

甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶和下胚轴 高频再生体系的建立

白延红^{1,2}, 谭永军³, 陈耀锋¹, 秦静远², 李春莲¹, 任慧莉¹, 郭东伟¹

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨陵 712100; 2 杨凌职业技术学院 生物工程系, 陕西 杨陵 712100;

3 新疆自治区轮台县农技中心, 新疆 轮台 841600)

【摘要】 【目的】探索甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶和下胚轴的最佳离体培养条件。【方法】以甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 无菌苗的子叶和下胚轴为外植体,研究了苗龄、预培养时间、预培养基和分化培养基中激素配比等对甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶和下胚轴高频再生的影响。【结果】4 因素对甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶和下胚轴的再生均有明显影响。4 d 苗龄,在 MS+6-BA 1mg/L+2,4-D 1mg/L 预培养基上预培养 3 d 后诱导分化,子叶在添加 NAA 0.02 mg/L+6-BA 3.0 mg/L 的分化培养基中分化率最高,达 80.45%,下胚轴在添加 NAA 0.05 mg/L+6-BA 3.0 mg/L 的分化培养基中分化率最高,达 69.33%。【结论】建立了甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶和下胚轴稳定高效的再生体系,为其遗传转化奠定了基础。

【关键词】 甘蓝型油菜;雄性不育系;子叶;下胚轴;高频再生

【中图分类号】 S565.4.035.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)08-0061-06

Establishment of high-frequency shoot regeneration system of cotyledons and hypocotyls from male sterile line B₂ of *B. napus* L.

BAI Yan-hong^{1,2}, TAN Yong-jun³, CHEN Yao-feng¹, QIN Jing-yuan²,

LI Chun-lian¹, REN Hui-li¹, GUO Dong-wei¹

(1 College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Department of Biological

Engineering, Yangling Vocational and Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Xinjiang Luntai County Agricultural Technology Center, Luntai, Xinjiang 841600, China)

Abstract: 【Objective】 The study explored the best *in vitro* culture conditions of cotyledons and hypocotyls from male sterile line B₂ of *Brassica napus* L.. 【Method】 With the cotyledons and hypocotyls from male sterile line B₂ of *Brassica napus* L. as explants, the effects of four factors, donor plant age, pre-culture time and hormone combination in pre-culture medium and that in differentiation medium, on high-frequency shoot regeneration of hypocotyls and cotyledons from line B₂ were studied in the experiment. 【Result】 All four factors had significant effects on the shoot regeneration of the cotyledons and hypocotyls from male sterile line B₂. Inducing differentiation in differentiation medium at 4-d plant age following 3-d culture in pre-culture medium containing 6-BA 1 mg/L+2,4-D 1 mg/L, showed highest differentiation rates of cotyledons and hypocotyls were respectively 80.45% in medium containing NAA 0.02 mg/L+6-BA 3.0 mg/L and 69.33% in medium containing NAA 0.05 mg/L+6-BA 3.0 mg/L. 【Conclusion】 Stable and efficient

* 【收稿日期】 2007-07-23

【基金项目】 陕西省科技攻关项目(2003K03-G1-04)

【作者简介】 白延红(1976—),女,陕西延川人,在读博士,主要从事农业生物技术研究。E-mail: baiyh2856@126.com

【通讯作者】 陈耀锋(1956—),男,陕西岐山人,教授,博士生导师,主要从事农业生物技术研究。E-mail: chenyf3828@126.com

regeneration systems for cotyledons and hypocotyls from male sterile line B₂ were established, which laid a foundation for genetic transformation of line B₂.

Key word: *Brassica napus* L.; male sterile line; cotyledon; hypocotyl; high-frequency regeneration

