

谢园园,杨金雨露,吴 玲,等. 观赏植物游离小孢子培养研究进展[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):134-137.

# 观赏植物游离小孢子培养研究进展

谢园园<sup>1</sup>, 杨金雨露<sup>1</sup>, 吴 玲<sup>1</sup>, 曹丽平<sup>1</sup>, 赖齐贤<sup>2</sup>

(1. 浙江农林大学风景园林与建筑学院,浙江临安 311300; 2. 浙江农林大学农业与食品科学学院,浙江临安 311300)

**摘要:**介绍了观赏植物游离小孢子培养研究进展,并对游离小孢子培养技术进行了分析,探讨了影响单倍体植株获得的因素,阐述了存在的问题,并对游离小孢子育种技术进行了展望。

**关键词:**观赏植物;游离小孢子培养;单倍体;育种

**中图分类号:**S680.4      **文献标志码:**A      **文章编号:**1002-1302(2014)02-0134-04

我国观赏植物种类繁多,它们有着各自不同的形态、生态习性、繁殖方式,很多观赏植物还兼具药用、食用价值。近年来,世界各国花卉产业发展速度较快,进行花卉育种以获得优质花卉品种显得尤为重要。各国开始重视保护、收集珍稀濒危或者性状优良的植物品种,很多学者曾考虑利用单倍体育种来快速保存种质资源,但单倍体植物生长势弱、无法结种、利用价值不高。因此,部分学者开始在实验室条件下探讨生产单倍体植株的方法,以期在短期内获得纯合体,缩短育种进程。1953 年,Tulecke 首次通过培养银杏花粉成功得到愈伤组织,但最终并未长成完整植株<sup>[1]</sup>。1964 年,研究人员利用曼陀罗(*Datura stramonium* L.) 花药培育出完整的单倍体植株,自此单倍体育种逐渐成为研究热点。游离小孢子培养是单倍体育种方法之一,它是在花药培养的基础上发展起来的,不经过任何形式的花药预培养,直接从花蕾或花药中获得游离的、新鲜的小孢子群体进行培养<sup>[2]</sup>。1982 年,Lichter 首次通过培养甘蓝型油菜(*Brassica napus*) 花粉成功获得单倍体植株<sup>[3]</sup>,从此开创了游离小孢子培养技术。目前,游离小孢子培养技术已逐渐变成重要的育种方法,但关于花卉方面的研究较少。

收稿日期:2013-07-05

作者简介:谢园园(1990—),女,安徽六安人,硕士研究生,主要从事园林植物遗传育种研究。E-mail: xieyuanyuanx@163.com。

通信作者:赖齐贤,博士,教授,从事花卉育种、园艺植物栽培研究。E-mail: laiqixian@zafu.edu.cn。

本研究对近年来观赏植物小孢子培养进展进行综述。

## 1 观赏植物游离小孢子培养现状

目前游离小孢子培养成功的观赏植物主要集中在草本植物,涉及的科属较为广泛。其中培养成功的十字花科植物有 2 例,十字花科蔬菜类植物是迄今为止胚诱导成功并长成植株最多的科属,这可能是由于十字花科植物基因对胚诱导响应能力较强,同时也与人们对蔬菜作物育种较为重视有关(表 1)。菊科植物基因在小孢子培养方面可能具有顽拗性,导致其胚发生较为困难。

## 2 小孢子培养技术

### 2.1 预处理方法

小孢子培养所用的花序经常采用 10℃ 以下的低温进行预处理,预处理时间不等,通常为 24~48 h。有学者认为,低温可以诱导玉米、小麦、水稻等植物小孢子胚状体发育<sup>[19-20]</sup>。低温也可以提高烟草胚性花粉数,进而发育成胚胎<sup>[21-22]</sup>。朱彦涛等对长 0~40 cm 的甘蓝型油菜花序低温处理 0~10 d,发现处理时间随着花序长度的增加而延长,适当的低温处理可以延缓小孢子的退化速度,从而延长材料的保存时间,但保存时间过长,胚产量下降<sup>[23]</sup>。在一些植物的游离小孢子培养中,不进行花蕾预处理同样可以获得胚状体,因此,有学者认为,对于某些植物的花蕾进行低温预处理是不必要的<sup>[24]</sup>。对于某些植物来说,对花粉进行适当的预处理是不可缺少的。

