

甘蓝型油菜小孢子培养影响因素 研究及再生苗早期倍性鉴定

米 哲 李云昌 梅德圣 李英德 徐育松 陈玉峰 胡 琼

(中国农业科学院 油料作物研究所 国家油料作物改良中心 农业部油料作物生物学重点开放实验室 湖北 武汉 430062)

摘要: 对不同年份、不同地点种植的油菜育种材料进行小孢子产胚率鉴定,并以 11 种不同基因型的甘蓝型油菜品系为供体材料,在武汉田间,分别于初花期和盛花期分离培养小孢子,研究基因型、生态条件、开花时间对小孢子产胚率的影响及秋水仙碱处理的加倍效果。通过采用流式细胞仪测定小孢子再生苗的 DNA 含量鉴定其倍性,并种植验证。结果表明:相同基因型在不同生态条件下种植及不同基因型间产胚率差异很大,西宁春播种植产胚率显著高于武汉秋播种植;大田条件下,初花期分离的小孢子产胚率显著高于盛花期。不同基因型油菜小孢子再生苗的自然加倍率也有差异,变异幅度为 8.62% ~ 20.88%。用 50 mg/L 秋水仙碱处理小孢子可以显著增加二倍体再生苗数量,加倍率最高可提高 3 倍以上,达到 60% ~ 77.59%。利用流式细胞仪测定小孢子再生苗的 DNA 含量鉴定再生植株的倍性与田间鉴定结果一致,可以作为小孢子再生植株早期倍性鉴定的有效手段。

关键词: 油菜;小孢子培养;DNA 含量;倍性鉴定

中图分类号: S634.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)05-0097-06

Factors Affecting Microspore Embryogenesis and Early Ploidy Level Determination of Regenerated Plants in *Brassica napus*

MI Zhe ,LI Yun-chang ,MEI De-sheng ,LI Ying-de ,XU Yu-song ,CHEN Yu-feng ,HU Qiong

(Oil Crops Research Institute ,Chinese Academy of Agricultural Sciences ,National Center for Oil Crops Improvement ,
Key Laboratory for Biological Sciences of Oil Crops ,Ministry of Agriculture ,Wuhan 430062 ,China)

Abstract: The breeding materials of *Brassica napus* grown in different ecological regions and years were used to determine their microspore embryogenesis capacity. The microspores of 11 genotypes grown in field condition of Wuhan ,Hubei Province ,were isolated at different flowering stages and cultured. The aim of this study was to investigate the effects of genotype ,ecological condition and sampling time on microspore embryogenesis ,as well as the colchicine treatment on chromosome doubling of regenerated seedlings. Ploidy level of regenerated plants was determined according to DNA content measured by flow cytometric analysis and confirmed by field observation. The results showed that the microspore embryogenesis was significantly different among the genotypes and in different ecological conditions. The plants sown in the summer in Xining ,Qinghai Province ,had significantly higher microspore embryogenesis than those sown in the spring in Wuhan ,Hubei Province. The microspores isolated at early flowering stage (1 - 3 days) gave rise to significantly higher embryogenesis than those isolated at full flowering stage (12 - 15 days after flowering) . The treatment of 50 mg/L colchicine directly on isolated microspores for 24 h could significantly increase the number of diploids in regenerated plants. The spontaneous chromosome doubling rate of regenerated plants ranged from 8.62% to 20.88% for different genotypes ,whereas the colchicine treatment could raise the chromosome doubling rate to 60% - 77.59% . The ploidy level of regenerated plants determined by flow cytometry was consistent with the result observed in the field ,so the flow cytometry provided a useful means for early dihaploid discrimination of microspore-derived plants.

