

秋水仙碱对甘蓝游离小孢子胚胎发生及发育的影响

杨安平¹, 张恩慧², 郑爱泉¹, 尚丽荣¹, 许念芳², 马勇斌²

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

【摘要】 **【目的】**研究秋水仙碱对甘蓝小孢子胚胎发生及发育的影响, 为促进甘蓝小孢子培养技术的有效利用提供依据。**【方法】**以甘蓝一代杂种及不同自交代数的高代自交系、低代自交系为试材, 在游离小孢子培养基中添加不同质量浓度秋水仙碱, 处理时间为 48 h, 以不添加秋水仙碱为对照(CK), 在同等条件下进行小孢子培养, 分别比较产胚量和胚胎发育状况的差异。**【结果】**(1) 培养基中添加 10 mg/L 秋水仙碱的 40 份甘蓝材料中, 有 19 份产生了胚状体, 产胚材料比率为 47.5%, 较对照提高 25%; (2) 以 9 份甘蓝一代杂种及不同自交代数的高代自交系、低代自交系为试材, 在培养基中添加 1, 10, 50 mg/L 秋水仙碱后, 每蕾产胚数、子叶形胚率均较对照有所增加, 其中一代杂种及低代自交系材料在 1 或 10 mg/L 秋水仙碱处理时增加幅度较大, 每蕾产胚数和子叶形胚率分别为 1.30~2.20 个和 15.0%~69.1%, 而高代自交系材料在 10 或 50 mg/L 秋水仙碱处理时增加幅度较大, 每蕾产胚数和子叶形胚率分别为 0.78~1.98 个和 14.1%~70.6%; (3) 在培养 48 h 时, 用倒置显微镜观察各试材的小孢子, 发现培养基中分别添加 1, 10, 50 mg/L 秋水仙碱时, 膨大小孢子数量均较对照明显增多; 在静止培养期间用倒置显微镜观察各试材小孢子的胚胎发育情况, 发现培养基中添加 1, 10, 50 mg/L 秋水仙碱处理的多细胞原胚、球形胚、心形胚、鱼雷形胚频率均较对照高。**【结论】**在甘蓝小孢子培养基中添加秋水仙碱, 可使培养无反应材料的部分材料产胚, 使培养有反应材料的产胚量提高, 同时也对胚胎的良好发育有促进作用。

【关键词】 甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*); 小孢子培养; 秋水仙碱; 胚胎发生; 胚胎发育

【中图分类号】 S635.103.6

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)08-0131-07

Effects of colchicine on embryogenesis and development of isolated microspore in *Brassica oleracea* var. *capitata*

YANG An-ping¹, ZHANG En-hui², ZHENG Ai-quan¹, SHANG Li-rong¹,
XU Nian-fang², MA Yong-bin²

(1 Department of Biotechnology, Yangling Vocation & Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The study was done to explore the effects of colchicine on embryogenesis and development of isolated microspore in cabbage to provide basis for promoting effective utilization of isolated microspore culture technique. **【Method】**Using cabbage F1 hybrid and the high generation inbred lines and the low generation inbred lines as test materials, the treatment group (adding different doses of colchicine in the medium of isolated microspores culture and treating 48 hours) and the CK group (without adding colchicine in the medium of isolated microspores culture) were cultured under the same conditions. No. of embryo per bud and the situation of embryo development were compared respectively. **【Result】**(1) Adding 10 mg/L colchicine in the medium, there were 19 materials obtaining embryo in the 40 materials, the rate of

* [收稿日期] 2010-01-22

[基金项目] 陕西省农业攻关计划项目(2010K01-09); 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD01A7-2-04, 2008BADB1B02); 陕西省“13115”重大科技专项(ZDKG-126)