油菜(*Brassica napus*)是世界上重要的油料作物之一,油菜再生体系的建立和改良,对于利用植物基因工程技术加速油菜育种研究具有重要的意义^[1]。油菜分为白菜型、芥菜型和甘蓝型 3 大类型,其中甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)具有适应性广、抗逆性强、丰产性好、增产潜力大等优点。自 1974 年 Kartha 等^[2]首次从甘蓝型油菜的茎切片诱导出小植株以来,国内外对甘蓝型油菜不同部位外植体的诱导再生进行了多方面的探索^[3-9]。目前,已从油菜的下胚轴、子叶、茎段、叶片、根、小孢子、茎尖、原生质体等不同外植体中获得了再生植株。其中,子叶和下胚轴由于具有分化频率较高、取材方便、试验不受季节限制、易被农杆菌感染和转化等优点而作为再生和转化体系的首选外植体。但对于一些特殊遗传材料,如雄性不育系和自交不亲和系等,以子叶和下胚轴为转化受体具有一定难度。为此,本研究以甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 的子叶和下胚轴为材料,研究了苗龄、预培养时间,以及预培养基和分化培养基中激素配比等因素对甘蓝型油菜雄性不育系子叶和下胚轴高效再生的影响,以期建立甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 稳定高效的再生体系,为油菜遗传转化改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 油菜种子 甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 种子,由陕西农垦中心李殿荣研究员提供。

1.1.2 试剂 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、 α -萘乙酸(NAA)和 6-苄基氨基嘌呤(6-BA),均购自美国 Sigma 公司。

1.1.3 培养基 种子萌发培养基为 1/2MS+蔗糖 10 g/kg+琼脂粉 6 g/kg, pH=5.6;预培养和分化培养的基本培养基为 MS 培养基;苗龄和预培养时间试验预培养基附加 1.0 mg/L 2,4-D 和 1.0 mg/L 6-BA,分化培养基附加 0.05 mg/L NAA 和 3.0 mg/L 6-BA;预培养激素配比试验预培养基分别附加 0.5,1.0,1.5 mg/L 2,4-D 和 0.5,1.0,1.5,2.0 mg/L 6-BA,共 12 个处理,分化培养基附加的激素同苗龄试验;分化培养激素配比试验中,分化培养基分别附加 0,0.02,0.05,0.10 mg/L NAA 和 0,1.5,

3.0,4.5,6.0 mg/L 6-BA,共 20 个处理,预培养基附加的激素同苗龄试验。以上各处理培养基均含蔗糖 30 g/kg,琼脂 6g/kg, pH=5.8。生根培养基为 1/2MS+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/kg+琼脂粉 6 g/kg, pH=5.8。

1.2 B₂ 无菌苗的获得

选取籽粒饱满、完整的甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 种子,用流水冲洗干净,体积分数 75% 的乙醇消毒 30 s,再用 1 g/L 的氯化汞消毒 15 min 后,在无菌条件下接种于种子萌发培养基上,于(25±1)℃、黑暗条件下培养 2 d,然后转到光下培养 2~6 d(光照强度为 2 000~3 000 lx,光照周期为 16 h/d)。

1.3 各因素对 B₂ 子叶和下胚轴芽分化的影响

分别切取甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 4~8 d 苗龄无菌实生苗的子叶和下胚轴(子叶保留 1~2 mm 的子叶柄,下胚轴切成 5~8 mm 的段),接种在预培养基上进行预培养,3 d 之后转入分化培养基诱导分化,研究苗龄对油菜子叶和下胚轴再生的影响。切取 4 d 苗龄无菌苗的子叶和下胚轴,接种在预培养基上预培养不同天数(分别为 0,1,2,3,4,6,9 d),之后转入分化培养基诱导分化,研究预培养时间对油菜子叶和下胚轴再生的影响。将 4 d 苗龄无菌苗的子叶和下胚轴接种在附加不同质量浓度 2,4-D 和 6-BA 的预培养基上预培养 3 d,之后转入分化培养基培养,研究预培养基中激素对比对油菜子叶和下胚轴再生的影响。将 4 d 苗龄、在预培养基上预培养 3 d 的无菌苗的子叶和下胚轴,转接到附加不同质量同浓度 6-BA 和 NAA 的分化培养基上培养,研究分化培养基中激素对比对油菜子叶和下胚轴再生的影响。

1.4 B₂ 再生苗的生根

将分化出的芽苗接种在生根培养基上,置(25±1)℃、光照强度 3 000 lx、光照周期 16 h/d 的条件下生根。

2 结果与分析

2.1 苗龄对 B₂ 子叶和下胚轴芽分化的影响

研究结果(表 1)表明,苗龄对甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶和下胚轴的分化有显著影响,低龄幼苗的子叶和下胚轴分化效果好,4 d 苗龄的分化率最

高,分别为 70.51%和 67.85%;随着苗龄的增加,分化率逐步降低;到 8 d 苗龄时,子叶和下胚轴的分化率仅为 20.27%和 18.68%,比 4 d 苗龄时的分化率分别降低了 50.24%和 49.17%。

表 1 苗龄对甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶和下胚轴芽分化的影响

Table 1 Effects of donor plant age on shoot differentiation from cotyledons and hypocotyls of male sterile line B₂ of *B. napus* L.

