No. 37’ possessed 22.5

收稿日期: 2014-07-07

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目(2012BAD02B00); 江苏省农业科技支撑计划重点项目(BE2013429)

第一作者: 曾爱松, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事甘蓝类蔬菜遗传育种和生物技术研究, E-mail: topzas@126.com

通讯作者: 严继勇, 研究员, 主要从事十字花科蔬菜遗传育种和生物技术研究, E-mail: yjyqr@163.com

embryos per bud, the highest level in the rest five materials with embryos. Adding 10 mg/L AG or 10 mg/L AGP to the medium of NLN-13 could improve the ability of microspore embryogenesis. The heat shock stress by 32.5 °C for 1 day could induce embryogenesis of the white cabbage. Either 10 mg/L AG or 10 mg/L AGP had a positive effect on embryogenesis.

Key words cold-tolerant white cabbage; microspore culture; embryogenesis; developmental pathway

我国结球甘蓝一直以春秋两季栽培为主,近年来随着消费需求的变化,露地越冬甘蓝栽培面积快速增长,目前在江苏、上海、湖北、湖南和河南等地已形成了相当大的生产规模^[1]。长江中下游地区露地越冬栽培一般8月上中旬播种,9月上中旬定植,翌年2—4月收获。因此越冬甘蓝最重要的性状要求是耐寒。由于耐寒甘蓝研究及育种工作起步晚,相应耐寒资源少,目前国内使用的品种主要依赖进口。在甘蓝类蔬菜育种中,利用游离小孢子培养技术可在2年内获得纯合的育种材料,从而提高选择效率,大大缩短育种进程。有较多研究者在甘蓝小孢子培养技术方面做了大量研究工作,目前甘蓝游离小孢子培养技术体系已初步建立^[2-3]。但是,许多基因型胚胎发生率还是很低,尤其是一些农艺性状重要的基因型在小孢子胚胎形成时表现出顽抗性,限制了该技术在甘蓝育种中大规模应用。本实验室在长期进行甘蓝类蔬菜游离小孢子培养的研究中发现,不同栽培季节及熟性的甘蓝品种间的胚胎发生率存在显著差异,其中春秋类型的早熟及中熟甘蓝要明显优于晚熟的耐寒冬甘蓝^[4]。因此,对耐寒冬甘蓝材料的胚胎发生过程及培养条件开展研究,对耐寒冬甘蓝及甘蓝类蔬菜单倍体育种具有十分重要的意义。小孢子培养技术应用于甘蓝最早见于1990年Cao等^[5]的报道。此后,通过植株生长环境、培养胁迫条件、培养环境等的改进,使得一部分基因型的小孢子出胚率在原有的基础上得到了提高^[2-3]。李菲等^[6]通过4,6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)荧光染色对大白菜游离小孢子胚胎发生过程进行了观察,发现大白菜小孢子以均等分裂途径为主要发育途径。崔群香等^[7]利用荧光素双醋酸酯(FDA)荧光染色法对不结球白菜小孢子游离后的发育过程进行了全程观察,为提高小孢子胚胎发生频率等提供了细胞学方面的依据。在小麦游离小孢子培养中,Letarte等^[8]研究表明阿拉伯半乳聚糖(Arabinogalactan, AG)和阿拉伯半乳糖蛋白(Arabinogalactan-protein, AGP)的添加能够提高小孢子活力,促进胚胎发生。王爱杰等^[9]在NLN-13

培养基中添加10 mg/L AG、10 mg/L AGPs或10 mg/L AG+10 mg/L AGPs,促进了大白菜和普通白菜小孢子胚状体发生及直接成苗。目前,对甘蓝小孢子胚胎发生过程的细胞学研究尚未见报道。本试验以6份耐寒冬甘蓝的杂交F₁为材料,探讨小孢子发育阶段与细胞形状及花蕾长度的关系,对小孢子胚胎发生过程进行观察,为增加小孢子培养的可操作性及提高小孢子胚胎发生频率等提供细胞学方面的依据;同时,对于培养基中添加AG及AGP对特殊基因型材料小孢子发育和成胚的影响进行针对性研究,旨在探明诱导耐寒甘蓝小孢子高出胚率的最佳条件和技术关键,为加速耐寒甘蓝材料的选育及进一步完善甘蓝小孢子培养技术提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