[作者简介] 杨安平(1964—), 男, 陕西富平人, 副教授, 主要从事蔬菜及生物技术研究。E-mail: yhlhgs88@163.com

the material which can obtain embryo was 47.5%. There was an increase of 25% compared with the CK; (2) Using nine cabbages F₁ hybrids and the high generation inbred lines and the low generation inbred lines as test materials, adding 1, 10 and 50 mg/L colchicine respectively in medium, No. of embryo per bud and the rate of cotyledon shaped embryo both increased compared with those of the CK. Among them, the materials of F₁ hybrid and the low generation inbred lines cultured in the medium which was added 1 or 10 mg/L colchicine had much more increase, the increasing extent being 1.30—2.20 of embryo per bud and 15.0%—69.1% of the rate of cotyledon shaped embryo respectively, but for the materials of the high generation inbred lines cultured in the medium which was added 10 or 50 mg/L colchicine had much more increase, the increasing extent being 0.78—1.98 per bud and 14.1%—70.6% respectively; (3) Observing microspore of all the materials by inverted microscope after culturing 48 hours, it was found that all the numbers of the swelling microspores increased significantly in the treatment group (adding 1, 10 and 50 mg/L colchicine respectively in medium) compared with that of the CK; Observing microspore embryos development of all the materials by inverted microscope during the period of static culture, it was found that the frequencies of multicellular proembryo, globular embryo, heart embryo and torpedo embryo in the treatment group (adding 1, 10 and 50 mg/L colchicine respectively in medium) were all higher than those of the CK. 【Conclusion】 Adding colchicine in the medium of isolated microspore culture in cabbage, for the nonresponse materials which were cultured under normal condition, can induce embryoid in part of them, for the response materials which were cultured under normal condition, can increase embryo yield. It can not only promote embryoid induction, but also promote the development of embryo.

Key words: cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*); isolated microspore culture; colchicine; embryogenesis; embryo development

利用植物小孢子培养技术可以获得单倍体(Haploids)或双单倍体(Double haploids)植株,这种植株是遗传研究及转基因研究的理想材料,在育种工作中具有极大的利用价值。自 Lichter 于 1982 年首次从油菜小孢子培养物中获得小孢子植株以来,许多重要作物都利用小孢子培养技术获得了小孢子植株,并在实际工作中得到有效利用^[1-5]。

甘蓝是结球甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*)的简称,是一种重要的蔬菜作物。目前已有在该作物上进行小孢子培养的研究报道^[6-9],但是因其出胚较其他作物困难,即多数材料对培养无反应或产胚量较低,成为小孢子培养技术有效利用的最大障碍。秋水仙碱(C₂₂H₂₅NO₆)是一种有剧毒的水溶性生物碱。据报道,将秋水仙碱应用于油菜等作物小孢子的培养中,其具有诱发小孢子胚胎发生及染色体加倍的良好作用^[10-16],但目前尚未见其在甘蓝小孢子培养中的应用报道。

本研究以甘蓝一代杂种及不同自交代数的高代自交系、低代自交系为试材,在游离小孢子培养基中添加不同质量浓度秋水仙碱,处理 48 h,分别比较产胚量和胚胎发育状况,旨在探明秋水仙碱对甘蓝小孢子胚胎发生及发育的影响作用,并为甘蓝小孢子

培养技术的有效利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

2008 年以西北农林科技大学园艺学院甘蓝育种研究室提供的 10 份甘蓝一代杂种及其 20 份亲本即高代自交系,以及 10 份仅自交 2~3 代、性状未稳定的低代自交系共 40 份材料为试材;2009 年以 2 份甘蓝一代杂种及其 4 份亲本,以及 3 份仅自交 2~3 代、性状未稳定的低代自交系共 9 份材料为试材,这些材料也是 2008 年的参试材料。

1.2 方法

1.2.1 试材准备 每年 7 月上中旬播种育苗,5~6 叶时移栽,结球植株于 11 月下旬用阳畦假植越冬,于翌年 3 月上旬定植,常规管理。

1.2.2 小孢子胚状体诱导 花蕾选取与消毒以及小孢子的游离、纯化均按照杨安平^[6]的方法进行。胚状体诱导按照以下方法及步骤进行:(1)分皿。用 10 mL 含 130 g/L 蔗糖的 NLN 培养基悬浮小孢子,平均分到 5 个直径为 60 mm 的玻璃培养皿中,每个培养皿中预先加入 1 mL 含 130 g/L 蔗糖的 NLN 培养基,最后用 Parafilm 封口。(2)热激处理。分