收稿日期: 2011-04-26

基金项目: 国家科技支撑计划(2010BAD35B04) ; 油菜现代产业技术体系建设(ngytx-005)

作者简介: 米 哲(1985-) ,男,河北石家庄人,硕士,主要从事油菜生物技术和育种工作。

通讯作者: 胡 琼(1966-) ,女,安徽霍邱人,研究员,主要从事油菜遗传育种工作。

Key words: Oilseed rape; Microspore culture; DNA content; Ploidy identification

利用小孢子培养技术可以在短时间内获得大量双单倍体(Dihaploid, DH)群体,在油菜及其近缘作物的遗传研究及育种应用中均具有十分重要的意义^[1,2]。小孢子培养可以迅速纯化遗传背景复杂的材料,获得纯合自交系,从而缩短育种周期,加速育种进程,利用小孢子培养育成了油菜品种中双9号^[3]、大白菜品种豫白菜11号^[4]等。利用小孢子诱变结合早期筛选还可以在短时间内产生大量遗传性一致的突变体,为创造特殊种质资源提供了新途径。在油菜中通过小孢子诱变已经培育出具有抗病核病^[5]、抗除草剂^[6]及高油酸含量^[7,8]等性状的新品种(系)。

影响油菜小孢子成胚的因素很多,包括基因型、取样时期、小孢子发育时期、植株生长条件、小孢子接种密度、培养基种类等^[9,10]。余凤群等^[11]以130份甘蓝型油菜品种(系)和杂种F₁为材料进行小孢子培养,能获得胚状体的材料只有35份。宋来强等^[12]研究发现,基因型对出胚起决定性的作用,不同品种间甚至同一品种内的个体间,胚诱导频率差异显著。牛应泽等^[13]认为,取样时间以主花序第1朵花开后6 d左右为宜。刘志文等^[14]则认为,在单株第1朵花开后6~20 d内取样,培养小孢子都能获得最高的产胚率。可见,不同生态环境及基因型对油菜小孢子产胚率影响很大。研究特定条件下种植或特定基因型在不同取样时期小孢子产胚率的差异,对加快油菜育种进程具有重要的指导意义。

小孢子再生植株往往是单倍体、双倍体或其他倍性植株的混合群体^[15,16],有效的早期倍性鉴定有利于对检测出单倍体植株适时进行加倍处理。常规的倍性鉴定主要通过染色体数和植株形态观察进行^[17]。但是染色体压片对技术的要求高,受取样时间、部位及材料预处理等影响较大。形态学鉴定必须在植株生长发育的后期(主要是开花期)才能进行,往往导致错过了最佳染色体加倍时期。流式细胞仪(Flow cytometer, FCM)对处于快速直线流动状态的单个细胞进行逐个、多参数、快速的定性和定量分析,可以高通量测定大量分裂间期细胞的DNA含量,从而快速鉴定植株的倍性,在细胞分裂活动分析、亲缘关系评价、远缘杂交后代鉴定中应用广泛^[18,19]。为此,在研究取样时间对大田种植条件下不同基因型影响的基础上,利用流式细胞仪鉴定甘蓝型油菜小孢子再生植株的倍性,研究不同基因型的小孢子经秋水仙碱处理后培养获得的再生苗倍性

变化情况,以明确FCM倍性鉴定在油菜育种中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以来自中国农业科学院油料作物研究所油菜杂种优势利用课题组的甘蓝型油菜品种(系)及其杂交后代为材料,分别在2008年春、2009年春、2010年春在青海西宁和2009年秋在湖北武汉播种17个品种(系)、3个高世代选系和6个F₁,花期取样培养,进行小孢子产胚率调查。

1.2 小孢子分离培养与植株再生

小孢子分离和培养程序参照梅德圣^[20]的方法,略作改进。小孢子分离时使用孔径38 μm滤网过滤,将小孢子重悬于含有50 mg/L秋水仙碱(对照为0 mg/L)的NLN-46培养基中加倍处理2 d。转入到NLN-46培养基中培养至子叶形胚形成后,转入B₅固体培养基诱导再生苗,约30 d继代1次。在小孢子再生植株4~6片叶时,移栽至营养钵中,置于25℃、16 h光周期、湿度50%~60%的温室中,并定期浇水、炼苗,待再生植株成活后移至田间。

为研究在植株不同生长时间取样对小孢子产胚率的影响,2010年春在武汉选取9个基因型,分别在初花期(植株第1朵花开后1~3 d)和盛花期(植株第1朵花开后12~15 d)取样,分离接种小孢子进行培养,每处理选取70个花蕾,调查产胚率。

