

姚悦梅,任 杰,刘传宏,等. 组蛋白去乙酰化抑制剂诱导羽衣甘蓝小孢子胚状体发生和植株再生[J]. 江苏农业科学,2024,52(4):168-173.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.04.025

组蛋白去乙酰化抑制剂诱导羽衣甘蓝小孢子胚状体发生和植株再生

姚悦梅¹, 任 杰², 刘传宏², 山 溪¹, 张振超¹, 戴忠良¹

(1. 江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏句容 212400; 2. 沈阳农业大学, 辽宁沈阳 110866)

摘要:羽衣甘蓝是 2 年生植物, 2 年完成 1 个有性生殖世代, 游离小孢子培养是加快其纯合化的有效途径。但是由于羽衣甘蓝小孢子培养的诱胚率低, 使其难以育种应用。组蛋白乙酰化是一种重要的表观遗传学机制, 影响小孢子发育途径, 促进小孢子胚状体发生。本研究分别用不同浓度的组蛋白去乙酰化抑制剂辛二酰苯胺异羟肟酸和曲古菌素 A 处理羽衣甘蓝红斑点的小孢子, 以诱导胚状体发生。结果表明, 辛二酰苯胺异羟肟酸浓度为 0.075 $\mu\text{mol/L}$ 时, 红斑点获得最多胚状体, 为每个花蕾获得 20.24 个胚状体, 同时直接成苗率也达到最高, 为 16.07%。曲古菌素 A 浓度为 0~0.150 $\mu\text{mol/L}$ 时, 红斑点的胚状体发生率和直接成苗率都降低。适当浓度的辛二酰苯胺异羟肟酸可以促进羽衣甘蓝红斑点小孢子胚状体发生和直接成苗率, 而 0~0.150 $\mu\text{mol/L}$ 曲古菌素 A 对羽衣甘蓝红斑点胚状体的发生和直接成苗率有抑制作用。

关键词:羽衣甘蓝; 小孢子培养; 组蛋白去乙酰化抑制剂; 胚状体发生

中图分类号:S635.904 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)04-0168-06

羽衣甘蓝叶片层次丰富, 株型紧凑, 被誉为观叶植物中的牡丹花, 可直接用于瓶插和盆景。观赏时间长且心叶色鲜艳, 秋冬季节被广泛应用于景观美化。栽培观赏期有 3~4 个月。羽衣甘蓝为绿色春化植物, 杂合基因型材料需要 6~8 年才能培育出可用于商业种子生产的纯合自交系。因此, 加速育种材料的纯合化具有重要的商业意义。

游离小孢子培养是利用细胞全能性和培养单倍体小孢子从而获得再生植株, 可以缩短获得纯合株系的时间^[1]。自 Lighter 在 1989 年首次通过羽衣甘蓝小孢子培养成功获得再生植物以来, 这项技术一直在不断改进、发展并应用于许多十字花科植物^[2]。羽衣甘蓝的小孢子培养体系也得到了改进和优化^[3-11]。影响小孢子胚状体发生的因素有很多, 包括供体植物的基因型、生长状态、培养基、小孢子活力、激素处理和培养环境等^[12]。植物生长调节剂可以促进小孢子胚状体发生, 例如 2,4-表油菜素内酯、脱落酸、水杨酸和茉莉酸、谷胱甘肽和 α -生育酚^[7,13-14]。Lighter 发现, 在培养基中添加 6-苄基氨基嘌呤和萘乙酸可以提高甘蓝小孢子胚状体发生率^[2]。Feng 等在 2009 年对白菜的研究中

收稿日期:2023-03-30

基金项目:江苏省重点研发(现代农业)计划(编号:BE2021376)。

作者简介:姚悦梅(1974—), 女, 新疆石河子人, 研究员, 从事羽衣甘蓝种质创新利用与栽培技术研究。E-mail: 1045714975@qq.com。

通信作者:戴忠良, 硕士, 研究员, 从事甘蓝类蔬菜遗传育种研究。
E-mail: daizhongliang2008@126.com。

[26] 谢玉明, 易干军, 张秋明. 钙在果树生理代谢中的作用[J]. 果树学报, 2003, 20(5): 369-373.

