

贾 茸,朱永平,江 周,等. 洋桔梗小孢子培养胚性愈伤组织诱导[J]. 江苏农业科学,2017,45(14):39-42.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.012

洋桔梗小孢子培养胚性愈伤组织诱导

贾 茸¹,朱永平²,江 周¹,吴林鲜¹,李金泽³,肖靖译¹,赵兴福¹,李琼洁⁴,和凤美¹

(1. 云南农业大学园林园艺学院,云南昆明 650201; 2. 云南农业大学农学与生物技术学院,云南昆明 650201;

3. 云南省农业科学院花卉研究所,云南昆明 650200; 4. 渭南师范学院商学院,陕西渭南 714400)

摘要:研究了影响洋桔梗小孢子培养中胚性愈伤组织形成的主要因素,旨在建立其高频胚性愈伤组织体系。结果发现,基因型是影响洋桔梗小孢子发生胚性愈伤组织的关键因素,不同基因型间诱导率不同,供试材料中 3 份诱导出胚性愈伤组织,其中香槟 601 出愈率最高,达到 4.86 个/朵;4 ℃低温处理 1~3 d 均能显著提高胚性愈伤组织的出愈率,最佳处理时间是 1 d。32 ℃热激处理对于提高胚性愈伤组织出愈率有一定的影响,但较低温处理不明显。适合多个洋桔梗基因型诱导胚性愈伤组织的最佳诱导培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L KT + 2.0 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L NAA。

关键词:洋桔梗;小孢子培养;胚性愈伤组织;影响因素

中图分类号: S682.1⁺90.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0039-03

洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*)别称德州兰铃、草原龙胆、丽钵花,为龙胆科草原龙胆属的宿根草本花卉,原产于美洲墨西哥、美国中南部等地^[1]。洋桔梗花色繁多,花姿优美,极具观赏价值,是世界花卉领域极具发展前途的品种之一。目前,我国的洋桔梗 F₁ 代种子都从国外进口,不仅价格高昂,而且后代分离严重,不能留种,给洋桔梗的商业化生产带来了较大阻碍。

洋桔梗常规育种耗时长,效率低,获得纯合自交系需要 6~8 年自交与选择,而通过游离小孢子培养可以在短期内获得单倍体植株,快速纯合育种材料,缩短育种周期,加快育种进程^[2]。目前游离小孢子培养技术已在甘蓝型油菜^[3]、辣椒^[4]、大白菜^[5]、白菜^[6]、水稻^[7]、小麦^[8]等作物成功建立了游离小孢子的培养体系,成为重要的育种方法,而迄今关于洋桔梗游离小孢子培养体系的研究还鲜有报道。

本试验研究了基因型、4 ℃低温处理、32 ℃热激处理、激素处理等 4 个因素对其胚性愈伤组织发生的影响,旨在建立较高愈伤组织诱导率的培养途径,为后期分化成苗提供足够的材料,推进洋桔梗游离小孢子培养体系的快速建立,为单倍体育种奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验在 2014 年 10 月 28 日开始进行,于云南省农业科学院玉溪基地采摘红色 401、粉色 503、香槟 601、蓝色 601 和蓝雾 401 等 5 个不同基因型洋桔梗,材料在大棚内种植,采用的是常规的田间管理。

收稿日期:2016-03-21

作者简介:贾 茸(1990—),女,陕西延安人,硕士研究生,主要从事植物遗传育种研究。E-mail:jiarong0729@163.com。

通信作者:和凤美,副教授,硕士生导师,主要从事植物遗传育种研究。E-mail:hufengmei918@126.com。

1.2 试验方法

1.2.1 材料选择 取样时间为晴朗天气的 09:00—10:00,从生长旺盛的洋桔梗植株上采取绿色饱满、花萼与花冠等长或者花萼略短于花冠的新鲜花蕾。处于该形态特征的花蕾,其小孢子绝大部分处于单核靠边期,在前期的试验中已经证实了洋桔梗花蕾的该形态特征与其小孢子发育时期相关的这一特性。

1.2.2 外植体处理 洗洁精水清洗花蕾 10 min,流水冲洗 30 min,然后在超净工作台中用 75% 乙醇浸洗 10 min,10.5% NaClO 处理 8 min,无菌水冲洗 5 次,每次 3 min,沥干水分,待用。