皿后将培养皿于 32 ℃下静置 48 h,同时保持黑暗条件。(3)更换新鲜培养基,对培养物进行离心(800 r/min,5 min),离心后弃去原培养基,并用新鲜培养基洗涤 2 次后再用 5 mL 新鲜培养基悬浮小孢子,转至直径为 90 mm 的玻璃培养皿中,最后用 Parafilm 封口;新鲜培养基为含 130 g/L 蔗糖的 NLN 培养基,其中不再含有秋水仙碱。(4)静止培养。将培养皿于 25 ℃下静置,直至肉眼可见小白点(胚状体)时为止,同时保持黑暗条件。(5)振荡培养。当肉眼可见胚状体时由静止培养转至振荡培养(60 r/min),同时保持适当的弱光条件,让胚状体进一步发育。

1.2.3 试验处理 在上述第一步分皿后用微量注射器直接添加秋水仙碱于培养基中,处理时间为 48 h,与热激处理同时进行;2008 年试验采用的秋水仙碱质量浓度为 10 mg/L,2009 年试验采用的秋水仙碱质量浓度为 1,10,50 mg/L,以上 2 年均以不添加

秋水仙碱(0 mg/L)为对照(CK),30 d 后统计胚状体数量。

2 结果与分析

2.1 秋水仙碱对甘蓝小孢子胚胎发生的影响

2008 年的试验结果(表 1)表明,培养基中未添加秋水仙碱(对照)的 40 份甘蓝材料中,仅有 9 份产生了胚状体,其中一代杂种、高代自交系及低代自交系各 3 份,产胚材料占供试材料的比例为 22.5%。培养基中添加 10 mg/L 秋水仙碱的 40 份甘蓝材料中,有 19 份产生了胚状体,其中一代杂种 5 份、高代自交系 9 份、低代自交系 5 份,产胚材料占供试材料的比例为 47.5%,较对照提高了 25%。可见,甘蓝小孢子培养基中添加 10 mg/L 的秋水仙碱,对培养无反应的一代杂种、高代自交系及不同自交代数的育种材料,可促使其部分材料产胚,尤其对高代自交系材料的促进效果更为明显。

表 1 秋水仙碱对甘蓝游离小孢子胚胎发生能力的影响(2008 年)

材 料 Material		秋水仙碱 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Dose of colchicine	培养皿数 No. of dishes	培养花蕾数 No. of buds	总胚数 No. of total embryos	每蕾产胚数 No. of embryo per bud	较对照增加的 每蕾产胚数 No. of embryo per bud increased vs. contrast
一代杂种 Hybrid	633M×YP03	0(CK)	5	40	100	2.50	
		10	5	40	150	3.75	1.25
	金 66×MP01	0(CK)	5	40	76	1.90	
	Jin 66×MP01	10	4	32	95	2.97	1.07
	HF409×S _{XP} F51	0(CK)	5	40	40	1.00	
		10	5	40	52	1.30	0.30
	BD25×A632M	0(CK)	4	32	0	0	
		10	5	40	11	0.28	0.28
	QG70	0(CK)	5	40	0	0	
		10	4	32	4	0.13	0.13
高代自交系 Many generation inbred line	YP03-5-7-8-1-6-9	0(CK)	4	32	36	1.12	
		10	4	32	61	1.91	0.79
	633M-0-3-5-3-8	0(CK)	5	40	44	1.10	
		10	5	40	87	2.18	1.08
	MP01-40-3-5-7-6-9	0(CK)	5	40	18	0.46	
		10	5	40	64	1.60	1.14
	金 66-17-1-2-3-7-8	0(CK)	5	40	0	0	
	Jin 66-17-1-2-3-7-8	10	5	40	45	1.13	1.13
	S _{XP} F51-3-6-5-1-3	0(CK)	5	40	0	0	
		10	5	40	13	0.33	0.33
	HF409-05-5-5-8-9-6	0(CK)	5	40	0	0	
		10	5	40	8	0.20	0.20
	A632M-1s-5-6-38	0(CK)	5	40	0	0	
		10	5	40	8	0.20	0.20
高代自交系 Many generation inbred line	BD25-4-9-5-6-8	0(CK)	5	40	0	0	
		10	5	40	7	0.18	0.18
	QG60♀	0(CK)	5	40	0	0	
		10	5	40	7	0.18	0.18