[27] Brummell D A. Cell wall disassembly in ripening fruit[J]. Functional Plant Biology, 2006, 33(2): 103-119.

[28] Jiang F L, Lopez A, Jeon S, et al. Disassembly of the fruit cell wall by the ripening-associated polygalacturonase and expansin influences tomato cracking[J]. Horticulture Research, 2019, 6(17): 1-15.

[29] 陈 硕, 陈 珈. 植物中钙依赖蛋白激酶(CDPKs)的结构与功

能[J]. 植物学通报, 2001(2): 143-148.

[30] Zhu M T, Yu J, Zhao M, et al. Transcriptome analysis of metabolisms related to fruit cracking during ripening of a cracking-susceptible grape berry cv. Xiangfei (*Vitis vinifera* L.)[J]. Genes & Genomics, 2020, 42(6): 639-650.

[31] 周宏伟, 吴耕西. 长把梨贮藏中多聚半乳糖醛酸酶与果胶甲酯酶的作用[J]. 山东农业大学学报, 1992, 23(1): 67-70.

[32] 马雯彦, 庞晓明, 续九如, 等. 果实裂果影响因子研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(6): 798-804.

发现, 0.05 mg/L 6-苄基氨基嘌呤和 0.1 ~ 0.2 mg/L 6-苄基腺嘌呤可将小孢子胚状体发生率提高到 8.13 个胚/蕾^[15]。Chen 等在羽衣甘蓝的研究中, 在 nln-13 培养基中添加亚甲基蓝, 提高了胚状体诱导率^[3], Ari 等在 2021 年对小孢子进行冷休克处理, 也提高了胚状体诱导率^[5]。早期, 笔者进行了羽衣甘蓝小孢子培养试验, 发现胚状体诱导非常困难。Jiang 等发现曲古菌素 A 促进了小麦胚状体发生^[16]。本试验研究了不同浓度的组蛋白去乙酰化抑制剂辛二酰苯胺异羟肟酸和曲古菌素 A 对羽衣甘蓝红斑鸠小孢子胚诱导率和植株再生的影响, 用流式细胞仪检测再生植株的倍性, 并研究 DH 系的园艺特性, 以期加速羽衣甘蓝的育种进程, 提高育种效率。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选择羽衣甘蓝红斑鸠作为小孢子培养材料。植株种子于 2018 年 7 月中旬在试验基地播种。8 月移植到花盆中, 10 月移植到温室中。翌年 1—2 月在温室抽薹开花, 在晴天选择生长条件良好的花序用于小孢子培养。植株分别种植于沈阳农业大学和江苏丘陵地区镇江农业科学研究所实验基地。

1.2 小孢子培养

小孢子培养试验在 Sato 等的方法^[17]基础上进行了修改。选择花瓣与花药长度之比 (P/A) 为 0.5 ~ 0.8 的花蕾作为试验材料, 置于 4 ℃ 冰箱中 24 h。然后分别用体积分数为 75% 的乙醇和质量浓度为 0.1% 的氯化汞消毒花蕾 30 s 和 6 min, 然后用无菌超纯水洗涤 3 次, 每次 5 min。将花蕾放置于 8 ~ 10 mL B₅ 液体培养基中, 用无菌玻璃棒研磨分离小孢子。依次用 74 μm 不锈钢细胞筛和 40 μm 细胞筛过滤悬浮液。随后, 将悬浮液倒入 50 mL 离心管中, 加入 B5 液体培养基至 30 mL, 并在 2 000 r/min 下离心 3 min。弃上清液, 再次加入 B5 液体培养基至 30 mL, 然后离心 3 min。再次移除上清液, 将得到的小孢子倒入 NLN 培养基^[18], 并使用血球计数板将小孢子浓度调整为 1×10^5 个/mL。然后将小孢子悬浮液装入 5 mL 无菌塑料培养皿 (60 mm × 15 mm)。每个培养皿加入 100 μL 活性炭。最后, 用 Parafilm 封口膜密封培养皿, 在 33 ℃ 下培养 24 h, 然后转移至 25 ℃ 黑暗培养。