1.3 流式细胞仪倍性分析

流式细胞仪购自美国Beckman-Coulter公司(型号为Cell Lab Quanta SC),供试试剂如DAPI(4,6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸盐)染液、Flow-Check荧光微球、鞘液、关机液等均购自美国Beckman-Coulter公司。倍性鉴定时,采用鲑鱼红细胞作为标准二倍体参比(其细胞核DNA含量为 3.8×10^{-12} g)。被测样品细胞核DNA绝对含量根据样品和参比的G1平均荧光值计算,样品细胞核DNA含量=(样本G1平均荧光值/参比G1平均荧光值)×参比细胞核DNA含量。

1.3.1 样品的制备和染色 取新鲜幼嫩叶片200 mg,放置培养皿内,加入500 μL预冷细胞核分离液(200 mmol/L Tris, 4 mmol/L MgCl₂, 85.6 mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 7.5)^[21],用刀片切碎,经孔径38 μm滤网过滤,收集滤液置于样品杯中,加入50 μL DAPI染液和50 μL参比(1滴鲑鱼红细

胞和 600 μ L DAPI 染液混合液,充分混匀置冰上备用)。细胞样品需保持足够的细胞数量,约 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL^[22]。

1.3.2 分析检测及结果统计 开机时,首先设置流式细胞仪的光路为汞弧灯滤片,打开电脑,运行软件 Cell Lab Quanta SC。按照软件提示,依次开启流式细胞仪的电源,将装满鞘液的容量瓶(1.6 L)取代关机液连接到仪器,开启汞弧灯,执行管路清洁步骤。完成开机后,仪器需预热 30 min 才可使用。测定时,用 Flow-Check 荧光微球确认机器光路系统是否精准,流液系统是否顺畅,设定仪器基准条件为样品流速 4.17 μ L/min,光电倍增管电压值(PMT Voltage)为 7~9V,变异系数(CV)小于 3.0%。确认机器稳定后,进行样品分析。

将制备好的新鲜细胞悬浮液样品与参比和 DAPI 染液置于样品杯中,充分混匀后放置在仪器样口。点击与仪器相连的电脑中分析软件的 Start 键,进样口自动吸取样品并开始计数,直到完成 10 000 个细胞分析时停止,系统自动将结果储存在硬盘中。点击 Recover sample 键回收样品,随后点击 Raise 键清理流液系统,为分析下一个样品做准备。

2 结果与分析

2.1 不同基因型及不同取样时间甘蓝型油菜小孢子出胚情况

青海春季种植的材料产胚率明显高于武汉秋季种植的材料。2008-2010 年夏季油菜花期,在西宁共调查 20 个基因型,其中 2008、2009 年调查的材料全部出胚,2008 年 5 个材料的产胚率平均为 2.63 枚/蕾,变幅 0.52~6.03 枚/蕾;2009 年 7 个材料的平均产胚率为 3.36 枚/蕾,变幅为 1.25~4.97 枚/蕾;2010 年 11 个基因型中有 7 个成功出胚,平均产胚率为 1.93 枚/蕾,变幅为 0.12~7.69 枚/蕾,4 个材料没有出胚。而在武汉调查的 10 个材料中只有 5 个成功出胚,平均产胚率为 5.34 枚/蕾,变幅为 0.25~17.93 枚/蕾。以渝黄 1 号选系的产胚率最高,但该材料没有在青海春季种植鉴定。相同基因型在青海种植取样培养可以出胚,但在武汉种植取样培养则不能出胚,如 8908B、中双 11 号、(川 2121 选 \times 杂 763 选) F_1 。其中产胚率较高的材料有渝黄 1 号选系、川 2121 选系、8908B、R2 和 RN13。

不同发育时期植株上分离出的小孢子产胚率差异较大,在植株初花期分离接种的小孢子产胚率明显高于盛花期分离接种的小孢子产胚率。在武汉种植条件下取样可以出胚的 9 个基因型,初花期小孢

子平均产胚率为 1.93 枚/蕾,变幅为 0.31~6.43 枚/蕾;在盛花期分离接种小孢子,除了 4 个基因型完全没有胚状体发生外,出胚的 5 个基因型的平均产胚率只有 0.50 枚/蕾,变幅为 0.36~1.71 枚/蕾。尽管这 5 个基因型在盛花期分离接种有胚状体发生,但平均产胚率远低于初花期分离接种的小孢子产胚率,最高差别在 5 倍以上,如编号为 16 的材料,其初花期产胚率为 6.43 枚/蕾,盛花期产胚率仅为 1.14 枚/蕾(表 1)。

