

春性甘蓝型油菜胚状体成苗影响因素的研究

罗玉秀^{1,2a}, 杜德志^{2b}, 唐国永^{2b}

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100; 2 青海大学 a 生物科学系, b 农林科学院, 青海 西宁 810016)

[摘要] **【目的】**通过对春性甘蓝型油菜胚状体成苗影响因素的研究,以提高胚状体成苗效率,缩短 DH 群体构建的时间。**【方法】**以小孢子培养获得的 5 964 个子叶形胚状体为材料,研究了胚状体长度、培养基分装方式、琼脂质量浓度、低温处理时间与胚状体成苗的关系。**【结果】**胚状体在固体培养基上的放置方式影响其形态发育;长度为 3~4 mm 的胚状体成苗率最高,达到 60.1%;分装方式Ⅲ,即分装 20 min 后封口,培养基凝固后表面没有积水的培养基出苗最好,成苗率达到 65.2%;随琼脂质量浓度的增加,胚状体成苗率呈先上升后下降的趋势,琼脂质量浓度为 12 g/L 时的成苗率最高,达到 61.3%;4 ℃ 低温处理 14 d 可使胚状体一次成苗率提高到 65.5%。**【结论】**缺氧和低温处理影响胚状体的形态发育;胚状体发育程度影响成苗率;相对干燥的环境有利于成苗;琼脂质量浓度通过影响培养基中可利用水的分配、培养瓶内湿度以及乙烯浓度影响小孢子胚成苗率;低温可能通过影响胚状体内源激素水平起到提高成苗率的作用。

[关键词] 春性甘蓝型油菜;小孢子培养;胚状体;成苗率

[中图分类号] S634.304⁺.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)11-0084-05

Studies on plantlet formation of microspore embryoid in spring *Brassica napus* L.

LUO Yu-xiu^{1,2a}, DU De-zhi^{2b}, TANG Guo-yong^{2b}

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

2 a Department of Biological Sciences, b Academy of Agriculture and Forestry, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract: **【Objective】** Factors affecting the plantlet of embryoid were studied in order to enhance plantlet rate of embryos. **【Method】** Using 5 964 embryoids obtained from microspore culture as material, the paper analyzed differences in the rate of seeding, which were caused by embryoid length, humidity in flask, agar concentration in B5 medium and low-temperature processing time. **【Result】** The way of placement in the solid medium affected embryoids morphological development. The seedling rate of 3—4 mm embryoid was the highest, reaching 61.3%. The seedling rate of the third-pecking method was the highest, reaching 65.2%. With the increase of agar concentration embryoid seedling rate increased first and then decreased. The medium with 12 g/L agar presented the highest seedling rate 61.3%. 4 ℃ low temperature treatment for 14 days obtained a seedling rate of 65.5%. **【Conclusion】** Hypoxia and low temperature treatment affected morphogenesis development of embryoid. Plantlet was related to the degree of embryoid development, humidity in flask, agar concentration and low-temperature treatment time. B5 + 1.2% agar was a suitable medium. Low temperature treatment at 4 ℃ for 14 days was the best.

Key words: spring *Brassica napus* L.; microspore culture; embryoid; seedling rate

* [收稿日期] 2010-04-07

[基金项目] 青海省科技厅项目(2009-Z-702)

[作者简介] 罗玉秀(1969—),女,青海民和人,教授,在读博士,主要从事油菜遗传育种研究。E-mail: lyxiu2@yahoo.com.cn

[通信作者] 杜德志(1964—),男,江西吉安人,研究员,博士生导师,主要从事油菜遗传育种研究。E-mail: qhrapb@126.com

油菜小孢子培养技术在作物育种^[1-2]、物种进化^[3]、遗传分析^[4]、连锁图谱构建^[5]、数量性状基因定位^[6]、遗传转化^[7]等研究领域应用广泛,且在油菜基础研究和应用研究中都较传统方法具有明显的优势。因此,小孢子培养受到了遗传、育种等领域工作者的广泛关注。