1.3 组蛋白去乙酰化抑制剂处理

将辛二酰苯胺异羟肟酸和曲古菌素 A (美国赛

莱克斯化学公司) 溶解在二甲基亚砜 (DMSO) 中, 浓度为 0.5 mmol/L。将溶液的 pH 值调节至 5.8, 并在无菌条件下过滤。配制 0、0.025、0.050、0.075、0.100、0.125、0.015 μmol/L 的辛二酰苯胺异羟肟酸和曲古菌素 A。在小孢子培养过程中, 向培养皿中添加 5 mL 小孢子悬浮液, 分别添加不同体积的辛二酰苯胺异羟肟酸和曲古菌素 A。以 0.025 μmol/L 为例, 每个培养皿 (5 mL 小孢子悬浮液) 需要 250 nL 辛二酰苯胺异羟肟酸。因此, 分别向每个培养皿中添加 0 nL (相当于 0 μmol/L 作为对照)、250 nL (0.025 μmol/L)、500 nL (0.050 μmol/L)、750 nL (0.075 μmol/L)、1.00 μL (0.100 μmol/L)、1.25 μL (0.125 μmol/L) 和 1.50 μL (0.150 μmol/L) 辛二酰苯胺异羟肟酸和曲古菌素 A 溶液。

1.4 胚状体发生与植株再生

当胚状体长到 0.5 cm 时 (小孢子培养后约 20 d), 将其转移到 45 r/min 摇床中, 25 ℃ 暗培养 1 周。统计胚状体数量并转移到固体 Murashige and Skoog (MS) 培养基 (含 7.5 g/L 琼脂粉、0.1 g/L 活性炭、30 g/L 蔗糖, pH 值为 5.8) 中。将胚状体种植在锥形瓶中, 当胚生长成愈伤组织时, 将愈伤组织切割并转移到含有 5.5 g/L 琼脂粉的 MS 固体分化培养基中。这个过程重复 2 ~ 3 次, 每次持续 20 ~ 25 d。

1.5 倍性鉴定

用 FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD Biosciences 公司) 鉴定再生植株的倍性。选择叶面积约 2 cm² 的新鲜叶片, 置于培养皿中, 加入 1.5 mL chopping buffer 缓冲溶液 (含 0.5 mmol/L 精胺、15 mmol/L Tris、2 mmol/L EDTA-2Na、0.1% TritonX-100、20 mmol/L NaCl、80 mmol/L KCl 和 15 mmol/L β-巯基乙醇, pH 值为 7.2 ~ 7.5)。用医用剪刀快速切碎叶片组织, 经过 300 目筛过滤到离心管中, 10 000 r/min 离心 10 min。分离上清液并避光加入 1 mL PI 染料溶液染色 15 min。最后, 使用 500 目筛将混合溶液过滤到样品管中进行测定。以二倍体植株作为对照。

1.6 试验设计与数据分析

在小孢子培养试验中, 每个组蛋白去乙酰化酶抑制剂浓度处理重复 3 次。小孢子培养之后 20 d 统计胚状体数。使用 SPSS 软件进行数据分析, 并使用单因素方差分析 ($\alpha = 0.05$) 进行数据显著性比较。