所用材料为江苏省农业科学院蔬菜研究所甘蓝项目组选育或引进的6份耐寒冬甘蓝杂种F₁,分别为寒玉37、1038、1039、冬升、冬胜和耐寒春月。供试材料种植于江苏省农业科学院蔬菜研究所六合试验基地。于2012年7月25日播种,8月30日定植于大田,12月15日各选6株移栽于塑料大棚,常规管理。翌年4月上旬—5月下旬进行游离小孢子培养。

1.2 小孢子分离与培养

选取单核靠边期花蕾,用75%(体积分数)的乙醇消毒30 s,之后用9%(体积分数)的次氯酸钠溶液消毒15 min,再用无菌水冲洗3次,每次3~5 min。然后将花蕾放入无菌研钵中,加入适量B5洗涤培养基,用研棒轻轻挤压,使小孢子从花药中游离到溶液中,45 μm孔径的尼龙筛网过滤,收集滤液,100g离心3次,每次3 min。最后1次离心后悬浮沉淀于NLN-13(pH=6.0)培养基中,并加入适量的活性炭(AC)。调整小孢子密度为1×10⁵ mL⁻¹(血球计数板计数),分装到无菌玻璃培养皿(Φ60 mm)中,每培养皿加2 mL悬浮液(每皿约为2个花蕾),用Parafilm封口,经32.5 °C热激培养1 d后转入25 °C暗培养^[3],约3周后有胚状体产生。

1.3 小孢子发育的细胞学观察

采用 DAPI 荧光染色法对小孢子发育时期进行观察。DAPI 染液购于南京森贝伽生物科技有限公司。

体内小孢子发育时期观察时,滴 1 滴染液于载玻片上,用镊子挤碎花药,然后挑出杂质,盖上盖玻片,采用 Olympus BX51(荧光)显微镜观察,并采用 Olympus DP72 成像系统拍照。每个品种选取 4 株,每株选取主、侧枝共 5 枝花序进行观察。

培养期间小孢子发育时期观察时,取 1~2 个培养皿小孢子培养液于离心管 100g 离心 1 次,取 1 滴沉淀于载玻片上,加入染液后于(荧光)显微镜下观察。隔天进行观察,直至肉眼可见的胚状体产生。每处理随机观察 10 个视野,每个视野统计 100 个小孢子。

1.4 AG、AGP 对胚胎发生的影响

最后 1 次离心后,将小孢子用添加 0、5、10 和 20 mg/L AG 和 0、5、10 和 20 mg/L AGP 的 NLN-13 培养基悬浮培养。25 d 后统计出胚数。以上试验每个处理设 3 次重复,每重复 10 个花蕾。