自 1981 年,Lichter^[8]首次报道在甘蓝型油菜中进行游离小孢子培养获得成功后,国内外许多学者对该项技术进行了发展和完善。我国在小孢子培养方面的研究很多,主要集中于影响小孢子培养效率的因素^[9]、染色体加倍技术^[10]、再生苗移栽技术^[11]等方面,并初步建立了高效小孢子培养技术体系^[12]。但在利用小孢子培养技术进行图谱构建及基因定位等方面的研究时发现,春性甘蓝型油菜小孢子胚诱导频率高^[13],但小孢子胚成苗率、加倍率低,DH 群体构建时间长、难度大,限制了该项技术的广泛应用^[14]。为此,本试验以小孢子培养获得的子叶形胚状体为材料,研究了胚状体长度、培养基分装方式、低温处理时间、琼脂质量浓度与胚状体成苗的关系,旨在提高 DH 群体构建的效率。

1 材料与方法

1.1 材 料

供试材料为春性甘蓝型油菜杂种 F₁ 小孢子培养获得的 5 964 个子叶形胚状体。

1.2 方 法

1.2.1 小孢子培养 应用油菜小孢子培养技术进行春性甘蓝型油菜杂种 F₁ 的小孢子培养,获得胚状体。小孢子培养技术参照 Lichter^[8]的方法并略有改进:35℃热击 4 d,然后转入 25℃静止培养 12~15 d,当肉眼看见胚状体后转入 22.4℃、54 r/min 的摇床上培养,7~12 d 后在 4℃下进行低温处理,然后转到 B5 固体培养基上,在光照 14 h、20℃培养室培养。1 个月后统计胚状体直接成苗率。

1.2.2 胚状体在固体培养基上的形态发育 取低温处理 7 d、长 3~4 mm 的胚状体,以平放或竖插方式接种。将低温处理 0,7 和 12 d 的胚状体以竖插方式接种。观察胚状体早期形态发育,待第 1 片真叶长出时,测量子叶着生点至培养基表面的距离。

1.2.3 胚状体长度对成苗率的影响 将低温处理 12 d 的胚状体按长度分为 5 组,即<2 mm、2~3 mm、3~4 mm、4~5 mm、≥5 mm,将其以竖插方式接种于琼脂质量浓度为 12 g/L、培养基分装方式为Ⅲ的 B5 培养基上培养。

1.2.4 培养基分装方式对成苗率的影响 培养瓶内湿度通过培养基分装方式来控制,I 为先分装再灭菌,培养基凝固后表面积水较多;Ⅱ为灭菌后即刻分装,边分装边封口,培养基凝固后表面有少量积水;Ⅲ为分装 20 min 后封口,培养基凝固后表面没有积水。培养基琼脂质量浓度为 12 g/L。将低温处理 12 d 且长度基本一致(3.5 mm)的胚状体转接到培养基分装方式 I、Ⅱ、Ⅲ的培养基中培养。

1.2.5 琼脂质量浓度对成苗率的影响 将低温处理 12 d 且长度基本一致(3.5 mm)的胚状体,转接到含 7,10,11,12,13,14 g/L 琼脂,分装方式为Ⅲ的培养基中培养。

1.2.6 低温处理时间对成苗率的影响 将低温处理 0,7,11,12,13,14,15,16,17,23,24 d,且胚状体长度基本相同的胚状体,转接到琼脂质量浓度为 12 g/L、培养基分装方式为Ⅲ的培养基中培养。

胚状体转到固体培养基上 21 d 后,统计死亡的胚状体、愈伤组织、玻璃苗和正常苗的个数,计算其百分比。

2 结果与分析

2.1 胚状体在固体培养基上的形态发育

胚状体转到固体培养基上,1 d 后胚状体两极开始萌动。平放的胚状体胚根首先伸长,且伸长速度快,下胚轴随之缓慢伸长,第 1 片真叶出现时,子叶至培养基表面的平均距离为 1.2 cm。竖插的胚状体,下胚轴伸长速度快,胚根伸长速度较慢,第 1 片真叶出现时,子叶至培养基表面的平均距离为 1.5 cm。2 种接种方式间成苗率差异不显著。随低温处理时间的延长,胚状体下胚轴伸长速度加快,第 1 片真叶出现时,低温处理 0,7 和 12 d 的胚状体子叶至培养基表面的距离依次为 0.8,1.5 和 2.2 cm,成苗率依次为 3%,52.4%和 60.1%。