2 结果与分析

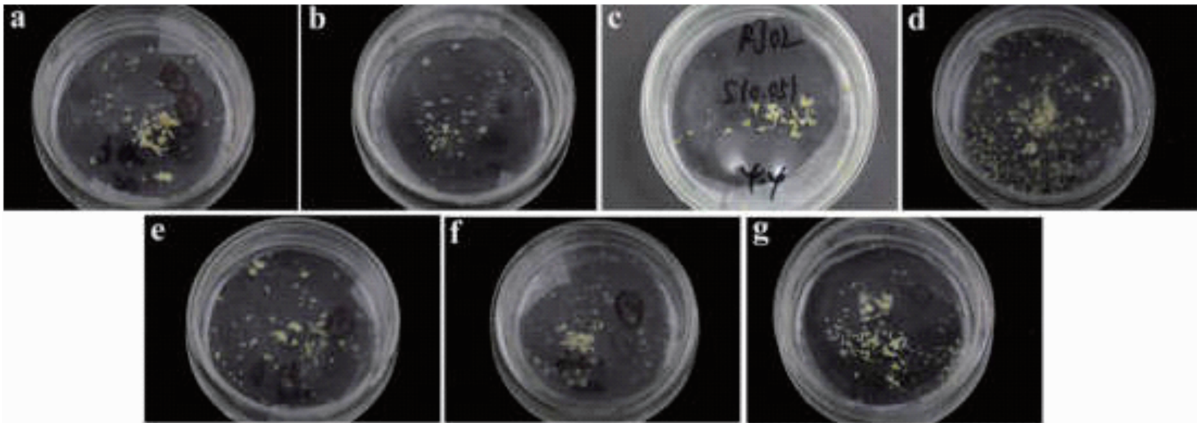
2.1 辛二酰苯胺异羟肟酸和曲古菌素 A 对小孢子胚状体发生的影响

辛二酰苯胺异羟肟酸促进了羽衣甘蓝红斑鸠小孢子胚状体的发生(表 1)。辛二酰苯胺异羟肟酸浓度为 0.075 $\mu\text{mol/L}$ 时,红斑鸠胚状体发生率达到最高,即 20.24 胚/蕾,是对照组的 1.39 倍(图 1)。辛二酰苯胺异羟肟酸浓度超过 0.075 $\mu\text{mol/L}$ 时会产生负面影响,小孢子胚状体诱导率降低。不同浓度辛二酰苯胺异羟肟酸诱导小孢子胚胎发生率存在显著差异。

表 1 不同辛二酰苯胺异羟肟酸浓度对羽衣甘蓝红斑鸠小孢子胚胎发生的影响

辛二酰苯胺异羟肟酸浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	胚状体数 (胚/蕾)
0.000	14.55 \pm 1.21b
0.025	15.90 \pm 2.49b
0.050	16.06 \pm 0.35b
0.075	20.24 \pm 1.75a
0.100	17.37 \pm 1.10ab
0.125	16.76 \pm 0.99ab
0.150	15.80 \pm 0.75b

注:同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。
表 2 同。



a—红斑鸠对照; b—0.025 $\mu\text{mol/L}$; c—0.050 $\mu\text{mol/L}$; d—0.075 $\mu\text{mol/L}$; e—0.100 $\mu\text{mol/L}$; f—0.125 $\mu\text{mol/L}$; g—0.150 $\mu\text{mol/L}$

图1 辛二酰苯胺异羟肟酸诱导红斑鸠的胚状体

曲古菌素 A 对羽衣甘蓝红斑鸠胚状体的发生产生了抑制作用(表 2)。0.025 ~ 0.150 $\mu\text{mol/L}$ 曲古菌素 A 均导致红斑鸠胚状体发生率降低。其中 0.075 $\mu\text{mol/L}$ 曲古菌素 A 诱导红斑鸠胚状体发生最少,即 6.35 胚/蕾(图 2)。