1.2.3 小孢子提取、纯化 用小镊子将花蕾剥开,取出花药,清理花丝,置于无菌研钵中,加入适量 B5 溶液,用研棒充分碾压花药,分离出小孢子,后在双层漏斗中加 300 目消毒滤网过滤,滤液收纳于 5 mL 离心管中,转速 1 200 r/min,离心 3 次,时间分别为 12、8、5 min,弃 B5 上清液,按每蕾加入 3 mL 相应 MS 液体培养液,将沉淀物摇匀,用移液枪取 1.0 mL 于 MS 固体培养基上,再加入 2 mL 相应 MS 液体培养液。

1.2.4 试验设计 试验从以下 4 个因素探讨其对洋桔梗小孢子诱导胚性愈伤组织的影响:(1)不同基因型。以 5 个不同基因型的洋桔梗为试材,每 3 瓶接种 1 个花蕾的小孢子,在相同条件下进行培养,每个处理重复 3 次。(2)4 ℃低温处理。接种前把部分洋桔梗的花蕾放在 4 ℃冰箱中进行低温预处理,处理时间分别为 1、2、3 d,以未经低温处理的洋桔梗为对照,每个处理重复 3 次。(3)32 ℃热激处理。小孢子接种到瓶后,将其放在 32 ℃恒温培养箱中进行热激处理,处理时间分别为 1、2、3 d,以未经低温处理的洋桔梗为同一对照,每个处理重复 3 次。(4)激素处理。以 MS 为基本培养基,添加 6.5 g/L 琼脂、30 g/L 蔗糖。分别添加不同浓度的激素 6-BA、KT、2,4-D 和 NAA,pH 值调节到 5.8,配制不同组合的愈伤组织培养基,每个处理重复 3 次,设计正交试验 L₉(3⁴),结果见表 1。

表 1 愈伤组织诱导培养基正交试验 $L_9(3^4)$ 设计方案

试验号	激素浓度 (mg/L)			
	A:6-BA	B:KT	C:2,4-D	D:NAA
1	0	0	1.0	0.2
2	0	1.0	0	0
3	0	2.0	2.0	0.5
4	1.0	0	0	0.5
5	1.0	1.0	2.0	0.2
6	1.0	2.0	1.0	0
7	2.0	0	2.0	0
8	2.0	1.0	1.0	0.5
9	2.0	2.0	0	0.2

1.2.5 数据分析 所得数据采用 SPSS 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 基因型对小孢子胚性愈伤组织诱导影响

供体植株基因型与小孢子愈伤组织的获得有密切关系。在供试的 5 个基因型中有 2 个基因型没有诱导出愈伤组织,3 个基因型诱导出愈伤组织,诱导率占 60%。其中,香槟 601 最先出现胚性愈伤组织且出愈率最高,达到 4.86 个/朵,单瓶最高产愈数为 12 个;粉色 503 出愈率达到 2.59 个/朵,而红色 401 较差,仅为 0.98 个/朵,单瓶最大只有 3 个。香槟 601 平均每朵花蕾出愈数是红色 401 的 4.94 倍、粉色 503 的 1.88 倍,而蓝色 601 和蓝雾 401 始终没有诱导出胚性愈伤组织,基因型间大体差异显著(表 2)。表明洋桔梗基因型是影响其小孢子愈伤组织培养的一个重要因素。

表 2 不同基因型诱导形成胚性愈伤组织结果

基因型	花蕾数 (朵)	胚性愈伤组织 出现时间(d)	单瓶最高愈 伤数(个)	愈伤组织 数(个)	出愈率 (个/朵)
红色 401	63	68	3	62	0.98b
粉色 503	63	63	9	163	2.59c
香槟 601	63	54	12	306	4.86d
蓝色 601	63	—	0	0	0a
蓝雾 401	63	—	0	0	0a

注:以培养 80 d 得到 3 mm 以上胚性愈伤组织为计。同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著,下表同。