2.2 胚状体长度对小孢子胚成苗率的影响

小孢子植株主要来源于发育健康的胚状体,畸形胚状体很难在固体培养基上生长发育,褐化胚及时转接到 B5 培养基上同样可萌发成苗。从表 1 可以看出,成苗率随胚状体长度的增加呈低-高-低的趋势。其中 3~4 mm 的胚状体成苗率最高(60.1%),死亡率最低;<2 mm 的胚状体成苗率低,死亡率为 42.1%;≥5 mm 的胚状体死亡率高、成苗率低,58.9%的胚状体形成了愈伤组织。

2.3 培养基分装方式对小孢子胚成苗率的影响

从表 2 可知,随培养瓶内湿度降低,胚状体成苗

率增加,愈伤组织减少,玻璃苗的比例和死亡率变化不大,其中以方式Ⅲ分装的培养基出苗最好,成苗率

达到 65.2%。本试验通过培养基的分装方法对培养瓶内湿度进行粗略控制,但对瓶内湿度未作测定。

表 1 胚状体长度对小孢子胚成苗率的影响

Table 1 Effect of embryo size on the seedling rate of embryo

胚状体长度/mm Embryo size	胚状体数 Embryo	死亡率/% Mortality	愈伤组织/% Percentage of callus	玻璃苗/% Percentage of vitrification	成苗率/% Percentage of normal seedling
<2	200	42.1	15.4	4.2	38.3
2~3	200	4.3	36.3	6.7	52.7
3~4	200	2.5	31.3	6.1	60.1
4~5	200	10.4	53.8	5.3	30.5
≥5	200	27.9	58.9	5.0	8.2

表 2 培养基分装方式对小孢子胚成苗率的影响

Table 2 Effect of humidity on the seedling rate of embryo

培养基分装方式 Humidity	胚状体数 Embryo	死亡率/% Mortality	愈伤组织/% Percentage of callus	玻璃苗/% Percentage of vitrification	成苗率/% Percentage of normal seedling
I	200	5.0	39.7	7.3	48.0
II	200	4.8	27.7	7.2	60.3
III	200	5.3	23.0	6.5	65.2

2.4 琼脂质量浓度对小孢子胚成苗率的影响

从表 3 可知,随琼脂质量浓度的增加,胚状体死亡率呈上升趋势,琼脂质量浓度从 7 g/L 提高到 14 g/L,胚状体死亡率从 3.6%增加到 13.5%,愈伤组织和玻璃苗的比例呈下降趋势,胚状体的成苗率呈

先上升后下降趋势;琼脂质量浓度为 12 g/L 时的成苗率最高,达到 61.3%;琼脂质量浓度大于 12 g/L 时,胚状体死亡率增加,成苗率减少。灭菌 2 次的 B5 培养基固化效果差,在这种培养基上培养的小孢子胚只能形成愈伤组织,无法诱导成苗。

表 3 琼脂质量浓度对小孢子胚成苗率的影响

Table 3 Effect of agar concentration on the seedling rate of embryo

琼脂质量浓度/(g·L ⁻¹) Agar concentration	胚状体数 Embryo	死亡率/% Mortality	愈伤组织/% Percentage of callus	玻璃苗/% Percentage of vitrification	成苗率/% Percentage of normal seedling
A	292	1.0	99.0	0	0
7	303	3.6	55.2	11.2	30.0
10	714	4.2	51.2	8.4	36.2
11	298	5.4	29.5	6.0	59.1
12	357	7.0	26.5	5.2	61.3
13	256	10.3	25.8	5.0	58.9
14	220	13.5	26.0	5.0	55.5

注:A 表示琼脂质量浓度为 12 g/L,灭菌 2 次的培养基。Note:A concentration of 12 g/L agar,sterile medium twice.