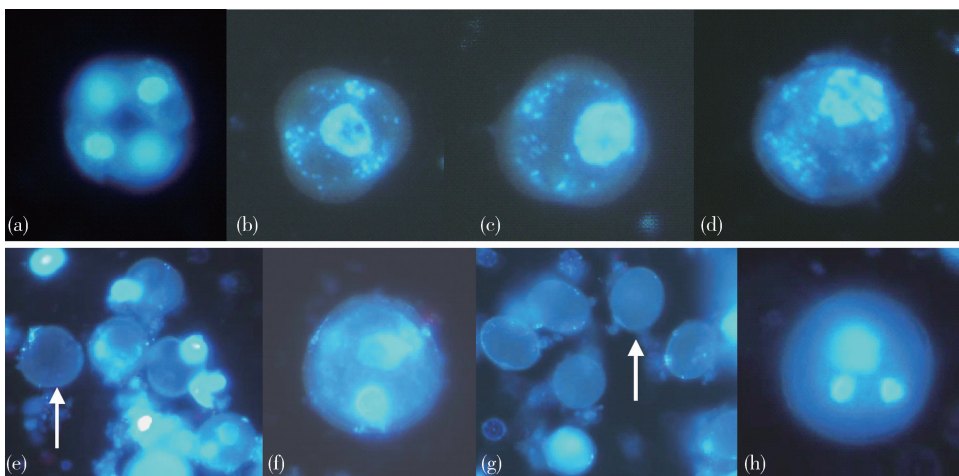
1.5 数据分析

所得数据采用 SAS (Statistical analysis system) 软件进行差异显著性分析,在 0.05 水平上进行 Duncan 多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 甘蓝小孢子体内发育途径

通过 DAPI 荧光染色对不同大小花蕾的细胞学发育时期进行观察,花粉母细胞经减数分裂形成 4 个单倍体的四分体小孢子(图 1(a));随后,小孢子从四分体中释放出来,形成细胞核位于细胞中央的单核早期小孢子(图 1(b));随小孢子生长,大液泡的形成,细胞核被挤向细胞壁较厚的一侧,此阶段即是进行游离小孢子培养的最佳时期——单核靠边期。单核靠边期也分为 2 个生长阶段:早期小孢子形态是细胞核位于一侧的三棱状(图 1(c)),随着花蕾的发育,小孢子体积逐渐变大,形态变圆(图 1(d))。此后,小孢子进入观察不到细胞核染色的第 1 次有丝分裂前的间期(图 1(e))。完成第 1 次有丝分裂的小孢子,具有一大一小 2 个细胞核(图 1(f))。较大的营养核染色质松散,经 DAPI 染色后亮度微弱;生殖核体积较小,其染色质浓缩度大,染色后较营养核亮度高。进入第 2 次有丝分裂前间期的小孢子呈长椭圆形或圆形,看不到细胞核或只能看到一个染色较淡的细胞核(图 1(g));完成第 2 次有丝分裂的生殖核分裂形成 2 个精核,小孢子发育为具有 1 个营养核和 2 个精核的成熟花粉粒(图 1(h))。发育过程中,小孢子的大小及形态等发生了明显变化,这为选取适宜发育时期的花蕾提供了具体及可靠的依据。



(a) 四分体时期;(b)单核早期;(c)单核靠边期早期;(d)单核靠边期后期;(e)第一次有丝分裂间期;(f)双核期;(g)第二次有丝分裂间期;(h)成熟花粉粒;箭头所指为相应发育时期小孢子形态。
(a) Tetrad stage; (b) Young microspore; (c) Young vacuolate microspore; (d) Late vacuolate microspore; (e) G1 phase at pollen first mitosis; (f) Bicellular pollen; (g) G1 phase at pollen second mitosis; (h) Mature tricellular pollen; The arrow refer to the appropriate developmental stage.

图 1 结球甘蓝体内配子体发育途径(DAPI 染色)

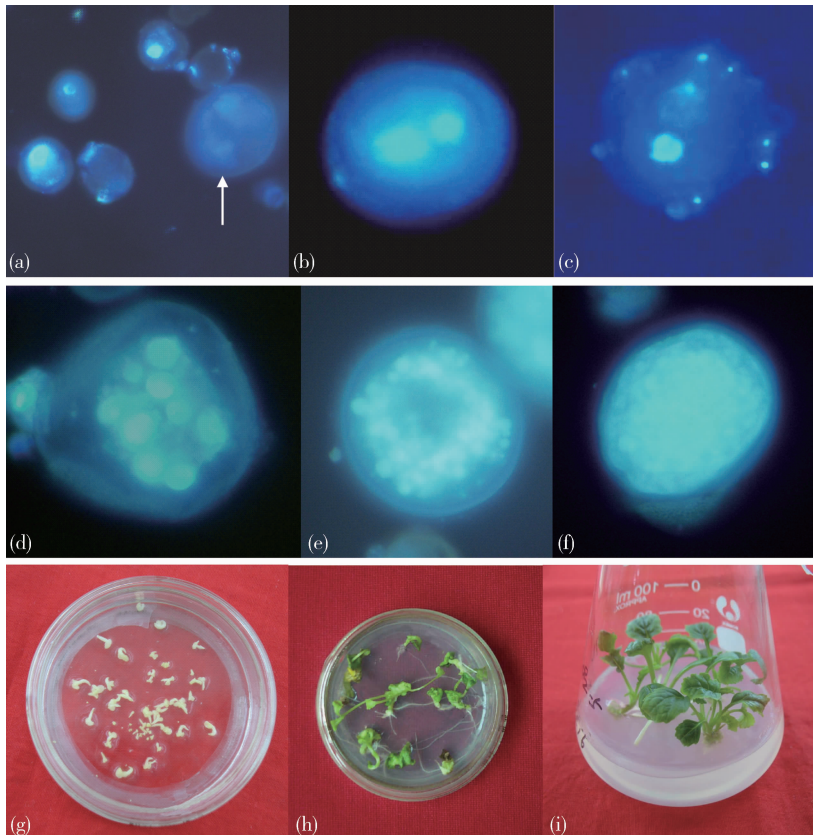
Fig. 1 Microspore gametophytic developmental pathway staining with DAPI *in vivo*

