

胡萝卜游离小孢子培养及其发育过程研究

李金荣, 欧承刚, 庄飞云*, 赵志伟, 胡 鸿, 毛笈华

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要: 以 11 份不同基因型胡萝卜为试材进行游离小孢子培养研究, 并对胚状体及愈伤组织形成过程进行细胞学观察。诱导培养 92 d 后, 有 5 份材料形成肉眼可见的胚状体或愈伤组织。其中 70198 和 80Q54 均诱导出胚状体和愈伤组织, 胚状体产率分别为每皿 10.56 和 7.00 个, 愈伤组织产率分别为每皿 3.56 和 8.38 个; 90234 仅形成胚状体, 产率为每皿 6.75 个; 70Q78 和 80Q52 仅产生愈伤组织, 产率分别为每皿 3.00 和 1.00 个。细胞学观察表明胚状体和愈伤组织形成过程具有完全不同的结构特征。发育成胚状体的小孢子细胞壁变薄, 膨大伸长, 长度可至原来的 1.5 ~ 4.0 倍, 有明显大液泡, 初期细胞纵向分裂, 成串排列, 细胞之间紧密连接, 而发育成愈伤组织的小孢子膨大成球状, 多次分裂后松散地连接在一起。通过流式细胞仪鉴定 70198、70Q78 和 80Q54 获得的 137 株再生植株倍性, 单倍体、二倍体及三倍体所占比例分别为 68.6%、29.9% 和 1.5%。

关键词: 胡萝卜; 游离小孢子; 胚状体; 愈伤组织; 倍性

中图分类号: S 631.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 08-1539-08

Studies on the Development of Microspores in Carrot Isolated Microspore Culture

LI Jin-rong, OU Cheng-gang, ZHUANG Fei-yun*, ZHAO Zhi-wei, HU Hong, and MAO Ji-hua

(*Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*)

Abstract: The differences about the development of embryoids and calli arising from microspores were investigated in isolated microspore culture with eleven carrot accessions. After cultured about 92 days, five accessions began to form embryoids or calli. 70198 and 80Q54 produced both, the productions of embryoids were 10.56 and 7.00 per dish, and the productions of calli were 3.56 and 8.38 per dish, respectively. 90234 only produced embryoids, and the production was 6.75 per dish. 70Q78 and 80Q52 only formed calli, and the productions were 3.00 and 1.00 per dish, respectively. Microspores with thin wall, size elongating 1.5 - 4.0 folds, and large vacuole would develop into embryoids. Firstly they latitude split, arranged in series and connected tightly each other. While the microspores expanding like globe shape, splitting and connecting loosely would grow up to calli. The ploidy level of 137 regenerated plants from 70198, 70Q78 and 80Q54 were detected using flow cytometry, and 68.6% were haploid, 29.9% double haploid, and 1.5% triploid.

收稿日期: 2011 - 04 - 11; **修回日期:** 2011 - 07 - 29

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2060302-2-09); 公益性行业科研 (农业) 专项 (200903016); 北京市重点学科建设项目; 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fy_zhuang@caas.net.cn)

Key words: carrot; isolated microspore; embryoid; calli; ploidy

游离小孢子培养是一种从单细胞水平上快速创制单倍体和纯合二倍体(DH)的现代生物技术手段。Maluszynski 等(2003)在纯合二倍体生产手册中列出了 33 种重要作物以及 226 种其他植物的文献报道,其中育种中取得较好进展的有芸薹属作物(大白菜、甘蓝、油菜等)、禾本科作物(小麦和大麦)、亚麻等,而番茄、茄子、辣椒、黄瓜、萝卜、苹果等虽然只取得一些关键性技术的突破,没有广泛应用于育种,但一直受到众多遗传学家和育种家的关注(连勇 等,2004;刘凡 等,2007;Dunwell, 2010; Ferrie & Caswell, 2010)。