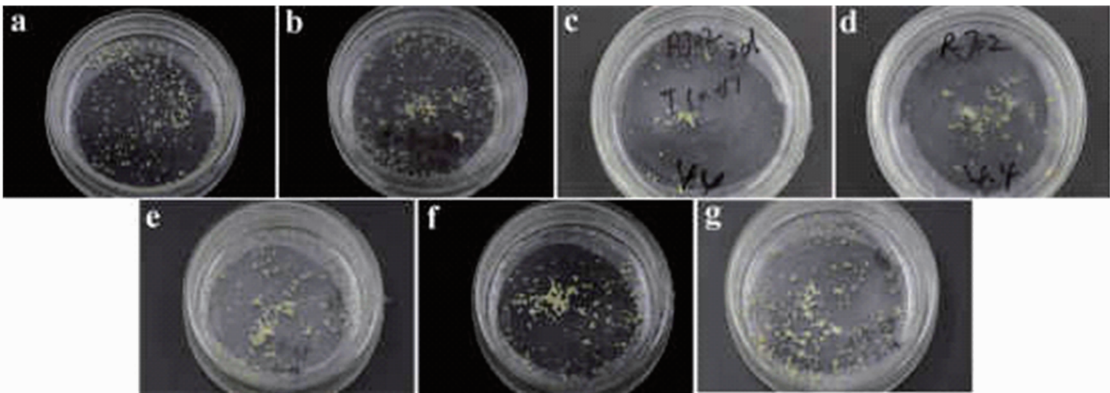
表 2 不同曲古菌素 A 浓度对羽衣甘蓝红斑鸠小孢子胚胎发生的影响

曲古菌素 A 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	胚状体数 (胚/蕾)
0.000	13.53 \pm 1.65a
0.025	10.36 \pm 0.65ab
0.050	7.73 \pm 0.43bc
0.075	6.35 \pm 0.71c
0.100	8.41 \pm 1.21bc
0.125	7.88 \pm 1.50bc
0.150	9.00 \pm 2.34bc

2.2 辛二酰苯胺异羟肟酸和曲古菌素 A 对小孢子植株再生的影响

将胚状体移植到 MS 固体培养基中(图 3 - b),然后直接生长成再生幼苗(图 3 - c)和愈伤组织,接着将再生幼苗和愈伤组织移植到生根培养基中进行生根培养,生根之后长成正常幼苗(图 3 - d),将试管苗移植到花盆中(图 3 - e)。当辛二酰苯胺异羟肟酸浓度为 0.075 $\mu\text{mol/L}$ 时,红斑鸠直接长成幼苗的比例最高,为 16.07%,是对照的 4.37 倍,胚状体长成愈伤组织的比率达到最低,为 46.43%,是对照的 73%,胚状体死亡率提高到 37.50%,是对照的 1.13 倍。红斑鸠胚状体的死亡率在 0.025 $\mu\text{mol/L}$ 时降到最低值,为 17.24%,是对照的 52%(表 3)。

0 ~ 0.150 $\mu\text{mol/L}$ 曲古菌素 A 对红斑鸠直接成苗率有抑制效果,0.10 $\mu\text{mol/L}$ 曲古菌素 A 效果最为明显,直接成苗率为 0。当曲古菌素 A 浓度为



a—红斑鸫对照；b—0.025 μmol/L；c—0.050 μmol/L；d—0.075 μmol/L；e—0.100 μmol/L；f—0.125 μmol/L；g—0.150 μmol/L
图2 曲古菌素 A 诱导红斑鸫的胚状体



a—红斑鸫亲本；b—胚状体；c—继代植株；d—再生植株生根；
e—再生植株定植；f—再生植株抽薹
图3 红斑鸫的小孢子游离培养

表 3 不同辛二酰苯胺异羟肟酸浓度对红斑鸫植株再生的影响

辛二酰苯胺异羟肟酸 浓度(μmol/L)	直接成苗 的比率(%)	转化为愈伤 组织的比率(%)	胚状体 死亡率(%)
0.000	3.68	63.19	33.13
0.025	5.17	77.59	17.24
0.050	4.62	60.38	35.00
0.075	16.07	46.43	37.50
0.100	8.93	67.60	23.47
0.125	10.71	57.14	32.15
0.150	0.93	65.74	33.33