续表 1 Continued table 1

材 料 Materials		秋水仙碱 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Dose of colchicine	培养皿数 No. of dishes	培养花蕾数 No. of buds	总胚数 No. of total embryos	每蕾产胚数 No. of embryo per bud	较对照增加的 每蕾产胚数 No. of embryo per bud increased vs. contrast
低代自交系 A few generation inbred line	WG2-1-2	0(CK)	5	40	58	1.46	
		10	5	40	111	2.78	1.32
	WG1-3-2	0(CK)	5	40	22	0.56	
		10	4	32	61	1.91	1.35
	WG7-4-3-1	0(CK)	4	32	12	0.28	
		10	4	32	82	2.56	2.28
	WG10-1-3	0(CK)	5	40	0	0	
		10	5	40	10	0.25	0.25
	WG6-2-3-1	0(CK)	5	40	0	0	
		10	5	40	7	0.18	0.18

从表 1 还可以看出,各试材小孢子培养基中未添加秋水仙碱处理的每蕾产胚数相对较低,为 0.00~2.50 个;而添加 10 mg/L 秋水仙碱处理的每蕾产胚数均较对照有所增加,增加幅度为 0.13~2.28 个。未添加秋水仙碱的材料中有 9 份材料产生了胚状体,每蕾产胚数为 0.28~2.50 个;添加秋水仙碱后,这 9 份材料每蕾产胚数明显增加,每蕾产胚数达 1.60~3.75 个,平均较对照增加 0.30~2.28 个。

2009 年的试验结果(表 2)表明,在小孢子培养基中分别添加 1,10,50 mg/L 秋水仙碱后,各试材

的每蕾产胚数均较对照有所增加,增加幅度为 0.20~2.20 个。其中一代杂种及低代自交系材料在 1 或 10 mg/L 秋水仙碱处理下,每蕾产胚数相对较大,为 2.00~4.26 个,较对照增加 1.30~2.20 个;而高代自交系材料在 10 或 50 mg/L 秋水仙碱处理时的每蕾产胚数相对较大,为 1.06~2.38 个,较对照增加 0.78~1.98 个。可见,中等偏低质量浓度(1,10 mg/L)的秋水仙碱较适用于一代杂种及低代自交系材料的产胚,而中等偏高质量浓度的秋水仙碱(10,50 mg/L)更适用于高代自交系材料的产胚。

表 2 不同质量浓度秋水仙碱对甘蓝游离小孢子产胚量和子叶形胚率的影响(2009 年)

Table 2 Effects of different doses of colchicine on No. of embryo per bud and rate of cotyledou shaped embryos of isolated microspore culture in *B. oleracea* var. *capitata* (2009)

材 料 Material	秋水仙碱 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Dose of colchicine	每蕾产胚数 No. of embryo per bud	较对照增加的 每蕾产胚数 No. of embryo per bud increased vs. control	子叶形胚率/% Rate of cotyledou shaped embryos	较对照增加的 子叶形胚率/% Rate of cotyledou shaped embryos increased vs. contrast	
一代杂种 Hybrid	633M× YP03	0(CK)	2.46	53.1		
		1	4.26	1.80	78.8	25.7
		10	3.76	1.30	68.3	15.2
		50	3.26	0.70	64.6	11.5
	金 66× MP01 Jin 66× MP01	0(CK)	2.02		20.9	
		1	3.00	0.98	89.6	68.7
		10	3.00	0.98	90.0	69.1
		50	2.46	0.44	40.8	19.9
高代自交系 Many generation inbred line	YP03-5-7-8-1-6-9	0(CK)	1.18		52.6	
		1	1.56	0.38	61.3	8.7
		10	1.96	0.78	66.7	14.1
		50	2.12	0.94	76.5	23.9
	633M-0-3-5-3-8	0(CK)	1.00		25.0	
		1	1.66	0.66	48.5	23.5
		10	2.26	1.26	66.7	41.7
		50	2.00	1.00	68.8	43.8
	MP01-40-3-5-7-6-9	0(CK)	0.40		25.0	
		1	0.86	0.46	41.2	16.2
		10	1.56	1.16	72.0	47.0
		50	2.38	1.98	92.1	67.1