年高了 2.0℃。定植后 2011 年草莓死苗率累计达 20%,而 2010 年草莓死苗率累计仅为 5%(表 3)。

表 2 2011 年、2010 年的温度、降雨量及草莓死苗率

时间 (年-月)	>30℃ 日数 (d)	降雨量 (mm)	最高气温 (℃)	累计草莓 死苗率(%)
2011-07	19	481.0	36.7	80
2010-07	24	94.3	35.7	70
2011-08	16	328.89	34.9	100
2010-08	23	193.6	38.4	90

表 3 草莓定植后温度对炭疽病引起的死苗的影响

时间 (年-月)	平均最高气温 (℃)	日平均气温 (℃)	死苗率 (%)
2011-11	17.2	13.2	20
2010-11	17.4	11.2	5

### 2.3 草莓定植后炭疽病引起的死苗与温度的关系

一般来说,草莓定植后到 11 月份,因气温较低,草莓炭疽病发病逐步减轻,2010 年和 2011 年,三河农场草莓以红颊、章姬、益香为主,这些品种易感染炭疽病。2011 年 11 月份,日最高平均气温虽比 2010 年低 0.2℃,但日平均气温比 2010

### 参考文献:

[1] 罗学兵,贺良明. 草莓的营养价值与保健功能[J]. 中国食物与营养,2011,17(4):74-76.

表 1 观赏植物小孢子培养现状

植物名称(拉丁名)	科属	文献	是否培养成功
芍药( <i>Peony</i> )	芍药科芍药属	[4]	是
天仙子( <i>Hyoscyamus niger</i> )	茄科天仙子属	[5]	是
山茶( <i>Camellia japonica</i> cv. <i>Elegans</i> )	山茶科山茶属	[6]	是
二月兰( <i>Orychophragmus violaceus</i> )	十字花科诸葛菜属	[7]	是
羽衣甘蓝( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> )	十字花科芸苔属	[8-9]	是
马蹄莲( <i>Zantedeschia aethiopica</i> )	天南星科马蹄莲属	[10]	是
洛神葵( <i>Hibiscus sabdariffa</i> )	锦葵科木槿属	[11]	是
月季( <i>Rosa hybrida</i> )	蔷薇科蔷薇属	[12]	是
矮牵牛( <i>Petunia hybrida</i> )	茄科矮牵牛属	[13]	是
银杏( <i>Ginkgo biloba</i> )	银杏科银杏属	[1,14]	否
白羽扇豆( <i>Lupinus albus</i> )	豆科羽扇豆属	[15]	否
蛇目菊( <i>Coreopsis tinctoria</i> )	菊科蛇目菊属	[16]	否
毛果一枝黄花( <i>Solidago virgaurea</i> )	菊科一枝黄花属	[16]	否
向日葵( <i>Helianthus annuus</i> )	菊科向日葵属	[17]	否
菊花( <i>Dendranthema grandiflorum</i> )	菊科菊属	[18]	否

花粉预处理方法很多,主要有低温、高温、碳胁迫、 $\gamma$ 射线、甘露醇、秋水仙素等几种。谭德冠等对巴西橡胶树小孢子分别进行高温热击,Starvation Medium B 溶液预处理试验,结果显示,Starvation Medium B 溶液预处理优于高温热击<sup>[25]</sup>。高素燕等研究了低温、热激、高糖浓度 3 种不同类型预处理对不结球白菜胚胎发生的影响,结果表明,1~3 d 低温预处理能显著提高白菜出胚率<sup>[26]</sup>。

2.2 分离纯化技术

分离是将小孢子从花药中分离出来,纯化即筛选胚性小孢子,淘汰非胚性小孢子,分离纯化有利于提高胚发生率,分离技术主要包括以下 3 种。

2.2.1 挤压法 将花药置于盛有少量液体培养基的容器中,用玻璃棒或其他工具进行挤压,将花粉释放出来,此种方法比较适合双子叶植物,缺点是获得的花粉中可能混有体细胞,同时花粉密度不易控制<sup>[27-28]</sup>。

2.2.2 自然散落法 把花药接在液体培养基上一段时间,使小孢子从自然开裂的药室中散落出来,此方法不会对花粉粒造成损伤,但无法充分分离花粉<sup>[25,28-30]</sup>。