表 4 低温处理时间对小孢子胚成苗率的影响

Table 4 Effect of low-temperature treatment time on the seedling rate of embryo

低温处理时间/d Low-temperature treatment time	胚状体数 Embryo	死亡率/% Mortality	愈伤组织/% Percentage of callus	玻璃苗/% Percentage of vitrification	成苗率/% Percentage of normal seedling
0	177	1.2	88.7	7.1	3
7	241	2.3	35.5	9.8	52.4
11	223	3.0	34.8	7.5	54.7
12	250	4.3	28.7	6.9	60.1
13	245	5.3	27.7	7.0	60.0
14	247	5.4	21.6	7.5	65.5
15	250	6.7	28.8	6.4	58.1
16	224	10.9	35.7	6.9	46.5
17	217	24.9	29.2	7.5	38.4
23	142	52.5	25.7	7.6	14.2
24	184	57.2	26.5	8.0	8.3

2.5 低温处理时间对小孢子胚成苗率的影响

研究结果显示,低温处理时期(转接到固体培养基之前或之后进行低温处理)对成苗率的影响不明显,而低温处理时间影响胚状体成苗率。如表 4 所示,随着低温处理时间的延长,成苗率呈先上升后下降的趋势,低温处理 14 d 的胚状体成苗率最高,达到 65.5%,未进行低温处理的胚状体 88.7%形成了愈伤组织,只有 3.0%的胚状体一次性成苗。低温处理 24 d 的胚状体有 57.2%死亡,只有 8.3%成苗。玻璃苗的形成与低温处理时间关系不大。

3 讨 论

3.1 胚状体在固体培养基上的形态发育

胚状体萌发初期胚根的生长主要靠细胞分裂方式进行,若没有充足的氧气供应,呼吸作用将受到抑制,细胞分裂不能进行,根也就无法伸长^[15-16]。胚状体竖插时,胚根周围氧分含量少,胚根细胞分裂受到抑制^[12]。本研究结果表明,胚状体接种方式和低温处理时间影响胚状体下胚轴伸长的速度。而下胚轴伸长速度与内源激素水平有关,说明低温处理和根部缺氧可诱发胚状体内源激素的表达水平提高^[17]。

3.2 胚状体长度对小孢子胚成苗率的影响

以往对成苗率的研究结果不尽一致,有的认为培养 30 d 的胚成苗率最高;有的认为胚状体长度为 3~5 mm 时,随着胚状体长度的增加,成苗率提高;有的认为子叶形胚状体的成苗率最高^[18-20]。本研究结果表明,子叶期胚状体成苗率随胚状体长度的增加呈低-高-低趋势变化,3~4 mm 胚状体成苗率最高,死亡率最低。表明胚状体成苗率与其长度有关,而胚状体的长度与其发育程度有关。因此,胚状体成苗率与其发育程度有关。但胚状体发育程度的界定方法和最佳接种时期还有待进一步研究。

3.3 培养基分装方式对小孢子胚成苗率的影响

小孢子胚在萌发前对有对相对干燥环境的生理需求,降低培养瓶的相对湿度可提高成苗率,降低玻璃苗的比率^[18-21]。本研究结果表明,培养瓶内相对湿度影响成苗率,相对干燥的环境有利于成苗,相对湿度对胚状体死亡率影响不大。有关培养瓶内湿度的控制和测定方法以及小孢子胚成苗的最佳温、湿度还有待进一步研究。

3.4 琼脂质量浓度对小孢子胚成苗率的影响

本研究结果表明,当琼脂质量浓度为 7~12 g/L 时,B5 培养基中的琼脂质量浓度与胚状体成苗率和死亡率呈正相关,与小孢子胚玻璃化和愈伤组

织形成呈负相关;当琼脂质量浓度高于 12 g/L 时,胚状体死亡率与成苗率呈负相关。琼脂最主要的作用是使液体培养基凝固,琼脂本身并不提供任何营养,培养基中的琼脂质量浓度影响培养基中的可利用水分及培养瓶中的相对湿度。植物细胞在体外培养过程中会产生乙烯,尤其在密闭的容器中,乙烯通过累积会达到一个较高的浓度,高浓度乙烯易引起芽分化率降低,导致再生芽生长发育的玻璃化,而培养基中琼脂质量浓度的高低影响着容器中乙烯的浓度^[16-23]。说明琼脂质量浓度通过影响培养基中可利用水的分配、培养瓶内湿度以及乙烯浓度,从而影响小孢子胚状体的成苗率。