在本试验条件下,统计结果表明:6份材料中小孢子发育时期对应花蕾长度略有不同,总体为四分期:1.0~2.0 mm;单核早期:2.0~3.0 mm;单核晚期:3.0~4.0 mm;二核期:4.0~5.0 mm;三核期:5.0 mm 以上。一般认为,在结球甘蓝小孢子培养中,多数处于单核靠边期和单核靠边期~二核期(即第1次有丝分裂前的间期)的小孢子才具备胚状体发生能力。6个品种中,适宜于小孢子培养的花蕾大小略有差异,但基本位于3.5~4.5 mm的花蕾中。

2.2 培养后小孢子发育过程的细胞学观察

荧光显微镜观察发现,32.5 °C热激1 d后,可看到一定比例的近圆形膨大细胞(图2(a))。膨大细胞在培养2~3 d内进行第1次分裂,第1次分裂

包括:形成大小、染色质浓缩度一致的2个细胞核的对称分裂(图2(b)),以及大小、染色质浓缩度不一致的2个细胞核的不对称分裂(图2(c));之后经过多种发育途径的多次分裂,依次形成细胞核不等的仍有孢子壁包裹多细胞核结构(图2(d)和(e))。在培养15 d左右,可观察到孢子壁已破裂的多细胞团(图2(f))。21 d左右可得到肉眼可见的白色胚状体(图2(g))。但不是所有获得胚性的小孢子都能形成多细胞团及至胚胎,多数在第一次分裂后或者数次分裂后停止发育,只有极少数膨大细胞最终形成胚状体。培养25 d的子叶胚转接在B5固体培养基上,2~3周胚即可萌发(图2(h)),之后再转入MS固体培养基中,于三角瓶中继续培养1~2周长成幼苗(图2(i))。



(a)32.5 °C热激1 d后的膨大小孢子;(b)第一次对称分裂后的二核小孢子;(c)第一次不对称分裂后的二核小孢子;(d)10核细胞结构;(e)仍有孢子壁包裹的多细胞核结构;(f)孢子壁已破裂的多细胞原胚;(g)肉眼可见的胚状体;(h)胚状体萌发;(i)胚状体再生植株;白色箭头所指为相应发育时期小孢子形态。

(a)Swollen microspore after 1 d of culture;(b)Binucleate microspore with two equal-size nuclei;(c)Binucleate microspore with two unequal-size nuclei;(d)Mutinucleate structure with 10 nuclei;(e)Multinucleate structure still confined by the exine;(f)Multicellular proembryo with exine rupturing;(g)Embryos visible with the naked eyes;(h)Embryos that germinated in B5 solid medium;(i)Plantlets that developed in MS solid medium;The arrow refer to the appropriate developmental stage.