2.2.3 机械游离法

2.2.3.1 磁搅拌法 用磁力搅拌器搅拌培养液及渗透压稳定剂中的花药,使花粉游离出来,这种方法会对花粉造成不同程度的机械损伤<sup>[27]</sup>。

2.2.3.2 超速旋切法 微型搅拌器中的高速旋转切刀可以破碎花蕾等,使小孢子游离出来。1989 年 Swanson 等首先运用这种方法分离了油菜小孢子,之后这种方法在禾本科植物花粉分离及培养上得到广泛应用<sup>[31]</sup>。谭德冠等采用直接研磨法与间接研磨法对巴西橡胶树游离小孢子进行培养,发现间接研磨法较为适宜<sup>[25]</sup>。间接研磨法应去除花瓣、花萼,仅对雄蕊进行研磨分离,直接研磨法是对整朵雄花进行研磨,相比较而言,间接法虽然工作量大,但可以有效减少污染,同时

分离出杂质较少的小孢子。植物游离小孢子培养过程中,对小孢子进行纯化是不可缺少的环节,纯化可以减少植物体细胞以及非胚性小孢子对小孢子培养的影响。小孢子纯化方法主要包括蔗糖浓度梯度法<sup>[32]</sup>、percoll 密度梯度法<sup>[33]</sup>、麦芽糖浓度梯度离心法等方法,其中 percoll 方法效果最好。采用不连续 percoll 密度梯度离心法筛选胚性小孢子,可以将大量非胚性小孢子淘汰掉,提高产胚率。这种不连续 percoll 密度梯度离心方法要优于普通的蔗糖、聚蔗糖密度梯度离心法,但这种方法成本相对较高,因此应用并不广泛<sup>[34-36]</sup>。

2.3 花粉培养方法

2.3.1 直接培养法 直接培养法即对花药不作任何预处理,直接分离出花粉并接种于培养基上。1981 年,研究人员通过这种培养方式得到芍药愈伤组织继而获得单倍体植株。同年,陈英等也通过此方法诱导得到水稻植株<sup>[37]</sup>。

2.3.2 花药预培养后分离花粉法 花药预培养后分离花粉法即对花药进行一定的预处理(如低温处理等),然后分离出花粉,将其置于液体培养基上培养,此方法应用较为普遍。

2.3.3 添加花药提取物的花粉培养法 先将花药接种在合适的培养基上培养 1 周左右,然后取出花药,将花药浸入沸水中,再进行研磨离心,保留上清液,将上清液过滤灭菌加入培养基中,在培养基上培养花粉粒。很多学者在研究大麦花粉发育时采用此方法培养花粉粒<sup>[38-39]</sup>。

2.3.4 哺育培养 在合适的培养基上培养已经裂开的胚状体或愈伤组织诱导率高的花药作为哺育组织,此种花药可以是不同种植物,将需要培养的花粉接种到花药里进行哺育培养。Sharp 等曾经利用这种方法诱导番茄花粉形成单倍体细胞无性系,但最终未能诱导成植株<sup>[40]</sup>。

2.3.5 微室培养 用盖玻片或载玻片制作成微室,将花粉粒接种在装有培养基的微室中进行培养。1977 年,谷明光等曾用此法成功将烟草花粉诱导成胚状体<sup>[41]</sup>。

3 小孢子研究影响因素

3.1 材料基因型

植物的基因型对游离小孢子培养过程中胚状体及愈伤组织的发生尤为关键。Takahata 等研究了 11 种不同基因型萝卜的胚诱导能力,发现有 5 种不同基因型的萝卜对诱导不响应,不能产生胚状体。2007 年,冯辉等研究了 18 种不同基因型羽衣甘蓝 F<sub>1</sub> 代杂交种获得胚状体的比例,结果显示,皱叶红心胚状体产率最高,红珊瑚、白珊瑚、红珊瑚 3 个品种都无胚状体产生<sup>[42]</sup>。这可能是由于在植物的基因组中存在调控植物小孢子启动的基因,不同植物的启动基因表达所需的条件不同。

3.2 植株生长状况

植株生长状况直接关系到花粉的发育状态,从而影响植物游离小孢子试验成功与否。植物生长健壮是获得胚状体及愈伤组织的首要条件。研究发现,当油菜供体植株生长状况良好时可直接诱导小孢子发育同步化,提高单核期小孢子的核质指数及产胚量<sup>[43]</sup>。研究表明,在温室中生长的植株小孢子诱导率低于生长在大田中的植株<sup>[44]</sup>。