0.050 μmol/L 时,红斑鸫愈伤组织的比率达到最低,为61.03%,是对照的98%。曲古菌素 A 提高了红斑鸫胚状体死亡率,当曲古菌素 A 浓度为0.050 μmol/L 时,胚状体死亡率达到最高,为36.65%,是对照的1.09 倍(表4)。

2.3 小孢子再生植株的倍性鉴定

红斑鸫的小孢子游离培养的再生植株是由不

表 4 不同曲古菌素 A 浓度对红斑鸫植株再生的影响

曲古菌素 A 浓度 (μmol/L)	直接成苗的 比率(%)	转化为愈伤组织 的比率(%)	胚状体 死亡率(%)
0.000	3.92	62.39	33.69
0.025	2.56	62.99	34.45
0.050	2.32	61.03	36.65
0.075	1.98	63.02	35.00
0.100	0	66.22	33.78
0.125	1.20	63.02	35.78
0.150	3.02	61.88	35.10

同倍性的植株组成的,分为单倍体、二倍体、四倍体。再生植株的倍性是通过流式细胞仪鉴定,图4 中横坐标接近100、200、400 分别代表单倍体、二倍体、四倍体植株,共获得红斑鸫再生植株1 023 株,其中单倍体植株746 株,占比最高,为72.92%,双倍体植株275 株,占比为26.88%,四倍体植株只有2 株,占比为0.20%。

2.4 DH 系园艺学特征

小孢子游离培养获得的双单倍体品系的园艺性状有着丰富的变异。红斑鸠表现为红色内叶绿绿色外叶。通过游离小孢子培养获得的 DH 系有内外

叶都是红绿嵌合(图 5 - a)、内叶红绿嵌合绿色外叶(图 5 - b,5 - c)、粉色内叶绿绿色外叶(图 5 - d)、内叶红绿嵌合外叶部分嵌合部分绿色(图 5 - e)和白色内叶绿绿色外叶(图 5 - f)。

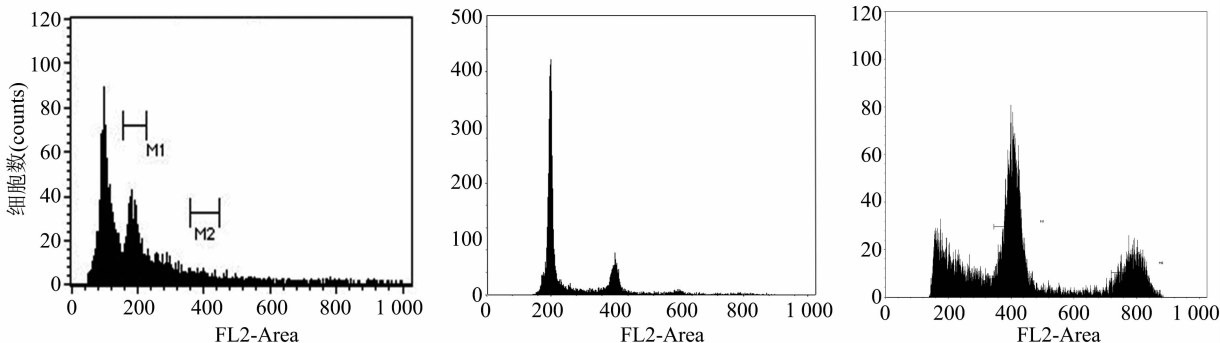
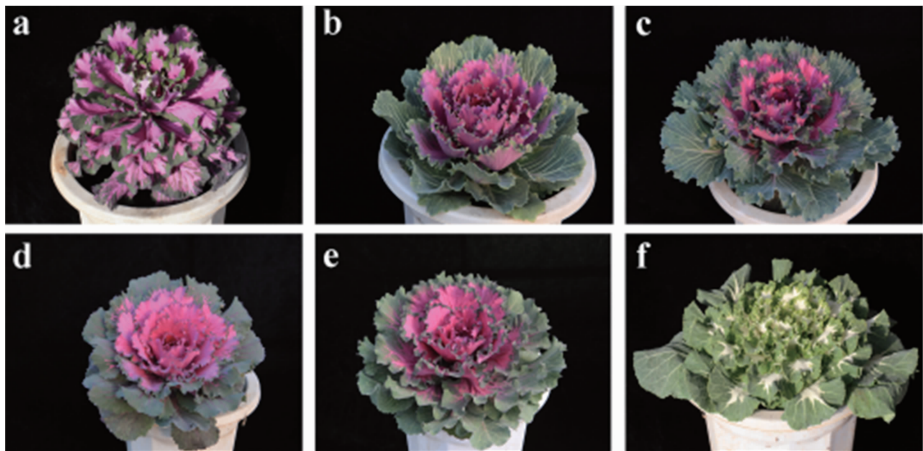