苗龄/d Plant age	子叶 Cotyledon			下胚轴 Hypocotyl		
	接种子叶数 No. of cotyledons inoculated	分化不定芽数 No. of shoots differentiated from cotyledons	分化率/% Frequency of differentiated shoots	接种下胚轴数 No. of hypocotyls inoculated	分化出芽数 No. of shoots differentiated from hypocotyls	分化率/% Frequency of differentiated shoots
4	78	55	70.51	84	57	67.85
5	76	47	61.84	74	43	58.11
6	81	42	51.85	82	40	48.78
7	72	16	22.22	80	17	21.25
8	74	15	20.27	81	17	18.68

2.2 预培养时间对 B₂ 子叶和下胚轴芽分化的影响

研究表明,预培养时间对甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶和下胚轴芽的分化有很大影响,不经预培养(0 d)的子叶和下胚轴,其分化率较低,分别为 23.08%和 21.43%(表 2),而且分化速率也较慢,子叶需 2 周左右,下胚轴需 3 周左右才可分化出不定芽;经过 1~6 d 的预培养后,子叶和下胚轴的分化率均高于对照(0 d),其中以预培养 3 d 的效果最好(表 2);子叶在预培养 3 d 后,子叶柄切口处迅速膨大,接入分化培养基后 1 周左右即可分化出幼芽,分化率达 70.70%;下胚轴预培养 3 d 后,下胚轴增粗,变绿,两端切口处迅速膨大,接入分化培养基

后约 10 d 左右即可分化出不定芽(图 1),分化率达 67.78%。

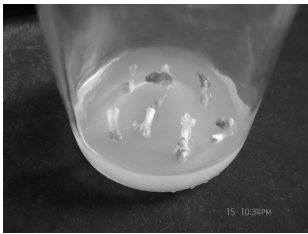


图 1 甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 下胚轴的分化
Fig. 1 Differentiation of hypocotyls from male sterile line B₂ of *B. napus* L.

表 2 预培养时间对甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶和下胚轴芽分化的影响

Table 2 Effects of pre-culture duration on shoot differentiation from cotyledon and hypocotyl of male sterile line B₂ of *B. napus* L.

培养时间/d Pre-culture time	子叶 Cotyledon			下胚轴 Hypocotyl		
	接种子叶数 No. of cotyledons inoculated	分化不定芽数 No. of shoots differentiated from cotyledons	分化率/% Frequency of differentiated shoots	接种下胚轴数 No. of hypocotyls inoculated	分化出芽数 No. of shoots differentiated from hypocotyls	分化率/% Frequency of differentiated shoots
0	78	18	23.08	84	18	21.43
1	87	30	34.48	102	33	32.35
2	84	46	54.76	87	45	51.72
3	99	70	70.70	90	61	67.78
4	102	16	47.06	81	39	48.15
6	87	21	24.14	84	18	21.43
9	81	5	6.17	87	7	8.05

2.3 预培养基中不同激素配比对 B₂ 子叶和下胚轴芽分化的影响

表 3 表明,预培养基中不同质量浓度配比的 6-BA 和 2,4-D 对甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶和下胚轴芽的分化有重要影响,12 个激素处理组合均分化出了不定芽;不同质量浓度的 6-BA 和 2,4-D 配比,子叶和下胚轴的分化率分别为 19.05%~69.05%和 10.34%~67.74%,二者均以添加 2,4-D

1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 处理的芽分化率最大。子叶芽分化率最低的激素配比为 2,4-D 1.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L,下胚轴为 2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L。从表 3 还可以看出,当 2,4-D 质量浓度一定时,随着 6-BA 质量浓度的升高,子叶和下胚轴的分化率先升高后下降,6-BA 质量浓度升高至 1.0 mg/L 时,分化率达最高水平,超过此浓度,分化率减小。同时,当 6-BA 质量浓度一定时,随着

2,4-D 质量浓度的升高,子叶和下胚轴的分化率亦 mg/L 时,分化率最大,高于此浓度,分化率减小。呈先升高后降低的趋势,2,4-D 质量浓度升高至 1.0

表 3 预培养基中不同激素对比对甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶和下胚轴芽分化的影响
Table 3 Effects of hormone combinations in pre-culture medium on shoot regeneration from cotyledons and hypocotyls of male sterile line B₂ of *B. napus* L.