3.3 小孢子发育阶段

小孢子发育阶段主要包括单核早期、单核中期、单核晚期

(即单核靠边期)、双核期等。研究认为,单核中期之前的花粉过于幼嫩,双核早期之后的花粉太过成熟。对于大多数植物来说,单核中晚期到双核早期是最适合的小孢子发育阶段,单核晚期成胚率最大。对于不同基因型的植物来说,其最适阶段稍有差异,可以通过使用染色剂如醋酸洋红、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)来确定发育时期。应根据不同植物品种选择对应时期的花蕾。选择合适的洛神葵植物时, Ma'arup 等选取直径为 0.8~1.0 cm 的花蕾,发现此时的花蕾包括 98% 单核期小孢子及 2% 双核期小孢子<sup>[11]</sup>。

### 3.4 培养基类型及其他附加成分

目前还没有 1 种可以普遍应用于植物游离小孢子培养的培养基。Ma'arup 等在诱导山茶小孢子胚过程中,发现 MS 培养基诱导率要高于 N<sub>6</sub> 培养基,液体 MS 培养基也适合洛神葵游离小孢子培养<sup>[11]</sup>。在马蹄莲游离小孢子培养中,Wang 等使用了 NLN、N<sub>6</sub>、B<sub>5</sub>、Nitsch 等 4 种培养基,结果表明,NLN 培养基中小孢子成胚率最高<sup>[10]</sup>。对于某些植物来说,加入激素可以提高胚状体产出率,激素成分以及浓度随植物品种的变化而变化。常用的激素有 NAA、6-BA、2,4-D、TDZ、KT 等。研究人员搭配使用 2,4-D 与 NAA 2 种激素进行芍药的小孢子培养,结果表明,2 mg/L NAA 条件下,小孢子分化率最高<sup>[4]</sup>。并不是所有植物进行胚诱导时都需要加入激素。碳源的种类及浓度与胚状体发生也密切相关。Kim 等比较了不同浓度蔗糖、麦芽糖对辣椒(*Capsicum annuum* L.)胚胎诱导的影响,发现 9% 蔗糖是诱导辣椒胚胎发育的最佳碳源<sup>[45]</sup>。活性炭是一种良好的吸附剂,被广泛应用于植物组织培养<sup>[46-47]</sup>。

### 3.5 小孢子培养密度

小孢子的培养密度对胚状体及愈伤组织的获得也有很大影响。付文婷等在大白菜游离小孢子胚诱导过程中将小孢子培养密度调整为  $1 \times 10^4$  个/mL<sup>[48]</sup>。在芦笋游离小孢子培养过程中,汤泳萍等将小孢子密度调整为  $1.5 \times 10^5$  个/mL<sup>[49]</sup>。当小孢子密度低于  $5 \times 10^4$  个/mL 时,最适合大麦集群化生长<sup>[50]</sup>。细胞密度对细胞生长与分裂影响极大。细胞能够合成某些分裂时所必需的化合物,只有当这些化合物的内生浓度达到临界值后,细胞才能进行分裂。可见,悬浮培养时小孢子密度会直接影响胚发生率,密度过高时,营养物质会被耗尽,同时细胞会释放某些有毒物质,影响其他小孢子胚的发生,但细胞生长具有群体效应,密度过低又会导致小孢子无法正常生长,极大地降低成胚率。

## 4 存在的问题

目前游离小孢子培养在洋甘菊、一枝黄花、蛇目菊、缙草等很多菊科植物中都以失败而告终<sup>[51]</sup>。游离小孢子培养成功与否受到基因型、生长环境、培养基成分等的影响。同时,花蕾预处理、分离纯化、花粉培养方法也影响胚诱导能否成功。游离小孢子培养虽然避免了体细胞的影响,但花粉也失去了花药壁的保护,有时有极少的二倍体、多倍体植株发育。观赏植物的游离小孢子培养技术目前尚不成熟,尽管前人已经从小孢子胚胎发生的细胞形态学、代谢水平、分子水平等方面探究了小孢子胚胎发生机制,但观赏植物游离小孢子培养获得单倍体植株的诱导机制、启动机理、发育途径等尚不明