图4 红斑鸠再生植株的倍性鉴定



a—DH-1; b—DH-2; c—DH-3; d—DH-4; e—DH-5; f—DH-6

图5 红斑鸠的 DH 系

3 讨论与结论

本研究采用辛二酰苯胺异羟肟酸和曲古菌素 A 处理羽衣甘蓝红斑鸠小孢子。结果表明,当辛二酰苯胺异羟肟酸浓度为 0.075 $\mu\text{mol/L}$,红斑鸠获得了最多的胚状体,每个花蕾可得到 20.24 个胚状体,并将直接成苗率提高至 16.07%。0.000 ~0.150 $\mu\text{mol/L}$ 曲古菌素 A 对羽衣甘蓝红斑鸠胚状体的发生和成苗率有抑制作用。其中 0.075 $\mu\text{mol/L}$ 的曲古菌素 A 诱导红斑鸠胚状体发生最少,每个花蕾仅有 6.35 个胚状体。0.100 $\mu\text{mol/L}$ 曲古菌素 A 效果最为明显,直接成苗率为 0。

组蛋白去乙酰化抑制剂对小孢子胚状体发生有明显的影

响。辛二酰苯胺异羟肟酸是组蛋白去乙酰化抑制剂。组蛋白乙酰化酶和组蛋白去乙酰化酶之间的平衡调节组蛋白乙酰化。当植物体内的酶活性受到抑制时,平衡被打破,组蛋白乙酰化水平发生变化,从而诱导小孢子胚状体主要调控基因的转录和表达;因此,大量细胞从花粉途径转变为胚状体发育途径,随后产生大量胚状体^[19]。在甘蓝型油菜的研究中,Li 等发现,组蛋白去乙酰化抑制剂辛二酰苯胺异羟肟酸增加了小孢子胚状体发生的总量^[20]。在对小白菜的研究中,发现丁酸钠、曲古菌素 A 和辛二酰苯胺异羟肟酸可提高胚状体产量^[19]。Liu 等发现,曲古菌素 A 对 3 种切花羽衣甘蓝小孢子胚胎发生有促进作用^[21]。在本研究中,羽衣甘蓝红斑鸠小孢子分别用 7 个浓度的辛二酰苯胺异羟肟酸和曲古菌素 A 处理。结果表明,在试验浓度范围内辛二酰苯胺异羟肟酸提高了的小孢子胚状体发生率。不同浓度辛二酰苯胺异羟肟酸表

现出不同的胚状体诱导效果,0.075 $\mu\text{mol/L}$ 辛二酰苯胺异羟肟酸效果最好。但曲古菌素 A 抑制了胚状体的发生。

利用杂交种作为小孢子培养材料可以产生丰富的纯和突变材料。Liu 等对红叶切花羽衣甘蓝双色鹤进行小孢子培养产生了具有粉红色、白色和绿色叶子的材料^[21]。本研究中,对红色内叶的红斑鸠进行小孢子培养,产生了红绿嵌合叶片、粉色叶片和白色内叶的纯合系。纯合系具有丰富变异是培育观赏甘蓝的重要材料。观赏甘蓝纯合系的所有基因位点都是纯合的,可以稳定遗传,是选育高产、优质、强优势组合的宝贵材料。