表 1 基因型和取样时间对甘蓝型油菜小孢子产胚率的影响

Tab.1 Effect of genotype and sampling time on microspore embryogenesis in *B. napus*

基因型 Genotype	取样时期 Sampling time	花蕾数/个 No. of buds	胚数/枚 No. of embryos	产胚率/(枚/蕾) No. embryos /bud
5746	初花期	70	22	0.31
	盛花期	70	0	0.00
7775	初花期	70	151	2.16
	盛花期	70	0	0.00
7865	初花期	70	28	0.40
	盛花期	70	0	0.00
16	初花期	70	450	6.43
	盛花期	70	80	1.14
30	初花期	70	166	2.37
	盛花期	70	120	1.71
32	初花期	70	42	0.60
	盛花期	70	2	0.00
34	初花期	70	143	2.04
	盛花期	70	50	0.71
61	初花期	70	115	1.64
	盛花期	70	36	0.51
120	初花期	70	96	1.37
	盛花期	70	25	0.36

2.2 甘蓝型油菜小孢子再生植株的倍性鉴定

用流式细胞仪对 353 株小孢子再生植株的细胞核 DNA 进行检测,其细胞核 DNA 含量的变异幅度为 $1.27 \times 10^{-12} \sim 4.91 \times 10^{-12}$ g,主要集中在 3 个区域,分别为 $1.27 \times 10^{-12} \sim 1.43 \times 10^{-12}$ g、 $2.23 \times 10^{-12} \sim 2.54 \times 10^{-12}$ g、 $4.58 \times 10^{-12} \sim 4.91 \times 10^{-12}$ g,平均值分别为 1.39×10^{-12} g、 2.38×10^{-12} g、 4.73×10^{-12} g(表 2)。所有样品均表现为单峰,没有发现混倍体(图 1)。其中在 $1.27 \times 10^{-12} \sim 1.43 \times 10^{-12}$ g 的有 241 株, $2.23 \times 10^{-12} \sim 2.54 \times 10^{-12}$ g 的有 107 株, $4.58 \times 10^{-12} \sim 4.91 \times 10^{-12}$ g 的有 5 株。由于甘蓝型油菜的细胞核 DNA 含量一般在 $2.2 \times 10^{-12} \sim 2.5 \times 10^{-12}$ g^[24],因此认为这 3 个区域的植株分别为单倍体、二倍体和四倍体。

表 2 甘蓝型油菜小孢子再生植株细胞核 DNA 含量分布情况

Tab. 2 Distribution of nuclear DNA content of microspore-derived plants in *B. napus*

倍性 Ploidy level	植株数 No. of plant	细胞核 DNA 含量/($\times 10^{-12}$ g) Nuclear DNA content				标准差 SD	变异系数/% CV
		平均值 Mean	最大值 Max	最小值 Mix	极差 Range		
单倍体 Haploid	241	1.39	1.43	1.27	0.16	0.015	3.42
二倍体 Diploid	107	2.38	2.54	2.23	0.31	0.020	2.95
四倍体 Tetraploid	5	4.73	4.91	4.58	0.33	0.040	2.37