3.5 低温处理时间对小孢子胚成苗率的影响

低温处理有利于提高成苗率^[24]。胚状体转接到固体培养基后,经 4 ℃低温诱导 9~12 d 可以提高成苗率^[18]。本研究结果表明,胚状体进行低温处理的时期(接种前和接种后)对成苗率的影响不大,但前者胚处理所需空间小,操作方便可行;低温处理能促进胚状体成苗,低温处理 14 h 内,低温处理时间与成苗率呈正相关,但低温处理时间过长,胚生活力下降,成苗率也随之下降。B5 培养基中添加微量 GA₃ 有利于胚状体发育为小植株^[24-25]。低温处理能引起川贝母胚状体内过氧化物酶活性及表达量增加,认为过氧化物酶是小孢子胚成苗的一个重要因素^[26]。因此,低温可能通过影响胚状体内源激素水平起到提高成苗率的作用。

4 结 论

缺氧和低温处理影响小孢子胚的形态发育。胚状体发育程度影响成苗率,相对干燥的环境有利于成苗,琼脂质量浓度通过影响培养基中可利用水的分配、培养瓶内湿度以及乙烯浓度影响小孢子胚成苗率,低温可能通过影响胚状体内源激素水平起到提高成苗率的作用。

〔参考文献〕

- [1] 李 慧,胡胜武,李 玮,等.甘蓝型油菜隐性上位互作核不育系的选育及其细胞学研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2010,38(1):111-118.
Li H,Hu S W,Li W,et al. Breeding of RGMS lines and investigation on there cytology in *Brassica napus* L. [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2010,38(1):111-118. (in Chinese)
- [2] 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[J].西南农业学报,2003,16(2):34-36.