2.2 4℃低温预处理对洋桔梗小孢子胚性愈伤组织的诱导影响

在接种前对洋桔梗花蕾进行 4℃低温预处理获得的小孢子胚性愈伤组织比对照组多,说明对洋桔梗的花蕾进行一定时间的低温处理能提高小孢子愈伤组织发生频率。红色 401、粉色 503 和香槟 601 分别在 4℃低温条件下预处理 1、2、3 d 时均获得了胚性愈伤组织,均比未经处理的对照组的出愈率高,且以经 4℃低温预处理 1 d 获得愈伤组织的概率最大。其中,红色 401 达到 3.11 个/朵,粉色 503 达到 7.00 个/朵,香槟 601 达到 12.11 个/朵,分别是对照的 9.42、12.50、7.25 倍。随着处理时间的持续,低温处理有利于愈伤组织诱导的作用越来越不明显,处理 3 d 后,3 种基因型的诱导率均下降(表 3)。由此说明对洋桔梗花蕾进行一定时间的低温预处理是有必要的,且以处理 1 d 效果最佳。

表 3 4℃低温预处理对不同时间不同基因型胚性愈伤组织诱导的影响

处理 时间 (d)	花蕾 数 (朵)	愈伤组织数(个)			出愈率(个/朵)		
		红色 401	粉色 503	香槟 601	红色 401	粉色 503	香槟 601
0	9	3	5	15	0.33a	0.56a	1.67a
1	9	28	63	109	3.11c	7.00b	12.11b
2	9	16	46	83	1.78c	5.11a	9.22b
3	9	5	21	48	0.56b	2.33a	5.33a

2.3 32℃热激处理对洋桔梗小孢子胚性愈伤组织诱导的影响

32℃热激处理对洋桔梗小孢子胚性愈伤组织的获得有一定效果。热激 1 d 时,获得的胚性愈伤组织数低于对照,随着处理时间的延长,获得的胚性愈伤组织渐多,以处理 3 d 达到最大值,其中红色 401 愈伤组织率达到 0.78 个/朵,粉色 503 达到 1.44 个/朵,香槟 601 达到 3.33 个/朵,分别是对照的 2.36、2.57、1.99 倍(表 4)。虽然热激处理对于提高愈伤组织诱导率有效果,但是与 4℃低温预处理相比,差异较大。由此说明 32℃热激处理对于洋桔梗小孢子胚性愈伤组织的影响不明显。

表 4 32℃热激处理不同时间对不同基因型胚性愈伤组织诱导的影响

处理 时间 (d)	花蕾 数 (朵)	愈伤组织数(个)			出愈率(个/朵)		
		红色 401	粉色 503	香槟 601	红色 401	粉色 503	香槟 601
0	9	3	5	15	0.33b	0.56a	1.67c
1	9	0	7	9	0.00a	0.78b	1.00a
2	9	3	8	12	0.33c	0.89c	1.33b
3	9	7	13	30	0.78d	1.44d	3.33d

2.4 激素处理对洋桔梗小孢子胚性愈伤组织率的影响

同一基因型的小孢子在不同激素处理上的出愈率以及不同基因型在相同激素处理上出愈率存在差异(表 5)。红色 401 在 5 号激素处理上获得的胚性愈伤组织率最高,为 2.43 个/朵,在 2 号和 4 号激素处理中没有获得出胚性愈伤组织;粉色 503 出愈率最大是在 5 号激素处理上,达到 6.86 个/朵,在 2 号激素处理的诱导率为 0;而香槟 601 在 9 种处理中均诱导出胚性愈伤组织,在 5 号激素处理中出愈率最大,达到 8.86 个/朵,在 4 号激素处理中最小,仅为 2.14 个/朵。

红色 401 小孢子诱导胚性愈伤组织的激素极差大小顺序为 $R_c > R_b > R_d > R_A$,即影响愈伤组织诱导的激素大小顺序为 2,4-D>KT>NAA>6-BA,其中 2,4-D 的 k_3 最大,即浓度为 2.0 mg/L;KT 的 k_3 略大于 k_2 ,考虑到成本,最佳浓度取 1.0 mg/L;NAA 的 k_2 最大,浓度为 0.2 mg/L;6-BA 的 k_2 最大,浓度为 1.0 mg/L。由此确定红色 401 小孢子产生胚性愈伤组织的最佳培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L KT+2.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L NAA,影响粉色 503 和香槟 601 胚性愈伤组织诱导的激素大小顺序分别为 2,4-D>KT>6-BA>NAA 和 2,4-D>KT>NAA>6-BA,最佳培养基同为 MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L KT+2.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L NAA(表 6)。由此说明虽然激素种类对洋桔梗不同基因型小孢子培养诱导愈伤组织的影响大小不