本研究筛选出了适合羽衣甘蓝的小孢子胚状体诱导剂,并确定了切花羽衣甘蓝的适宜浓度,对游离小孢子培养在羽衣甘蓝上的应用具有重要意义。本研究为改进羽衣甘蓝的游离小孢子培养做出了贡献,下一步将以纯合系为亲本配制杂交组合,测定其配合力,筛选出优良杂交种。

参考文献:

- [1] Fehér A, Pasternak T P, Dudits D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 74(3): 201–228.
- [2] Lighter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species [J]. *Plant Breeding*, 1989, 103(2): 119–123.
- [3] Chen W S, Zhang Y, Ren J, et al. Effects of methylene blue on microspore embryogenesis and plant regeneration in ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 248: 1–7.
- [4] Dai X G, Shi X P, Fu Q, et al. Improvement of isolated microspore culture of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*): effects of sucrose concentration, medium replacement, and cold pre-treatment [J]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2009, 84(5): 519–525.
- [5] Ari E, Bedir H, Mutlu N. Enhancement of embryogenesis in freshly isolated microspore cultures of ornamental kale through direct cold shock treatment [J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 280: 109961.
- [6] Niu R Q, Zhang Y, Tong Y, et al. Effects of p-chlorophenoxyisobutyric acid, arabinogalactan, and activated charcoal on microspore embryogenesis in kale [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(2): 3897–3909.
- [7] Wang Y S, Tong Y, Li Y F, et al. High frequency plant regeneration from microspore – derived embryos of ornamental kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 130(1): 296–302.
- [8] Yao Y, Zhang Z, Shan X, et al. Microspore embryogenesis cytological structures variation and plant regeneration of kale [J]. *Southern Agriculture*, 2019, 50(5): 924–931.
- [9] 汤青林, 宋明, 张钟灵. 甘蓝类蔬菜游离小孢子培养研究进展 [J]. *西南农业学报*, 2000, 13(3): 98–103.
- [10] 姜凤英, 冯辉. 羽衣甘蓝游离小孢子培养初报 [J]. *园艺学报*, 2005, 32(5): 884.
- [11] 冯辉, 姜凤英, 冯建云, 等. 羽衣甘蓝游离小孢子培养技术研究及应用 [J]. *园艺学报*, 2007, 34(4): 1019–1022.
- [12] Winarto B, da Silva J A T. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2011, 107(2): 305–315.
- [13] Ahmadi B, Shariatpanahi M E, da Silva J A T. Efficient induction of microspore embryogenesis using abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid in *Brassica napus* L. [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, 116(3): 343–351.
- [14] Hoseini M, Ghadimzadeh M, Ahmadi B, et al. Effects of ascorbic acid, alpha-tocopherol, and glutathione on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 2014, 50(1): 26–35.
- [15] Feng H, Yang S, Wang C N, et al. Obtaining and utilization of DH lines in pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* L.) [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(9): 3195–3202.
- [16] Jiang F Y, Ryabova D, Diedhiou J, et al. Trichostatin A increases embryo and green plant regeneration in wheat [J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(11): 1701–1706.
- [17] Sato T, Nishio T, Hirai M. Plant regeneration from isolated microspore cultures of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) [J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 8(8): 486–488.
- [18] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* [J]. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 1982, 105(5): 427–434.
- [19] Zhang L, Zhang Y, Gao Y, et al. Effects of histone deacetylase inhibitors on microspore embryogenesis and plant regeneration in Pakchoi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* L.) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2016, 209: 61–66.
- [20] Li H, Soriano M, Cordewener J, et al. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A promotes totipotency in the male gametophyte [J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(1): 195–209.
- [21] Liu C H, Song G X, Zhao Y H, et al. Trichostatin A induced microspore embryogenesis and promoted plantlet regeneration in ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) [J]. *Horticulturae*, 2022, 8(9): 790.