激素配比/(mg·L ⁻¹) Hormone combination		子叶 Cotyledon			下胚轴 Hypocotyl		
2,4-D	6-BA	接种子叶数 No. of cotyledons inoculated	分化不定芽数 No. of shoots differentiated from cotyledons	分化率/% Frequency of differentiated shoots	接种下胚轴数 No. of hypocotyls inoculated	分化出芽数 No. of shoots differentiated from hypocotyls	分化率/% Frequency of differentiated shoots
0.5	0.5	81	18	22.22	87	3	10.34
	1.0	81	36	44.44	87	32	36.78
	1.5	87	27	31.03	93	23	24.73
	2.0	90	18	20.00	84	12	14.29
	0.5	78	34	43.59	84	36	42.86
1.0	1.0	84	58	69.05	93	63	67.74
	1.5	87	34	39.08	87	33	37.93
	2.0	87	28	20.69	87	21	24.14
	0.5	93	20	21.51	81	27	33.33
1.5	1.0	84	43	51.19	84	39	46.43
	1.5	84	28	33.33	84	26	30.95
	2.0	84	16	19.05	87	18	20.68

2.4 分化培养基中不同激素对比对 B₂ 子叶和下胚轴芽分化的影响 甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶和下胚轴芽分化的影响结果见表 4。

分化培养基中不同激素(NAA 和 6-BA)对比对

表 4 分化培养基中不同激素对比对甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶和下胚轴芽分化的影响
Table 4 Effects of hormone combination in differentiation media on shoot regeneration from cotyledons and hypocotyls of male sterile line B₂ *B. napus* L.

激素配比/(mg·L ⁻¹) Hormone combination		子叶 Cotyledon			下胚轴 Hypocotyl		
NAA	6-BA	接种子叶数 No. of cotyledons inoculated	分化不定芽数 No. of shoots differentiated from cotyledons	分化率/% Frequency of differentiated shoots	接种下胚轴数 No. of hypocotyls inoculated	分化出芽数 No. of shoots differentiated from hypocotyls	分化率/% Frequency of differentiated shoots
0	0.0	75	6	8.00	90	8	8.87
	1.5	75	26	34.67	72	26	36.11
	3.0	75	45	60.00	93	47	50.54
	4.5	81	32	43.21	72	30	41.67
	6.0	75	28	37.33	84	22	26.19
0.02	0.0	74	6	8.11	78	6	7.69
	1.5	75	46	61.33	84	35	41.67
	3.0	87	70	80.45	78	46	58.97
	4.5	66	41	62.12	81	36	44.44
0.05	6.0	75	30	40.00	72	22	30.56
	0.0	72	5	6.94	75	5	6.67
	1.5	75	30	44.00	87	38	43.68
	3.0	81	56	69.14	75	52	69.33
	4.5	66	34	51.51	72	33	45.83
0.10	6.0	76	28	36.84	87	31	35.63
	0.0	81	6	7.40	81	5	6.17
	1.5	81	25	30.86	72	24	33.33
	3.0	72	38	52.78	87	45	51.72
	4.5	75	30	40.00	78	24	30.77
	6.0	75	16	21.33	87	15	17.24

由表 4 可知,不同质量浓度的 NAA 和 6-BA 对比对甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶和下胚轴芽的分化有重要影响。在不同质量浓度的 NAA 和 6-BA 配比中,子叶和下胚轴的分化率分别为 6.94%~80.45% 和 6.17%~69.33%,其中子叶以添加 NAA 0.02 mg/L+6-BA 3.0 mg/L 配比的效果最好,分化率达 80.45%,分化速度快,而且分化的多为簇生芽(图 2);下胚轴以添加 NAA 0.05 mg/L+6-BA 3.0 mg/L 配比的分化率最高,达 69.33%。分化培养基中不添加任何激素时,子叶和下胚轴的分化率分别为 8.00% 和 8.87%。从表 4 还可以看出,在 NAA 质量浓度一定时,随着 6-BA 质量浓度



图 2 甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 子叶的分化
Fig. 2 Differentiation of cotyledons from male sterile line B₂ of *B. napus* L.