表 5 不同激素浓度组合对不同基因型胚性愈伤组织诱导的影响

激素处理	激素浓度 (mg/L)				花蕾数 (朵)	愈伤组织数 (个)			出愈率 (个/朵)		
	A:6-BA	B:KT	C:2,4-D	D:NAA		红色 401	粉色 503	香槟 601	红色 401	粉色 503	香槟 601
1	0	0	1.0	0.2	7	6	5	30	0.86	0.71	4.29
2	0	1.0	0	0	7	0	0	16	0	0	2.29
3	0	2.0	2.0	0.5	7	12	35	44	1.71	5.00	6.29
4	1.0	0	0	0.5	7	0	3	15	0	0.43	2.14
5	1.0	1.0	2.0	0.2	7	17	48	62	2.43	6.86	8.86
6	1.0	2.0	1.0	0	7	11	28	40	1.57	4.00	5.71
7	2.0	0	2.0	0	7	4	7	28	0.57	1.00	4.00
8	2.0	1.0	1.0	0.5	7	7	24	36	1.00	3.43	5.14
9	2.0	2.0	0	0.2	7	5	13	35	0.71	1.86	5.00

一致,但在某一培养基配方中,不同基因型洋桔梗胚性愈伤组织的诱导均能达到经济、高效的结果。因此,筛选出适合洋桔梗小孢子胚性愈伤组织诱导的最佳激素组合为 5 号,即 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L KT + 2.0 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L NAA。

表 6 不同激素浓度组合对不同基因型胚性愈伤组织诱导影响的极差分析

k_{ij}	红色 401				粉色 503				香槟 601			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
k_1	0.86	0.48	0.24	0.71	1.90	0.71	0.76	1.67	4.29	3.48	3.14	4.00
k_2	1.33	1.14	1.14	1.33	3.76	3.43	2.71	3.14	5.57	5.43	5.05	6.05
k_3	0.76	1.33	1.57	0.90	2.10	3.62	4.29	2.95	4.71	5.67	6.38	4.52
R	0.57	0.85	1.33	0.62	1.86	2.91	3.53	1.47	1.28	2.19	3.24	2.05

3 讨论与结论

供试材料的基因型是影响小孢子培养的主要因素之一,决定着小孢子培养中产生的愈伤组织的数量和质量,这一现象在多种作物的小孢子培养中普遍存在^[9-10]。本试验供试的 5 个不同基因型洋桔梗材料中有 3 个诱导出愈伤组织,其他 2 个材料即便采取了不同温度、时间、激素组合等多种处理措施,也依旧无法诱导出愈伤组织,这可能是因为不同基因型洋桔梗材料的游离小孢子对离体培养的敏感度不同而产生的差异,有些材料容易得到愈伤组织,有些材料不容易或者不能得到愈伤组织,因而要特别重视对供体植株基因型的筛选。

已有研究表明,低温预处理花蕾,能从不同程度上促进胚性愈伤组织的诱导,这已经成为小孢子培养中普遍采用的一个重要步骤^[11-12]。Duncan 等发现,低温预处理不仅可以使花粉退化速度减慢,还能诱导更多花粉启动新的细胞周期,从而促使更多小孢子参与反应^[13]。Burgin 等分析认为,烟草花蕾经低温处理后,小孢子分裂指数显著上升^[14]。本试验通过 4 ℃低温预处理花蕾 1、2、3 d 获得的愈伤组织明显较对照多,其中以预处理 1 d 的效果最佳,随着处理时间的延续,得到的愈伤组织更少。可能是小孢子因长时间的低温预处理消耗过多营养以维持代谢,造成了自身活力的下降甚至死亡。因此,低温处理对诱导洋桔梗产生胚性愈伤组织有良好的效果。