续表 2 Continued table 2

材 料 Material		秋水仙碱 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Dose of colchicine	每蕾产胚数 No. of embryo per bud	较对照增加的 每蕾产胚数 No. of embryo per bud increased vs. control	子叶形胚率/% Rate of cotyledou shaped embryos	较对照增加的 子叶形胚率/% Rate of cotyledou shaped embryos increased vs. contrast
高代自交系 Many generation inbred line		0(CK)	0.26		20.0	
	金 66-17-1-2-3-7-8 Jin66-17-1-2-3-7-8	1	0.46	0.20	55.6	35.6
		10	1.10	0.84	86.4	66.4
		50	1.06	0.80	90.5	70.6
低代自交系 A few generation inbred lines	WG2-1-2	0(CK)	1.50		70.0	
		1	3.10	1.60	90.3	20.3
		10	3.00	1.50	85.0	15.0
		50	2.38	0.88	78.9	8.9
	WG1-3-2	0(CK)	0.66		53.8	
		1	2.80	2.14	80.0	26.2
		10	2.00	1.34	72.5	18.7
		50	0.90	0.24	61.1	7.3
	WG7-4-3-1	0(CK)	0.40		75.0	
		1	2.50	2.10	98.0	23.0
		10	2.60	2.20	96.2	21.2
		50	0.68	0.28	81.8	6.8

从表 2 还可看出,各试材小孢子培养基中,未添加秋水仙碱处理的子叶形胚率相对较低,为 20.0%~75.0%,而添加 1,10,50 mg/L 秋水仙碱后,各试材的子叶形胚率均较对照有所增加,增加幅度为6.8%~70.6%,并且以原本子叶形胚率相对较低的材料的增加幅度较大。其中一代杂种及低代自交系材料在 1 或 10 mg/L 秋水仙碱处理时的子叶形胚率相对较高,为 68.3%~98.0%;而高代自交系材料在 10 或 50 mg/L 秋水仙碱处理时的子叶形胚率相对较高,为 66.7%~92.1%。可见,不同质

量浓度秋水仙碱引起子叶形胚率的变化趋势,与其对每蕾产胚数的影响基本一致。

2.2 秋水仙碱对甘蓝小孢子胚胎发育的影响

在培养 48 h 时,用倒置显微镜观察各试材小孢子,发现培养基中添加 1,10,50 mg/L 秋水仙碱时的膨大小孢子数量均较对照明显增多(图 1)。在静止培养期间,用倒置显微镜观察各试材小孢子的胚胎发育情况,发现培养基中分别添加 1,10,50 mg/L 秋水仙碱时,多细胞原胚、球形胚、心形胚、鱼雷形胚(图 2)频率均较对照增加。

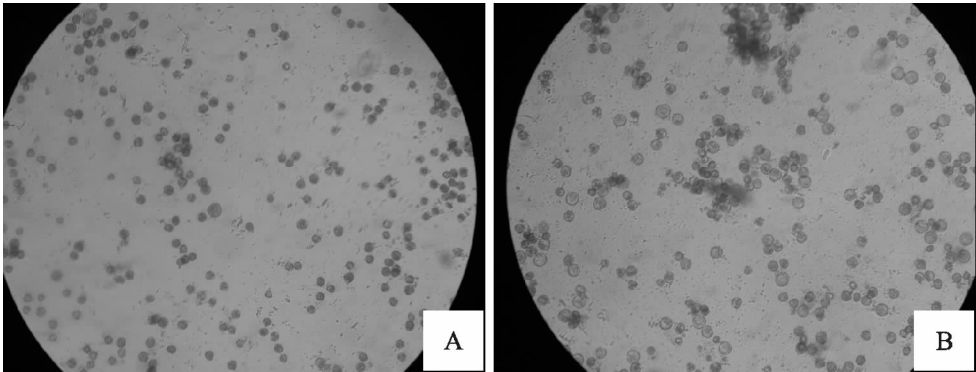


图 1 甘蓝小孢子培养 48 h 时膨大小孢子数量的比较

A. 对照;B. 秋水仙碱处理(10 mg/L)

Fig. 1 Comparison of the number of the swelling microspores after 48 h of isolated microspore in *B. oleracea* var. *capitata*