3 讨 论

苗龄是影响油菜子叶和下胚轴芽分化的重要因素之一。周伟军等^[10]、石淑稳等^[11]研究发现,较小的苗龄有利于子叶的分化。本研究发现,对甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 而言,子叶和下胚轴均以 4 d 苗龄时的分化率最高,较 8 d 苗龄时分别提高 50.24% 和 49.17%,这可能与同种外植体在不同苗龄期所处的生理状态不同有关。

预培养可以调整细胞的生理状态,减少伤害胁迫,促进外植体分化^[12]。王艳等^[13]发现,甘蓝型油菜的带柄子叶在诱导分化前,经过 3 d 的预培养可明显提高芽的再生频率。Radke 等^[14]认为,甘蓝型油菜下胚轴在转化前进行一段时间的预培养可明显提高转化效率。本研究发现,B₂ 的子叶和下胚轴在添加 2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的预培养基上预培养 3 d 后再转入分化培养基中培养,分化率明显提高,而且分化时间也提前了 1 周左右。这说明,预培养时间的长短不仅对甘蓝型油菜雄性不育系子叶和下胚轴芽的分化率有影响,而且对其分化速度也有影响。同时,预培养基中的激素对比对

的升高,子叶和下胚轴的分化率均先升高后下降,当 6-BA 质量浓度升高至 3.0 mg/L 时,分化率达最高水平,超过此浓度,分化率开始下降,而且玻璃化现象严重。同样,当 6-BA 质量浓度为 3.0 mg/L 时,随着 NAA 质量浓度的升高,子叶和下胚轴的分化率亦呈先升后降的趋势。当 NAA 质量浓度为 0.02 mg/L 时,子叶的分化率最大;NAA 质量浓度为 0.05 mg/L 时,下胚轴的分化率最大。

2.5 B₂ 再生苗的生根

再生的芽苗转接到生根培养基上培养 2 周后,96% 的芽能产生根,形成正常植株(图 3)。

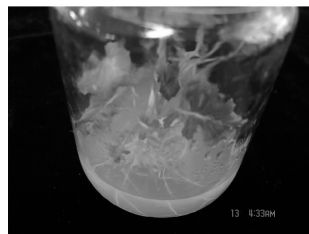


图 3 甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 的再生植株
Fig. 3 Regenerated plantlets from male sterile line B₂ of *B. napus* L.

二者的分化也有重要作用。

分化培养基中的激素配比,特别是生长素和细胞分裂素的比例,在某种程度上决定了植物离体组织能否表达细胞全能性,再生出完整植株^[15]。王艳等^[13]研究发现,在分化培养基中添加 NAA 0.02 mg/L+6-BA 4.0 mg/L,可使甘蓝型油菜 912 品系子叶的再生频率提高到 70%。本研究发现,B₂ 的子叶在添加 NAA 0.02 mg/L+6-BA 3.0 mg/L 的分化培养基中培养,分化率最高(80.45%);而下胚轴在添加 NAA 0.05 mg/L+6-BA 3.0 mg/L 的分化培养基中培养,分化率最高(69.33%)。这说明在甘蓝型油菜离体培养中,不同基因型或同一基因型的不同器官对激素配比的要求不同。本研究还发现,低质量浓度的 6-BA(0~3 mg/L)对子叶和下胚轴不定芽的分化和生长有促进作用,但质量浓度过高时,则表现为抑制作用,而且随着 6-BA 质量浓度的升高,玻璃化现象也加重,这与程振东等^[12]的研究结果相一致。