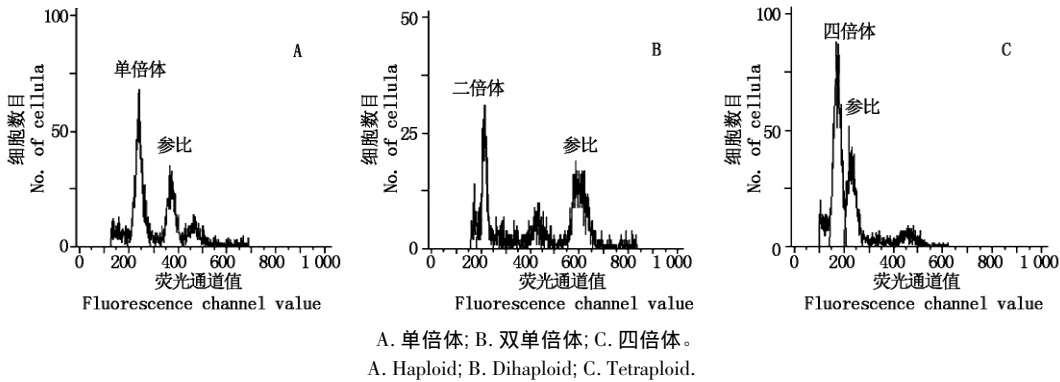


图 1 不同倍性甘蓝型油菜小孢子植株叶片细胞核 DNA 相对含量曲线

Fig. 1 Curves of relative DNA content of leaf samples from microspore-derived plants in *B. napus*

将小孢子再生植株分别移栽到田间,通过形态观察来鉴别单倍体和二倍体,并以此验证通过流式细胞仪鉴定小孢子再生植株倍性的准确性。由于小孢子再生植株生长势很弱,移栽到田间后一部分植株陆续死亡,最终在田间共获得小孢子再生植株 148 株,包括基因型 595 的 113 株,基因型 7775 的 17 株和基因型 7791 的 18 株。

经流式细胞仪鉴定为二倍体的植株,其形态正常,花蕾饱满,雄蕊正常,全部能产生花粉,套袋自交可以结实,形态鉴定全部为二倍体。经流式细胞仪鉴定为单倍体的植株,全部表现为株型瘦小、雄蕊干瘪短小,几乎不产生花粉,套袋自交不能结实。个别单倍体植株的雄蕊有微量花粉产生,经鉴定发现,存在有活力的花粉,但是数量较少,套袋自交不能结实,开放授粉有少数种子。经流式细胞仪鉴定出的四倍体单株,其茎秆粗壮,叶片形状不规则,叶片厚,叶色深,花蕾饱满膨大,雌蕊膨大且高于雄蕊,育性

较差,自交每个角果平均仅结 1~2 粒种子。以上结果说明,通过流式细胞仪鉴定小孢子再生植株的倍性与田间鉴定结果一致。

2.3 秋水仙碱处理对小孢子再生植株加倍的影响

经秋水仙碱处理的小孢子再生植株共 98 株,其中二倍体 72 株,单倍体 21 株,四倍体 5 株,二倍体植株比率为 73.50%。未经秋水仙碱处理的小孢子再生植株共 255 株,其中二倍体 35 株,单倍体 220 株,二倍体植株比率为 13.70%。3 个基因型材料 595、7775、7791 小孢子经秋水仙碱处理后的再生植株,加倍率均在 60% 以上,分别为 77.59%、75.00%、60.00%,但未经秋水仙碱处理的小孢子再生植株,自然加倍率较低,3 个株系分别为 8.62%、11.63%、20.88%。四倍体植株仅出现在经过秋水仙碱处理的小孢子再生苗中,有 2 个基因型材料 595 和 7791 的小孢子再生植株中存在四倍体植株,比率分别为 5.17% 和 10.00% (表 3)。

表 3 秋水仙碱直接处理甘蓝型油菜小孢子对加倍率的影响

Tab. 3 Effect on chromosome doubling of microspore-derived plants after colchicine treatment of microspores in *B. napus*

基因型 Genotype	秋水仙碱 质量浓度 /(mg/L) Colchicine	鉴定株数 No. of plants	单倍体 Haploid		二倍体 Double haploid		四倍体 Tetraploid	
			株数	比率/%	株数	比率/%	株数	比率/%
			No. of plants	Percent	No. of plants	Percent	No. of plants	Percent
595	50	58	10	17.24	45	77.59	3	5.17
7775	50	20	5	25.00	15	75.00	0	0
7791	50	20	6	30.00	12	60.00	2	10
595	0	96	76	79.12	20	20.88	0	0
61	0	43	38	88.37	5	11.63	0	0
34	0	116	106	91.38	10	8.62	0	0

3 讨论

本研究首次对国内田间条件下种植在不同季节、不同地点的油菜进行小孢子产胚率调查,发现在西宁种植的材料小孢子产胚率明显高于武汉种植的材料,尤其是同一个基因型在不同地点种植产胚率表现出很大的差异,同一基因型(如 8908B)在武汉种植可能完全不出胚,在西宁种植却产胚率很高。因此,油菜育种中利用优良种质材料时,如果出现小孢子培养产胚率很低而不能满足育种群体需要的情况,通过异地种植培养可望解决这一难题。