A. CK;B. Colchicine treatment (10 mg/L)

3 讨 论

获得足够数量胚状体是有效利用小孢子培养技

术的前提。前人在甘蓝型油菜等许多作物小孢子培养的研究中发现,用秋水仙碱直接处理游离小孢子,具有促进小孢子胚胎发生及显著提高产胚量的作用^[10-16],本研究在甘蓝小孢子培养研究中得到了相

同结果。但是关于秋水仙碱直接处理小孢子时的适宜浓度和适宜处理时间,各报道不尽一致。在甘蓝型油菜上,Zaki 等^[10]研究认为,用 25 mg/L 秋水仙碱处理 12 h 能显著提高产胚量;Iqbal 等^[11]在 57 个试验中有 69% 的试验结果表明,100 mg/L 秋水仙碱处理 24 h,产胚量比平均产胚量高 3 倍,其次为 10 mg/L 秋水仙碱处理 72 h,其产胚量比平均产胚量高 1.8 倍,而用 10~20 mg/L 秋水仙碱处理 18 h,并不能有效提高产胚量。石淑稳等^[12]研究认为,用 10~50 mg/L 秋水仙碱处理 48 h 或 100 mg/L 秋水仙碱处理 24 h,可使约 80% 基因型的每蕾产胚量达到 5 个以上。顾宏辉等^[13]在白菜型油菜(*Brassica rapa* ssp. *chinensis*)上的研究认为,用 0.8 mg/L 秋水仙碱处理 48 h 能显著提高产胚量。陆瑞菊等^[14]对青花菜研究认为,用 500 mg/L 秋水仙碱处

理 24 h 能显著提高胚状体发生频率,而当处理时间延长至 48 h 时,胚状体的发生频率为 0;在大麦上,陆瑞菊等^[15]用含 10 mg/L 秋水仙碱的 CM 溶液作为提取液和预处理液,研究发现,预处理小孢子群体 48 h 后,供试 3 份材料的胚状体产量均显著提高。而本研究结果显示,在甘蓝小孢子培养基中分别添加 1,10,50 mg/L 秋水仙碱,处理 48 h 均能有效提高产胚量。在本研究中,一代杂种及低代自交系材料在 1 或 10 mg/L 秋水仙碱处理时,每蕾产胚数的增加幅度较大,而高代自交系材料在 10 或 50 mg/L 秋水仙碱处理时,每蕾产胚数的增加幅度较大。其原因可能是一代杂种及低代自交系材料的小孢子对秋水仙碱较为敏感,但这一结果是否具有普遍性,还需做进一步的研究。