图2 结球甘蓝体外孢子体发育途径

Fig. 2 Microspore sporophytic developmental pathway of cabbage *in vitro*

2.3 不同材料胚状体产量的差异

培养 25 d 时,小孢子发育形成球型胚、鱼雷型胚、子叶胚等,不同供试基因型的小孢子出胚率存在显著差异(图 3)。基因型‘寒玉 37’出胚率最高,为 22.5 蕾⁻¹;其次为基因型‘1038’和‘1039’,出胚率

分别为 9.8 和 7.4 蕾⁻¹;基因型‘耐寒春月’和‘冬升’小孢子出胚情况较差,分别为 1.6 和 0.3 蕾⁻¹;而基因型‘冬胜’没有出胚。

2.4 AG 和 AGP 对胚状体产量的影响

由表 1 可知,在 NLN-13 培养基中加入一定浓度的 AG 及 AGP,对小孢子胚状体诱导有明显的促进作用。当 AG 达到 10 mg/L 时,供试品种的小孢子胚状体诱导率最高,其中低出胚材料耐寒春月胚诱导率达到 5.4 蕾⁻¹,难出胚材料冬胜最高达到 1.54 蕾⁻¹,这对于难出胚材料是一个较大的突破。

同时从表 1 可以看出,AGP 对小孢子胚胎诱导也有显著影响,而且从 3 份材料的出胚数比较,AGP 的效果稍好于 AG。在 AGP 浓度为 10 mg/L 时,胚诱导率达到最高,其中易出胚基因型寒玉 37 胚诱导率达到 43.69 蕾⁻¹,是对照的 2.2 倍;低出胚材料耐寒春月胚诱导率达到 7.25 蕾⁻¹,是对照的 6.90 倍。

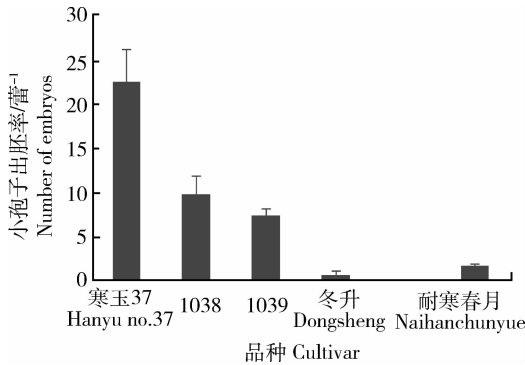


图 3 不同品种耐寒甘蓝小孢子出胚率差异

Fig. 3 Difference of embryogenesis efficiency in 6 cultivars of cabbage

表 1 NLN-13 培养基中添加 AG、AGP 对甘蓝小孢子培养胚状体每蕾出胚数的影响

Table 1 Effect of AG, AGP on the induction rate of microspore embryo 蕾⁻¹

| AG/(mg/L) | AGP/(mg/L) | 品种 Cultivar | | |
|-----------|------------|-----------------------|----------------------|-----------------|
| | | 寒玉 37 Hanyu no. 37 | 耐寒春月 Naihanchunyu | 冬胜 Dongsheng |
| | | 0 | 23.20±2.12 c | 1.67±1.13 c |
| 5 | 0 | 28.57±3.62 b | 2.76±0.81 b | 0.33±0.10 b |
| 10 | 0 | 41.20±5.32 a | 5.40±1.20 a | 1.54±0.50 a |
| 20 | 0 | 20.85±3.17 d | 0.33±0.12 d | 0±0 c |
| 0 | 0 | 19.50±0.54 c | 1.05±1.00 d | 0±0 c |
| 0 | 5 | 31.63±3.20 b | 4.58±1.51 b | 0.33±0.18 b |
| 0 | 10 | 43.69±3.84 a | 7.25±0.86 a | 1.67±0.12 a |
| 0 | 20 | 16.36±1.71 d | 2.40±0.50 c | 0±0 c |

注:同列数字后不同字母表示差异达 0.05 显著水平。

Note: Within the column, means followed by the same lower case letter are not significantly different at the 0.05 level of probability by Duncan's.