研究结果表明,不同基因型油菜,在第 1 朵花开后 1~3 d 取样的产胚率均高于 12~15 d 取样的产胚率,与牛应泽等^[13]认为以主花序第 1 朵花开后 6 d 左右取样为宜较为一致,但与刘志文等^[14]获得的在单株第 1 朵花开放后 6~20 d 取样都能获得最高产胚率的结果有差异,这可能与取材时间点有关。刘志文等的取材时间是在 7:00,为白昼中温度最低也是湿度最大的时间段。本试验均是在 8:00 取样,田间温度已经开始升高,特别是在盛花期,田间温度升高使得处于单核靠边期的小孢子比例减少,导致产胚率下降。Swanson^[24]等报道,在低温下分离油菜小孢子并孵育过夜可提高小孢子的胚胎发生频率。因此,在小孢子培养过程中,如果取样时供体植株生长在温度较高的环境条件下,在分离小孢子前最好能够进行低温处理,或者将取样时间点适当提前。

测定细胞核 DNA 含量在鉴定油菜染色体倍性上具有准确、可靠、灵敏的特点。尽管植物中存在细胞内多倍化现象^[25-26],但流式细胞仪检测的是群体细胞,个别倍性异常的细胞对整个植株的倍性组成没有明显影响。利用流式细胞仪进行倍性鉴定的样品制备方便,一个样品只需要几分钟,不需要昂贵的试剂。分析过程也十分迅速,几分钟就能够将样品中不同的细胞迅速区别开。此外,检测一个样本仅需要几十毫克植物组织,对植物生长没有任何影响。但需要注意的是,在采集样品时,应尽量选择幼嫩的叶片组织,可以显著降低变异系数(CV),减少杂峰,提高准确性。同时,在采集了新鲜样品后,要低温保存,以免发生 DNA 降解,造成测量结果的误差。

未经秋水仙碱处理的甘蓝型油菜小孢子再生植株自然加倍率很低,仅为 8.62%~20.88%。单倍体植株瘦小,茎秆脆弱,叶片颜色淡,花瓣也比正常二倍体植株小,一些单倍体植株现蕾很早,甚至在 5~6 片叶时即现蕾。特别是由于单倍体植株明显比

二倍体植株叶色淡,缺少叶绿素,抗性较差,很容易由于光合作用弱或感病而死亡,植株成活率很低。直接利用秋水仙碱处理小孢子提高再生植株加倍频率,比后期进行小孢子再生植株加倍处理操作简单、方便。朱家成等^[27]的研究表明,50 mg/L 处理 48 h 的平均加倍率在 60% 以上;周伟军等^[28]用 50 mg/L 和 500 mg/L 秋水仙碱处理小孢子 15 h,加倍率达到 75%~92%。本试验中小孢子经过 50 mg/L 秋水仙碱热激处理 48 h 后二倍体植株数目显著增加,加倍率提高 3~5 倍。尽管秋水仙碱处理小孢子会降低产胚率,但大量分离小孢子比处理成苗的植株要简单得多,既省时省工又减少对植株的损伤。在实际应用中应该采取直接处理小孢子的方法,结合流式细胞仪倍性检测,可以早期对甘蓝型油菜单倍体植株进行加倍处理,能更为高效地创建较大的分离群体,为进行遗传育种研究提供基础材料。

参考文献:

- [1] Bailey P D, McClement L, Hand S *et al.* Double haploids, markers and QTL analysis in vegetable brassicas [J]. *Euphytica* 2008, 164(2): 509–514.
- [2] 蒋武生, 张晓伟, 原玉香, 等. 大白菜游离小孢子培养技术研究进展及应用 [J]. *河南农业科学* 2009(9): 151–154.
- [3] 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 [J]. *中国油料作物学报* 2002, 24(2): 71–73.
- [4] 栗根义, 高睦枪, 耿建峰, 等. 春秋适应型大白菜新品种豫白菜 11 号的选育 [J]. *河南农业科学* 1999(3): 24–26.
- [5] Liu S Y, Wang H Zh, Zhang J *et al.* In vitro mutation and selection of doubled-haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to *sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Plant Cell Reports* 2005, 24(3): 133–144.
- [6] 李莉, 付岳峰, 肖刚, 等. 油菜抗除草剂突变体的筛选及其鉴定 [J]. *中国油料作物学报* 2008, 30(3): 361–365.
- [7] Barro F, Vega M D, Martin A. Modification of glucosinolate and erucic acid contents in doubled haploid lines of *Brassica carinata* by UV treatment of isolated microspores [J]. *Euphytica* 2002, 129: 1–6.
- [8] 何冬丽, 杨光圣. 甘蓝型油菜单倍体离体诱变及其效应的 AFLP 分子标记检测 [J]. *中国油料作物学报* 2004, 26(2): 11–15.
- [9] Gu H H, Hagberg P, Zhou W J. Cold pretreatment enhance microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.) [J]. *Plant Growth Regulation* 2004, 42: 137–143.

- [10] 田保明,蒋武生,张晓伟,等. 提高油菜游离小孢子胚诱导频率的研究[J]. 华北农学报, 2007, 22(1): 116 – 119.
- [11] 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[J]. 华中农业大学学报, 1995, 14(4): 327 – 332.
- [12] 宋来强,贺兴文. 甘蓝型油菜小孢子胚状体诱导的主要影响因素研究[J]. 江西农业学报, 1998, 10(2): 66 – 69.
- [13] 牛应泽,刘玉贞. 人工合成甘蓝型油菜游离小孢子培养及其再植株再生研究初报[J]. 四川农业大学学报, 1999, 17(2): 167 – 171.
- [14] 刘志文,刘雪平,傅廷栋,等. 甘蓝型油菜小孢子培养的胚诱导和加倍效率的研究[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(4): 339 – 342.
- [15] Dolezel J, Greilhuber J, Suda J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry[J]. Nature Protocols, 2007, 2(9): 2233 – 2244.
- [16] 吴雅琴,常瑞丰,程和禾. 流式细胞术进行倍性分析的原理和方法[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(4): 407 – 414.
- [17] 陶抵辉,李小红,王利群,等. 植物染色体倍性鉴定方法研究进展[J]. 生命科学研究, 2009, 13(5): 453 – 458.
- [18] Spencer J, Alan E, Anne E, et al. Evolution of Genome Size in *Brassicaceae* [J]. Ann Bot, 2005, 95(1): 229 – 235.
- [19] Hu Q, Hansen L N, Laursen J, et al. Intergeneric hybrids between *brassica napus* and *orychophragmus violaceus* which contain traits of agronomic importance for oilseed rape improvement [J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 834 – 840.
- [20] 梅德圣,王汉中,李云昌,等. 油菜小孢子培养影响因素及黄籽油菜双单倍体群体的构建[J]. 华北农学报, 2007, 22(1): 112 – 115.
- [21] Castro S, Loureiro J, Rodriguez E, et al. Evaluation of polysomaty and estimation of genome size in *polygala vayredae* and *p. calcarea* using flow cytometry [J]. Plant Science, 2007, 172(6): 1131 – 1137.
- [22] Takahata Y, Brown D C W, Keller W A. Effect of donor plant age and inflorescence age on microspore culture of *Brassica napus* L. [J]. Euphytica, 1991, 58: 51 – 55.
- [23] Zhang G Q, Zhang D Q, Tang G X, et al. Plant development from microspore-derived embryos in oilseed rape as affected by chilling, desiccation and cytotledon excision [J]. BiolPlanatarum, 2006, 50: 180 – 186.
- [24] Swanson E B, Counlalls M P, Wu S C. Effieicnt isolation of microspores and the production of miorospore-derived embryos from *Brassica napus* [J]. Plant Cell Reports, 1987, 6(2): 94 – 97.
- [25] Kudo N, Kimura Y. Flow cytometric evidence for endopolyploidy in seedling of some *Brassica* species [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 104 – 110.
- [26] 郭东伟,李菲,马留银,等. 白菜的内多倍化现象[J]. 作物学报, 2008, 34(8): 1386 – 1392.
- [27] 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[J]. 河南农业科学, 2001(11): 4 – 5.
- [28] 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.