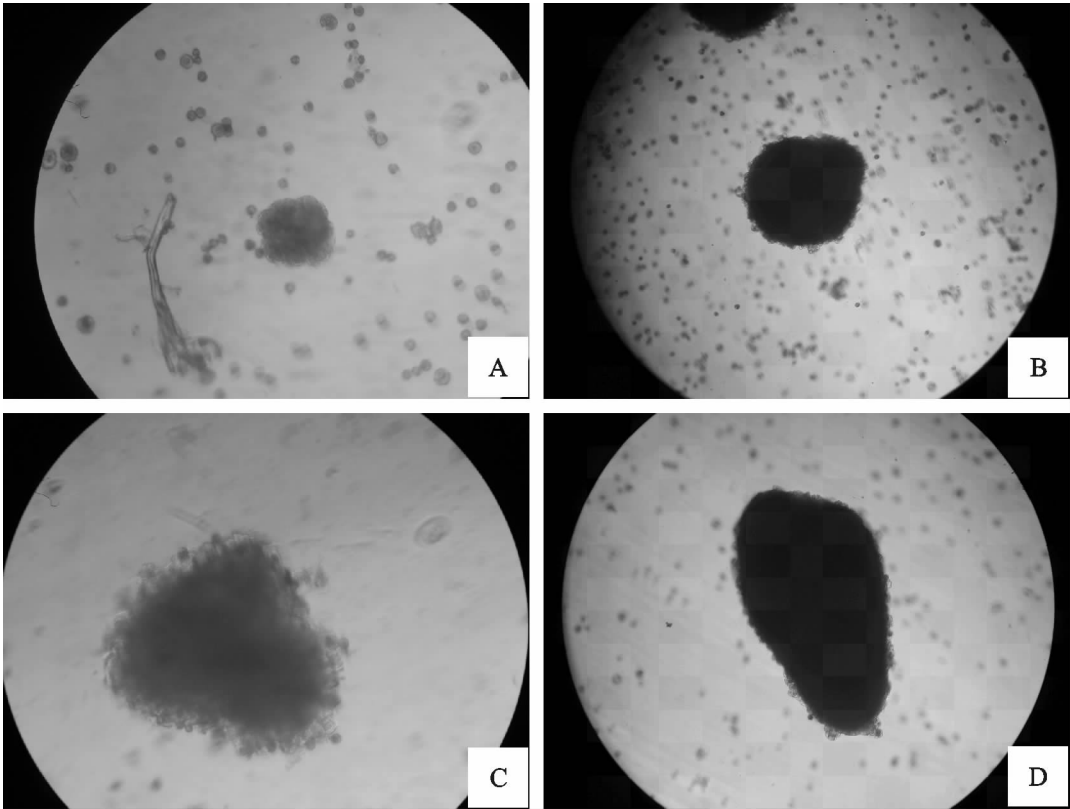


图 2 甘蓝小孢子培养过程中胚的发育情况

A. 多细胞原胚;B. 球形胚;C. 心形胚;D. 鱼雷形胚

Fig. 2 Embryo of different stages of isolated microspore in *B. oleracea* var. *capitata*

A. Multicellular proembryo;B. Globular embryo;C. Heart embryo;D. Torpedo embryo

小孢子膨大是其分裂的先兆,是向胚胎方向发育的重要标志。本研究结果表明,在甘蓝小孢子培养 48 h 时,添加秋水仙碱处理的膨大小孢子数量较对照明显增多,这与培养 48 h 后观察到的多细胞原

胚、球形胚、心形胚、鱼雷形胚频率较高,以及子叶形胚率提高直接相关。因此本研究认为,可通过观察培养 48 h 的小孢子形态,对胚胎发生情况进行早期预测,如果有小孢子膨大,则可能形成胚,膨大数量

愈多,则胚状体产量和子叶形胚率可能愈高。

子叶形胚是发育正常的成熟胚,具有良好的萌发和成苗潜力。周伟军等^[16]在甘蓝型油菜上的研究认为,用秋水仙碱直接处理小孢子可获得大量正常胚体,转入成苗培养基后能很好地萌发,并迅速长成植株,这与本研究结果类似。秋水仙碱是一种有效的染色体加倍剂,用其直接处理小孢子能使小孢子染色体加倍,而染色体加倍后的甘蓝小孢子为双单倍体,与有性杂交的合子胚相似,其胚胎发育状况理应较单倍体胚胎发育状况好。

从本研究结果来看,在今后对甘蓝新材料进行小孢子培养时,为了提高培养效果,用秋水仙碱直接处理小孢子时,应在本研究设定的质量浓度和处理时间基础上,多设几个质量浓度和处理时间组合,以期从中找到最适宜的处理组合。

[参考文献]