本研究通过对苗龄、预培养时间、预培养基和分化培养基中激素配比等因素的研究,建立了甘蓝型油菜雄性不育系 B₂ 稳定高效的再生体系,为 B₂ 的

遗传转化奠定了基础。在油菜子叶和下胚轴的离体培养中,玻璃化现象比较严重。前人曾试图通过控制培养基中细胞分裂素的水平、提高琼脂浓度等方法来解决这一问题,但效果都不明显。本研究也发现这一现象,其原因及解决办法还有待于进一步研究。

〔参考文献〕

- [1] 薛启汉,朱卫民,吴敬音,等. 6-BA 和 AgNO₃ 对甘蓝型油菜带柄子叶外植体不定芽再生的影响 [J]. 江苏农业学报,2001,17(4):211-214.
Xue Q H, Zhu W M, Wu J Y, et al. Effects of 6-BA and AgNO₃ on adventitious shoot regeneration from the explants of cotyledon with petiole of rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2001, 17(4): 211-214. (in Chinese)
- [2] Kartha K K, Gamborg O L, Constabel F. In vitro plant formation from stem explants of rape (*Brassica napus* cv 'Zephyr') [J]. Physiol Plant, 1974, 31: 217-220.
- [3] Dunwell J M. *In vitro* regeneration from excised leaf discs of three *Brassica* species [J]. Journal of Experimental Botany, 1981, 32(129): 789-799.
- [4] Lazzeri P A, Dunwell J M. In vitro shoot regeneration from seedling root segments of *Brassica oleracea* and *Brassica napus* cultivars [J]. Annals of Botany, 1984, 54(3): 341-350.
- [5] Khehra G S, Mathias R J. The interaction of genotype explant and media on the regeneration of shoots from complex explants of *Brassica napus* L [J]. Journal of Experimental Botany, 1992, 43(11): 1413-1418.
- [6] Takahata Y, Kaizuma N. Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1994, 14(1): 13-17.
- [7] O'Neill C M, Arthur A E, Mathias R J. The effects of proline, thioproline and methylglyoxal-bis-(guanyldrazone) on shoot regeneration frequencies from stem explants of *B. napus* [J]. Plant Cell Rep, 1996, 15(9): 695-698.
- [8] 石淑稳,周永明. 甘蓝型油菜下胚轴培养和高频率芽再生技术的研究 [J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(2): 1-6.
Shi S W, Zhou Y M. High frequency of shoot regeneration from hypocotyl explants in *Brassica napus* L [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1998, 20(2): 1-6. (in Chinese)
- [9] Klimaszweska K, Keller W A. High frequency plant regeneration from thin cell layer explants of *Brassica napus* [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1985, 4(3): 183-197.
- [10] 周伟军,唐桂香. AgNO₃ 对甘蓝型油菜子叶外植体植株再生的影响 [J]. 中国油料作物学报, 2001, 23(3): 9-12.
Zhou W J, Tang G X. Effect of AgNO₃ on the shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica napus* L [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2001, 23(3): 9-12. (in Chinese)
- [11] 石淑稳,周永明,王新发. 影响油菜子叶外植体不定芽高频再生的因素 [J]. 西北植物学报, 1998, 18(4): 477-482.
Shi SH W, Zhou Y M, Wang X F. Factors affecting shoot regeneration at high frequency from in vitro culture cotyledon of *Brassica napus* and *B. campestris* [J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 1998, 18(4): 477-482. (in Chinese)
- [12] 程振东,卫志明. 根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植株的再生 [J]. 植物学报, 1994, 36(9): 657-663.
Cheng ZH D, Wei ZH M. Transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants [J]. Acta Botanica Sinica, 1994, 36(9): 657-663. (in Chinese)
- [13] 王 艳,贺 宾,曾幼玲,等. 甘蓝型油菜带柄子叶高频率再生植株的研究 [J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(4): 86-90.
Wang Y, He B, Zeng Y L, et al. High efficiency of plant regeneration from petiolate cotyledons in rapeseed (*Brassica napus*) [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2004, 26(4): 86-90. (in Chinese)
- [14] Radke S E, Turner J C, Facciotti D. Transformation and regeneration of *Brassica napus* using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Reports, 1992, 11: 499-505.
- [15] 白书农. 植物发育生物学 [M]. 北京:北京大学出版社, 2003.
Bai SH N. Plant Developmental Biology [M]. Beijing: Peking University Press, 2003. (in Chinese)