确,严重阻碍了观赏植物游离小孢子育种进程。

## 5 展望

原始的杂交育种方式存在育种周期长、效率低、管理繁琐等问题,单倍体育种具有育种年限短、选择效率高等优势。同时,基因工程采用游离小孢子培养技术,可以为植物育种及基因定位生产双单倍体(即重组自交系),以克服远缘杂交不亲和性。在诱导胚状体过程中花粉容易产生变异,因此,游离小孢子育种还可作为引发突变的手段。研究游离小孢子培养技术、探讨影响观赏植物游离小孢子培养的因素、提高小孢子诱导率,是探究游离小孢子培养技术中亟需解决的难题。

## 参考文献:

- [1] Tulecke W R. A tissue derived from the pollen of *Ginkgo biloba* [J]. Science, 1953, 117 (3048): 599-600.
- [2] 郭金英, 申书兴, 陈雪平, 等. 十字花科蔬菜游离小孢子培养研究进展 [J]. 河北农业大学学报, 2002, 25 (增刊): 122-124.
- [3] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* [J]. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 1982, 105 (5): 427-434.
- [4] Ono K, Harashima S. Induction of haploid callus from isolated microspores of peony *in vitro* [J]. Plant and Cell Physiology, 1981, 22 (2): 337-341.
- [5] 张举仁, 郑国钊. 天仙子 (*Hyoscyamus niger* L.) 花粉植株形态发生的途径 [J]. 实验生物学报, 1984, 17 (3): 107-113.
- [6] Pedroso M C, Pais M S. Induction of microspore embryogenesis in *Camellia japonica* cv. Elegans [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1994, 37 (2): 129-136.
- [7] Zhao X G, Wang W G, Li Y D, et al. *In vitro* maturation and germination of *Orychophragmus violaceus* microspores [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2007, 91: 53-60.
- [8] Zhang W, Fu Q, Dai X G, et al. The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration [J]. Scientia Horticulturae, 2008, 117 (1): 69-72.
- [9] 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.
- [10] Wang S, Li X, Yang L, et al. Microspore culture of *Zantedeschia aethiopica*: The role of monosaccharides in sporophytic development [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10 (50): 10287-10292.
- [11] Ma'arup R, Aziz M A, Osman M. Development of a procedure for production of haploid plants through microspore culture of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2012, 145 (20): 52-61.
- [12] Oroojloo M, Shariatpanahi M E, Dehestani M, et al. Influence of isolation and culture media on induction of microspore embryogenesis in roses (*Rosa hybrida*) [J]. Seed and Plant Improvement Journal, 2012, 28 (2): 327-333.
- [13] Sangwan R S, Norreel B. Induction of plants from pollen grains of *Petunia* cultured *in vitro* [J]. Nature, 1975, 257: 222-224.
- [14] Tulecke W. The pollen of *Ginkgo biloba*; *in vitro* culture and tissue formation [J]. Botanical Society of America, 1957, 44 (7): 602-608.