- [1] Juhast A G, Kristof Z, Vagi P, et al. *In vitro* anther and isolated microspore culture as tools in sweet and spice pepper breeding [J]. *Acta Horticulturae*, 2009, 829(6): 61-64.
- [2] Sidhu P K, Davies P A. Regeneration of fertile green plants from oat isolated microspore culture [J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(4): 571-577.
- [3] Segui-Simarro J M, Nuez F. Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by *in vitro* culture of tomato isolated microspores and whole anthers [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(5): 1119-1132.
- [4] Obert B, Szabo L, Mityko J, et al. Morphological events in cultures of mechanically isolated maize microspores [J]. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2005, 41(6): 775-782.
- [5] Cistue L, Soriano M, Castillo A M, et al. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture [J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25(4): 257-264.
- [6] 杨安平, 张恩慧, 尚丽荣, 等. 结球甘蓝 F₁、F₂、双交种及其亲本游离小孢子胚胎发生能力分析 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2009, 37(8): 171-176.
Yang A P, Zhang E H, Shang L R, et al. Analysis on embryogenic ability in isolated microspore culture of F₁, F₂, tetra-crossed hybrid and their parents in Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) [J]. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2009, 37(8): 171-176. (in Chinese)
- [7] 桑玉芳, 张恩慧, 杨安平, 等. 甘蓝游离小孢子培养中影响胚状体形成的主要因素 [J]. *西北农业学报*, 2007, 16(2): 125-129.
Sang Y F, Zhang E H, Yang A P, et al. Important factors in affecting embryoid formation of isolated microspore culture on *Brassica* [J]. *Acta Agricultural Aoreali-Occidentalis Sinica*, 2007, 16(2): 125-129. (in Chinese)
- [8] 方淑桂, 陈文辉, 曾小玲, 等. 结球甘蓝游离小孢子培养及植株再生 [J]. *园艺学报*, 2006, 31(1): 158-160.
Fang S G, Chen W H, Zeng X L, et al. Isolated microspore culture and plantlet regeneration in cabbage [J]. *Acta Horticultural Sinica*, 2006, 31(1): 158-160. (in Chinese)
- [9] 杨丽梅, 方智远, 刘玉梅, 等. 利用小孢子培养选育甘蓝自交系 [J]. *中国蔬菜*, 2003(6): 31-32.
Yang L M, Fang Z Y, Liu Y M, et al. Breeding of cabbage inbred line with microspore culture [J]. *China Vegetables*, 2003(6): 31-32. (in Chinese)
- [10] Zaki M, Dickinson H. Modification of cell development *in vitro*: The effect of colchicine on anther and isolated microspore culture in *Brassica napus* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1995, 40: 255-270.
- [11] Iqbal M C M, Mollers C, Robbelen G. Increased embryogenesis after colchicine treatment of microspore cultures of *Brassica napus* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1994, 143: 222-226.
- [12] 石淑稳, 吴江生, 周永明. 秋水仙碱对甘蓝型油菜离体小孢子胚胎发生的影响 [J]. *植物遗传资源学报*, 2005, 6(3): 286-290.
Shi S W, Wu J S, Zhou Y M, et al. Effects of colchicine on *in vitro* microspore embryo genesis in *Brassica napus* [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2005, 6(3): 286-290. (in Chinese)
- [13] 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 [J]. *作物学报*, 2004, 30(1): 78-81.
Gu H H, Zhang D Q, Zhou W J. Effects of medium renovation and colchicine treatment on embryogenesis of isolated microspores in *Brassica rapa* ssp. *chinensis* [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 30(1): 78-81. (in Chinese)
- [14] 陆瑞菊, 王亦菲, 孙月芳, 等. 提高青花菜游离小孢子培养反应的研究 [J]. *上海农业学报*, 2006, 22(2): 1-4.
Lu R J, Wang Y F, Sun Y F, et al. Study on improving responses of isolated microspore culture in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) [J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2006, 22(2): 1-4. (in Chinese)
- [15] 陆瑞菊, 黄剑华, 孙月芳, 等. 秋水仙碱对大麦离体培养小孢子存活与成苗的影响 [J]. *植物生理学报*, 2001, 27(2): 135-140.
Lu R J, Hang J H, Sun Y F, et al. The effect of colchicine on survival and regeneration of isolated microspores in barley [J]. *Acta Phytobiologica Sinica*, 2001, 27(2): 135-140. (in Chinese)
- [16] 周伟军, 毛碧增, 唐桂香, 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 [J]. *中国农业科学*, 2002, 35(4): 410-414.
Zhou W J, Mao B Z, Tang G X. Studies on efficient production of doubled haploid plants by colchicine treatments in microspore culture of *Brassica napus* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(4): 410-414. (in Chinese)