3 讨论

在甘蓝小孢子培养中,一般认为,处于单核靠边期或者单核靠边期~二核早期的小孢子最利于发育成胚状体,此时小孢子细胞形态标志处于不明显的

三裂形状与正圆形状间。花蕾长度在一定程度上能反映小孢子的发育时期,但不同材料、不同栽培和生长环境条件下,花蕾长度对应发育时期有所不同。如张恩慧等^[10]在甘蓝游离小孢子培养时取长度在 4.50~5.49 mm 花蕾小孢子所处的单核靠边期比

例达到76%,王五宏等^[11]认为2.5~4.0 mm花蕾最适宜培养。本研究利用DAPI染色对甘蓝体内配子体途径发育做了详细观察,发现6个品种最适培养时期对应的花蕾长度存在差异,但基本上在3.5~4.5 mm范围内的花蕾中处于单核晚期的小孢子比例最高。而且,同一个基因型的花蕾长度与发育时期的对应关系,在整个开花期间(开花始期~开花末期)基本无差异。因此,根据花蕾长度取材是一种快捷、准确的用于甘蓝游离小孢子培养材料选择的方法;但是,不同基因型、年份和栽培条件的材料中花蕾的选择需分别观察确定。

小孢子体内正常发育方向是通过2次不对称核分裂后发育成具有1个营养核和2个生殖核的三核花粉^[12-14],如本研究中观察到的体内配子体发育途径。游离小孢子培养即小孢子在外界胁迫下从配子体发育途径转向孢子体发育途径,从而导致胚状体形成。在芸薹属植物中,30~35℃热激预处理被作为诱导胚胎发生的一个先决条件^[15]。Hu等^[16]报道在小孢子胚胎发生过程中主要存在A、B和C3种发育途径。在A途径中,第1次分裂为不对称分裂,然后通过营养细胞反复分裂(A-V)、生殖细胞反复分裂(A-G)、或二者共同反复分裂(A-VG)形成胚胎;B途径为小孢子第1分裂为对称分裂,此后小孢子核进行均等反复分裂产生胚胎;上述分裂途径中发生核融合,导致染色体加倍或多倍体的形成,即称为C途径。本研究中,32.5℃热激预培养1d后小孢子获得胚性,对称与不对称分裂均存在。从第1次分裂方式来看,在甘蓝小孢子胚胎发育途径中,A和B途径同时存在。而且,通过在培养过程中细胞核染色大小来判断^[6],C途径也在甘蓝胚胎发生过程中存在。在甘蓝游离小孢子培养中,小孢子密度调至为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,每皿分装2 mL,也就是每皿大概 2×10^5 个小孢子。但至目前为止,甘蓝胚胎发生率最高为每蕾34.35个^[4],在培养中90%以上小孢子在各个阶段陆续死亡。因此,在小孢子培养中,重点是通过培养环境的调整及改变剔除死亡小孢子对胚胎发生的影响,或者提高小孢子活力来促进胚胎发生,以期克服顽抗基因型的小孢子培养。

有研究表明,NLN培养基中AG及AGP等物质的添加,可以降低小孢子的死亡,从而提高胚胎发生率^[8]。AG是一类长的及高度支链的由阿拉伯糖与半乳糖组成的中性多糖^[17]。Günter等^[18]研究证明,麦瓶草(*Silene vulgaris*)愈伤组织中的AG具

有免疫调控活性。AGP是一类异质性的糖蛋白,在植物的根、茎、叶、花和种子中均可发现,主要由蛋白质和碳水化合物(糖类)组成,其蛋白质部分的含量不超过10%,富含羟脯氨酸、丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸,氨基酸含量和种类因物种和组织的不同而有变化。在大白菜及不结球白菜等十字花科作物及小麦等作物中均有研究表明,在NLN-13培养基中添加适量AG及AGP可促进小孢子培养中胚状体的产生^[8-9]。Yuan等^[19]研究表明,在培养基中添加AGP显著增加了结球甘蓝胚状体的诱导。本试验结果表明,AG和AGP对耐寒甘蓝胚状体的发育均有促进作用,在培养基中添加AG 10 mg/L和AGP 10 mg/L,有利于胚性细胞的发生和发育,增加胚胎发生率,这与前人研究结果一致。在NLN-13培养基中添加AG和AGPs,操作简便,在一定程度上促进了耐寒甘蓝胚状体诱导。但是本试验所采用的材料具有独特性,所以针对其他甘蓝难出胚基因型材料的作用还需要进一步验证。