董艳荣等认为,热激处理改变了小孢子的分裂方式,促使其形成孢子体而非成熟的花粉^[15]。Telmer 等研究发现,在甘蓝型油菜游离小孢子培养中必须采用高温热激处理,而且 32 ℃热激处理小孢子 3 d,会使其具有较强的分化能力^[16]。本试验中采用 32 ℃热激处理 1~3 d,获得的愈伤组织数较对照有显著提升,但相比低温预处理效果而言差距很大。可能是因为热激处理虽然可以明显促进小孢子的发育途径的转

变,但不同作物处理温度也不尽相同,洋桔梗须要在更高温度或更长时间方面加以尝试。也有可能是洋桔梗对高温反应迟钝,所以热激处理不能引起小孢子理化性质的改变,促使其分化。

在多种作物的游离小孢子培养中,为了提高愈伤组织的发生率,会在适宜范围内向培养基中添加不同的激素种类和浓度。小孢子培养时通常通过添加 2,4-D、NAA、IAA 等生长素和 KT、6-BA、ZT 等细胞分裂素来调整小孢子的分裂、分化、愈伤组织的形成等,由于材料的区别,添加的激素种类和浓度各有不同,其最适的激素种类和浓度配比要经过多次试验才能最终获得^[17-18]。本试验结果也表明,不同激素组合处理对不同基因型洋桔梗小孢子获得胚性愈伤组织的影响不同,其中以 2,4-D 的影响最大,浓度取 2.0 mg/L;KT 次之,浓度为 1.0 mg/L;6-BA 和 NAA 较基因型不同,影响的大小顺序稍有差异,但最佳浓度相同,分别是 1.0、0.2 mg/L。因此,该试验筛选出的最佳洋桔梗游离小孢子培养诱导胚性愈伤组织的培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L KT + 2.0 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L NAA。

通过本研究摸索出一些提高洋桔梗小孢子诱导胚性愈伤组织的因素,但是影响洋桔梗游离小孢子培养的因素还有很多,如培养方式、供体植株生长条件和生理状况、培养基组分、碳源种类和浓度、活性炭等,每个环节的细微变化都可能影响出愈率。因此,为了培育出洋桔梗的单倍体植株获得双单倍体即构建 DH 系还须要进一步研究。

参考文献:

[1]李响辉. 草原龙胆生物学特性及遗传研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2004.
[2]丁兵,王江. 草原龙胆种苗繁育及优质切花生产技术[J].

姜丽娜, 齐冰玉, 徐光武, 等. 水氮对根箱种植冬小麦根系生长及产量的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(14): 42–45.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.013

水氮对根箱种植冬小麦根系生长及产量的影响

姜丽娜, 齐冰玉, 徐光武, 马建辉, 李金娜, 李春喜

(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要: 根箱种植条件下, 探讨不同水氮施用量对冬小麦根系生长及产量的影响。结果表明, 根质量密度在拔节期表现为 N_2 最高, 较 N_0 、 N_1 处理分别提高 37.95%、5.74%; 在抽穗期表现为 $N_1 > N_0 > N_2$; 灌浆期根质量密度表现为充分灌水处理 (W_1) 大于水分亏缺处理 (W_0), 其中充分灌水处理下, N_1 处理根质量密度显著高于 N_0 、 N_2 。根质量密度主要分布在 0~10 cm 的土壤中。随着土壤深度的增加, 根质量密度逐渐降低, 根箱条件下, 部分处理在 30~40 cm 有小幅回升。随着生育时期的推进, 根冠比逐渐下降, 并在灌浆期达到最低。根冠比随着施氮量的增加而降低。灌浆期 N_1 、 N_2 处理下, 充分灌水 (W_1) 根冠比较水分亏缺 (W_0) 分别增加 1.62%、13.87%。在同一水分处理下, 随着施氮量的增加, 产量呈现出先升高后降低的趋势, 且充分灌水 (W_1) 高于水分亏缺 (W_0), 以 $N_1 W_1$ 处理的产量最高。因此, 适量的增施氮肥以及充分的灌水能够增加冬小麦的根质量密度, 增加地上部的光合产物, 从而提高产量。

关键词: 冬小麦; 水氮施用; 根质量密度; 根冠比

中图分类号: S512.106 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0042-04

植物根系的主要作用是吸收水分和肥料, 与植株地上部生长密切相关, 并在植物-土壤生态系统中扮演重要角色^[1-2]。根系的空间分布决定其对水分和肥料的吸收能力^[3]。适宜的水氮运筹措施可以调节根系生长^[4-5], 促进产量和水氮利用效率的提高, 还可避免造成地下水污染^[6-7]。