- [15] Ormerod A J, Caligari P S. Anther and microspore culture of *Lupinus albus* in liquid culture medium[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1994, 36(2): 227–236.
- [16] Bal U, Touraev A. Microspore embryogenesis in selected medicinal and ornamental species of the *Asteraceae*[M]. New York: Springer Science, 2009: 219–229.
- [17] Coumans M, Zhong D N. Doubled haploid sunflower(*Helianthus annuus*) plant production by androgenesis: fact or artifact? Part 2. *In vitro* isolated microspore culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 41(3): 203–209.
- [18] Yang J S, Endo M, Inada I. Microspore culture of chrysanthemum [*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam.] [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2005, 74(1): 78–86.
- [19] Touraev A, Pfosser M, Heberle – Bors E. The microspore: a haploid multipurpose cell[J]. Advances in Botanical Research, 2001, 35: 53–109.
- [20] Touraev A, Vicente O, Heberle – Bors E. Initiation of microspore embryogenesis by stress[J]. Trends Plant Science, 1997, 2(8): 297–302.
- [21] Heberle – Bors E. *In vitro* pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. and its relation to pollen sterility, sex balance and floral induction of pollen donor plants[J]. Planta, 1982, 156(5): 396–401.
- [22] Heberle – Bors E. On the time of embryogenic pollen grain induction during sexual development of *Nicotiana tabacum* L. plants[J]. Planta, 1982, 156(5): 402–406.
- [23] 朱彦涛, 李殿荣, 杨淑慎. 低温预处理和基因型对甘蓝型油菜小孢子胚胎发生的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(5): 88–94.
- [24] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*[J]. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 1982, 105(5): 427–434.
- [25] 谭德冠, 吴煜, 孙雪飘, 等. 巴西橡胶树游离小孢子培养[J]. 热带作物学报, 2011, 32(5): 840–844.
- [26] 高素燕, 李英, 单晓政, 等. 预处理对不结球白菜游离小孢子胚胎发生的影响[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(6): 878–881.
- [27] 陈晓亚, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 113–114.
- [28] 杨淑琴, 娄虹, 韩阳. 芸薹属植物游离小孢子培养研究进展[J]. 辽宁大学学报: 自然科学版, 2005, 32(1): 91–96.
- [29] Ferrie A M R, Caswell K L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2010, 104(3): 301–309.
- [30] 佟曦然, 顾淑荣, 朱至清, 等. 茄子游离小孢子培养中小孢子发育的细胞学观察[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(5): 861–866.
- [31] Swanson E B, Herrgesell M J, Arnoldo M, et al. Microspore mutagenesis and selection; Canola plants with field tolerance to the imidazolinones[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1989, 78(4): 525–530.
- [32] Harris R, Wright M, Byrne M, et al. Callus formation and plantlet regeneration from protoplasts derived from suspension cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Plant Cell Reports, 1988, 7(5): 337–340.
- [33] 黄大年, 谷明光, 颜秋生, 等. 应用 percoll 密度梯度离心分离不同类型的花粉粒[J]. 遗传, 1983, 5(2): 10–12.
- [34] Joersbo M, Jorgensen R B, Olesen P. Transient electroporabilization of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores to propidium iodide[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1990, 23(2): 125–129.
- [35] Takahata Y, Komatsu H, Kaizuma N. Microspore culture of radish (*Raphanus sativus* L.): influence of genotype and culture conditions on embryogenesis[J]. Plant Cell Reports, 1996, 16(3/4): 163–166.
- [36] 付传琴, 张丽, 王富, 等. 萝卜游离小孢子培养中胚性小孢子的选择[J]. 西北农业学报, 2007, 16(4): 174–176.
- [37] 陈英, 左秋仙, 李淑媛, 等. 水稻游离花粉培养诱导形成绿色植株及有关作用因素的研究[J]. 遗传学报, 1981, 8(2): 158–163.
- [38] 许智宏, 黄斌. 大麦花粉愈伤组织形成中的花药因子[J]. 植物学报, 1984, 26(1): 1–10.
- [39] Xu Z H, Huang B, Sunderland N. Culture of barley anthers in conditioned media[J]. Journal of Experimental Botany, 1981, 32(4): 767–778.
- [40] Sharp W R, Raskin R S. The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato[J]. Planta, 1972, 104: 357–361.
- [41] 谷明光, 郑万珍, 黄大年, 等. 小麦、水稻、烟草花粉粒离体培养[J]. 遗传学报, 1977, 4(4): 333–340.
- [42] 冯辉, 冯建云, 姜凤英, 等. 影响羽衣甘蓝游离小孢子培养中胚状体发生的几个因素[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(3): 545–546.
- [43] 管春云. 油菜小孢子培养和双单倍体育种研究: 1. 供体植株和小孢子密度对小孢子培养的影响[J]. 作物学报, 1995, 21(6): 665–670.
- [44] Ercan N, Sensoy F A, Sensoy A S. Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2006, 110(1): 16–20.
- [45] Kim M, Jang I C, Kim J A, et al. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(3): 425–434.
- [46] 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.
- [47] 蒋武生, 张晓伟, 姚秋菊, 等. 活性炭对小白菜游离小孢子培养的影响[J]. 华北农学报, 2008, 23(5): 93–96.
- [48] 付文婷, 张鲁刚, 胥宇建, 等. 大白菜游离小孢子胚诱导及植株再生[J]. 西北农业学报, 2010, 19(3): 139–143.
- [49] 汤冰萍, 周劲松, 罗绍春, 等. 芦笋游离小孢子培养研究初报[J]. 江西农业学报, 2011, 23(3): 14–16, 19.
- [50] Davies P A, Morton S. A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density[J]. Plant Cell Reports, 1998, 17(3): 206–210.
- [51] Bal U, Touraev A. Microspore embryogenesis in selected medicinal and ornamental species of the *asteraceae*[M]. New York: Springer Science, 2009: 219–229.