参 考 文 献

- [1] 肖燕,王志建,戴忠良,等.晚熟越冬结球甘蓝新品种:冬升[J].长江蔬菜,2011(13):13-14
- [2] 曾爱松,冯翠,高兵,等.温度胁迫对结球甘蓝游离小孢子胚胎发生的影响[J].江苏农业学报,2011,27(3):623-627
- [3] 袁素霞.甘蓝和青花菜小孢子培养及早期胚胎形成相关基因差异表达分析[D].北京:中国农业科学院,2009
- [4] 曾爱松,冯翠,高兵,等.结球甘蓝小孢子培养技术体系的优化研究[J].华北农学报,2010,25(增刊):40-44
- [5] Cao M Q, Charlot F, Dore C. Embryogenesis and plant regeneration in sauerkraut cabbage (*Brassica oleracea* L Subsp *capitata*) by *in vitro* culture of isolated microspores[J]. C R Acad Sci Paris Ser III, 1990, 310: 203-209
- [6] 李菲,张淑江,章时蕃,等.大白菜游离小孢子培养胚胎发生中的加倍机制[J].园艺学报,2006,33(5):974-978
- [7] 崔群香,王倩,李英,等.不结球白菜小孢子胚胎发生过程及发育途径研究[J].南京农业大学学报,2012,35(2):21-26
- [8] Letarte J, Simion E, Miner M, et al. Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L) microspore culture[J]. Plant Cell Rep, 2006, 24: 691-698
- [9] 王爱杰,章云,刘洋,等. AG 和 AGPs 对大白菜和普通白菜(小白菜)小孢子胚状体诱导及成苗的影响[J]. 中国蔬菜, 2012 (4): 62-66
- [10] 张恩慧,马英夏,杨安平,等.甘蓝小孢子培养中花蕾长度与细胞单核期的关系[J].西北农业学报,2012,21(6):124-128
- [11] 王五宏,叶国锐,李必元,等.结球甘蓝小孢子胚诱导与植株再

- 生[J]. 核农学报, 2013, 27(6): 715-722
- [12] Petricka J J, VAN-NORMAN J M, BENFEY P N. Symmetry breaking in plants: Molecular mechanisms regulating asymmetric cell divisions in Arabidopsis[J/OL]. CSH Perspect Biol, 2009, 1(5): a000497[2015-01-08]http://cshperspectives.cshlp.org/
- [13] Gonza P, Testillano P S, AHMADIAN P, et al. Immunoelectron microscopy of PCNA as an efficient marker for studying replication times and sites during pollen development[J]. Chromosoma, 2000, 109: 397-409
- [14] Testillano P, Georgievs, Mogensen H L, et al. Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during *in vitro* maize induced microspore embryogenesis [J]. Chromosoma, 2004, 112: 342-349
- [15] Gland A, Lichter R, Schweiger H G. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore culture of *Brassica napus* L[J]. J Plant Physiol, 1988, 132: 613-617
- [16] Hu T, Kasha K J. A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L) cv Chris[J]. Genome, 1999, 42: 432-441
- [17] Hauer J, Anderer A. Mechanism of stimulation of human natural killer cytotoxicity by Western arabinogalactan from *Larix occidentalis*[J]. Cancer Immunol Immun, 1993, 36: 237-244
- [18] Gunter E A, Ovodoy S. An alternate carbon source for enhancing production of polysaccharides by silene vulgaris callus[J]. Carbohydr Res. 2002, 337(18): 1641-1645
- [19] Yuan S X, Liu Y M, Fang Z Y, et al. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2012, 110: 69-76

责任编辑: 王燕华