收稿日期: 2016-04-08

基金项目: 国家科技支撑计划 (编号: 2012BAD14B08、2013BAD07B14、2013BAD07B07); “十三五”国家重点研发计划 (编号: 2016YFD0300203-3)。

作者简介: 姜丽娜(1973—), 女, 河南新乡人, 博士, 教授, 主要从事作物高产高效生理研究。E-mail: jianglina73@yahoo.com。

种子世界, 2006(9): 42.

[3] 刘雪平, 刘志文, 涂金星, 等. 甘蓝型油菜小孢子培养技术的几项改进[J]. 遗传, 2003, 25(4): 433–436.

[4] 戈伟, 王述彬, 刘金兵, 等. 辣椒小孢子培养主要影响因素的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2009(4): 165–167.

[5] 赵俊, 巫东堂, 赵军良, 等. 影响大白菜游离小孢子培养若干因素的研究[J]. 山西农业科学, 2008, 36(8): 26–28.

[6] 崔群香, 刘卫东, 帅强, 等. 小白菜小孢子培养技术研究进展[J]. 金陵科技学院学报, 2009, 25(3): 77–81.

[7] 王玲仙, 蔺忠龙, 白现广, 等. 水稻游离小孢子培养最新研究进展[J]. 生物技术, 2009, 19(6): 92–95.

[8] 秦余香, 夏光敏. 小麦的小孢子培养[J]. 植物学通报, 2004, 21(5): 625–630.

[9] 耿建峰, 侯喜林, 张晓伟, 等. 影响白菜游离小孢子培养关键因素分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(1): 111–116.

[10] 李必元, 叶国锐, 王五宏, 等. 结球白菜游离小孢子培养与植株再生[J]. 浙江农业科学, 2012, 53(4): 503–506.

[11] 白小姐, 张丽, 许明. 预处理对萝卜离体小孢子发育的影响[J]. 西北农业学报, 2008, 17(3): 254–257, 279.

灌水影响土壤水分含量, 进而影响根的生长。研究表明, 适当的土壤水分能显著增加植株根的长度和密度^[8], 干旱条件下根系 N、P 积累量减少^[9-11], 根系总生物量减少, 但是深层土壤中根系量增加, 有利于吸收深层土壤中的水分和养分^[12]。适量施肥促进了根系在土壤中的延伸和分布, 有利于其对水分和养分的吸收^[13-14]。干旱条件下施肥能够促进小麦植株早期生长, 使根系迅速下扎, 有利于植株在早期吸收深层土壤水分; 但是过量养分施入抑制根系下扎, 减少了其对硝态氮的吸收^[15-16]。适宜的根冠比, 能够保证作物正常生长。根冠比较低会限制作物生长, 而根冠比过高会导致过多的同化物在根部被消耗, 从而影响产量^[17]。田间试验条件下, 施入土壤

[12] 周广栋, 王秀峰, 谢冰, 等. 番茄花药离体培养中低温预处理对小孢子发育的影响[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 192–195.

[13] Duncan E J, Heberl E. Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotiana glauca* and consequently on plantlet production[J]. Protoplasma, 1976, 90(3): 173–177.

[14] Burgin J P, Nitsch J P. Obtention de *Nicotiana glauca* haploïdes a partir d'étamines cultivées *in vitro*[J]. Ann Physiol Veg, 1967(9): 377–382.

[15] 董艳荣, 龚义勤. 茄果类蔬菜花药和花粉培养研究进展[J]. 长江蔬菜, 2001(5): 30–32.

[16] Telmer C A, Newcomb W, Simmonds D H. Cellular changes during heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv. topas[J]. Protoplasma, 1995, 109(185): 106–112.

[17] 王涛涛, 李汉霞, 张继红, 等. 红菜薹游离小孢子培养与植株再生[J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(6): 569–571.

[18] 赵前程, 吉立柱, 蔡荣旗, 等. 花椰菜游离小孢子培养及植株再生研究[J]. 华北农学报, 2007, 22(6): 65–68.