- He J M, Wang J Q, Cheng W, et al. Studies on rapidly obtaining high oleic acid germplasm of *Brassica napus* by mutagen EMS and microspore culture [J]. Southwest China Journal of Agriculture Sciences, 2003, 16(2): 34-36. (in Chinese)
- [3] 栗茂腾, 张椿雨, 刘列判, 等. 芸薹属 A、B 和 C 基因组之间关系研究进展 [J]. 遗传, 2005, 24(4): 671-676.
Li M T, Zhang C Y, Liu L Z, et al. Development of relationship between A, B and C genomes in *Brassica* genera [J]. Hereditas, 2005, 24(4): 671-676. (in Chinese)
- [4] Chen W, Zhang Y, Liu X P, et al. Detection of QTL for six yield-related traits in oilseed rape using DH and immortalized F₂ populations [J]. Theor Appl Genet, 2007, 115: 849-858.
- [5] Huang Z, Chen Y F, Yi B, et al. Fine mapping of the recessive genic male sterility gene (Bnms3) in *Brassica napus* L. [J]. Theor Appl Genet, 2007, 115: 113-118.
- [6] Zhao J Y, Zoran D, Heiko C, et al. Mapping QTL controlling fatty acid composition in a doubled haploid rapeseed population segregating [J]. Mol Breeding, 2008, 21: 115-120.
- [7] 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 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(2): 18-23.
Wang X F, Wang H Z, Liu G H, et al. Genetic transformation of isolated microspores from *Brassica napus* with bivalent genes [J]. Journal of Agriculture Biotechnology, 2004, 12(2): 18-23. (in Chinese)
- [8] Lichter R. Anther culture of *Brassica napus* in a liquid culture medium [J]. Z Pflanzenphysiol Bol, 1981, 103: 229-237.
- [9] 李浩杰, 蒲晓斌, 张锦芳, 等. 甘蓝型油菜小孢子培养影响因素的研究 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(23): 82-85.
Li H J, Pu X B, Zhang J F, et al. Influencing factors on microspore culture of *Brassica napus* L. [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(23): 82-85. (in Chinese)
- [10] 周伟军, 唐桂香, 张国庆. 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, Tang G X, Zhang G Q. 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)
- [11] 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 [J]. 浙江农业学报, 2003, 15(4): 219-222.
Zhang D Q, Gu H H, Zhang Y F, et al. Studies on plant regeneration isolated from microspore culture of a new canola variety Zheshuang 72 (*Brassica napus*) [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2003, 15(4): 219-222. (in Chinese)
- [12] 梅德圣, 李云昌, 胡琼, 等. 油菜小孢子培养技术体系研究 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 72-76.
Mei D S, Li Y C, Hu Q, et al. Studies on the technical system of microspore culture in rapeseed [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(2): 72-76. (in Chinese)
- [13] 星晓蓉, 杜德志, 李秀萍. 春性甘蓝型油菜小孢子培养技术研究 [J]. 西北农业学报, 2007, 16(1): 23-26.
Xing X R, Du D Z, Li X P. Studies on the technical system of microspore culture in rapeseed [J]. Acta Agriculture Boreali-Occidentalis Sinica, 2007, 16(1): 23-26. (in Chinese)
- [14] Li C, Lin M, Yang B, et al. Optimization of culture techniques for DH line in *Brassica napus* L. [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(4): 73-77.
- [15] 吴磊, 吴冕, Karin S, 等. 一种快速生长的甘蓝型油菜 DH 系的获得和鉴定 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(4): 318-391.
Wu L, Wu M, Karin S, et al. Obtainment and characterization of DH lines of a rapid-cycling *Brassica napus* L. [J]. Plant Physiology Communications, 2009, 45(4): 318-391. (in Chinese)
- [16] 陈维培, 张四美, 严素珍, 等. 油菜下胚轴与幼苗生长关系的初步探讨 [J/OL]. 2009-04-24. <http://202.119.108.225>.
Chen W P, Zhang S M, Yan S Z, et al. Study on the relationship between rapeseed hypocotyls and seedling growth [J/OL]. 2009-04-24. <http://202.119.108.225>.
- [17] 李超, 林茂. 甘蓝型油菜 DH 系培养技术优化 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(32): 18-21.
Li C, Lin M. Optimization of culture techniques for DH line in *Brassica napus* L. [J]. Journal of Anhui Agriculture Sciences, 2008, 36(32): 18-21. (in Chinese)
- [18] 叶梅荣, 朱昌华, 甘立军, 等. 激素间相互作用对植物茎伸长生长的调控综述 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(4): 78-82.
Ye M R, Zhu C H, Gan L J, et al. Hormonal interactions in the control of plant stem elongation [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(4): 78-82. (in Chinese)
- [19] 姜凤英, 冯辉, 王超楠. 羽衣甘蓝的小孢子胚诱导和植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(6): 725-727.
Jiang F Y, Feng H, Wang C N. Embryogenesis and plant regeneration from isolated microspore culture of kale [J]. Plant Physiology Communications, 2005, 41(6): 725-727. (in Chinese)
- [20] 桑玉芳, 张恩慧, 杨安平. 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. Important factors in affecting embryoid formation of isolated microspore culture on *Brassica* [J]. Acta Agriculture Boreali-Occidentalis Sinica, 2007, 16(2): 125-129. (in Chinese)
- [21] Zaki M, Dickinson H. Microspore-derived embryos in *Brassica*: the significance of division symmetry in pollen mitosis to embryogenic development [J]. Sex Plant Reprod, 1991, 4: 48-55.
- [22] Zhou W J, Tang G X, Hagberg P. Efficient production of doubled haploid plants by mediate colchicine treatment of isolated microspores in winter *Brassica napus* [J]. Plant Growth Regulation, 2002, 37: 185-192.
- [23] Zhou W J, Mao B Z, Gu H H, et al. Effects of colchicine with heat shock and cold induction on plant regeneration from microspore-derived embryos in *Brassica napus* [J]. Acta Agro Sin, 2002, 28: 369-373.