目前胡萝卜单倍体培养技术主要在花药培养方面取得一定进展(Tyukavin et al., 1999; Adamus & Michalik, 2003; Górecka et al., 2005, 2009; Kowalska et al., 2008; 庄飞云 等, 2010),而有关胡萝卜游离小孢子培养研究进展较为缓慢。Matsubara等(1995)首次在胡萝卜游离小孢子培养中诱导出小愈伤组织,没有形成再生植株。Górecka等(2010)从胡萝卜品种‘Feria F₁’的 5 株不同供体植株中诱导出胚状体,获得 42 株再生植株,倍性鉴定全为二倍体。Ferrie等(2010)对胡萝卜、茴香、芹菜、茼蒿、防风等 20 种伞形花科作物进行游离小孢子培养,获得了 17 株胡萝卜再生植株。作者基于前人工作基础,通过优化胡萝卜小孢子提取方法,以不同基因型胡萝卜材料开展相关研究,并对小孢子形成胚状体和愈伤组织过程进行细胞学观察,为进一步完善胡萝卜小孢子培养技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以 11 份不同基因型胡萝卜为试材,除 70198 和 90234 为自交系外,其它为采用人工去雄的方法杂交获得的F₁代(表 1)。HCM A.C.、Beta III、2327 由美国威斯康星大学提供。时田 5 寸、黑田 5 寸、改良黑田 5 寸、早春红冠是从国内市场上购买的栽培品种。山西绛紫、两头齐、阿姆斯特丹、丹佛斯和南特斯由中国农业科学院蔬菜花卉研究所国家种质资源中期库提供。各试材于 2008 年 7 月下旬播于中国农业科学院蔬菜花卉研究所试验田,11 月初收获种根并贮藏于地窖中进行春化处理,在翌年 3 月初将经过春化处理的种根种植于塑料大棚,每份材料 10~15 株,4 月底植株开始抽薹开花。

表 1 用于游离小孢子培养的不同基因型胡萝卜材料

Table 1 Different carrot genotypes selected for isolated microspore culture

材料编号 Code	基因型 Genotype	类型 Type
70198	HCM A.C.	自交系 Inbred line
70Q78	山西绛紫 × 丹佛斯 Shanxi Jiangzi × Danvers	F ₁
80Q48	HCM A.C. × 丹佛斯 HCM A.C. × Danvers	F ₁
80Q49	HCM A.C. × 时田 5 寸 HCM A.C. × Shitian 5 Cun	F ₁
80Q50	HCM A.C. × 改良黑田 5 寸 HCM A.C. × Gailiang Heitian 5 Cun	F ₁
80Q51	HCM A.C. × 阿姆斯特丹 HCM A.C. × Amsterdam	F ₁
80Q52	HCM A.C. × 2327 HCM A.C. × 2327	F ₁
80Q53	HCM A.C. × 南特斯 HCM A.C. × Nantes	F ₁
80Q54	HCM A.C. × Beta III HCM A.C. × Beta III	F ₁
80Q68	早春红冠 × 两头齐 Zaochunhongguan × Liangtouqi	F ₁
90234	黑田 5 寸 Heitian 5 Cun	自交系 Inbred line

1.2 游离小孢子培养方法

胡萝卜游离小孢子培养程序参照Ferrie (2003) 的方法进行改进。选取健康植株上小孢子处于单核靠边期花序, 清洗, 在超净工作台上用 75%乙醇消毒 30 s, 10%次氯酸钠消毒 15 min, 无菌水冲洗 3 次, 每次 1 min。将无菌花序放入研钵, 加入少量B5 提取液, 用研棒轻轻挤压, 使小孢子游离到提取液中, 经 300 目尼龙网过滤至 10 mL离心管, $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 4 min, 弃上清液, 加入B5 提取液悬浮小孢子。上述提取洗涤过程重复 2 次后, 加入NLN液体培养基(含 $0.1\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $0.1\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, 13%蔗糖, pH 5.8)悬浮小孢子。调整小孢子密度为 $1.5 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^5$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 每培养皿(60 mm \times 15 mm)加 3 mL悬浮液, 100 μL 1%活性炭。33 $^{\circ}\text{C}$ 热激处理 2 d, 25 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养。培养后每隔 10 d观察统计各试材产生胚状体或愈伤组织皿数、胚状体数以及愈伤组织数, 以培养 200 d后的累计总数分别计算胚状体和愈伤组织产率。因胡萝卜花蕾较小, 培养时花蕾数量较多, 故以平均每皿产生胚状体数或愈伤组织数计算其产率。

1.3 小孢子发育过程观察及再生植株倍性鉴定

在小孢子培养期间, 每隔 7 d 在显微镜下进行观察、照相, 记录小孢子在培养皿中的状态及发育过程。当观察到小孢子开始分裂时, 吸取少量小孢子培养液置于玻片上, 采用 DAPI 染色, 在 ZEISS Axio 40 荧光显微镜下观察、照相。

再生植株倍性的鉴定在北京市农林科学院蔬菜研究中心进行。参照刘凡等(2007)的方法, 选取再生植株嫩叶 2 cm^2 左右, 以正常栽培胡萝卜二倍体为对照, 通过流式细胞仪测定和倍性分析软件(ModFit)确定样品DNA含量, 从而确定再生植株的倍性。

2 结果与分析

2.1 基因型对胚状体和愈伤组织形成的影响

在参试的 11 份材料中, 有 5 份材料形成胚状体或愈伤组织(表 2)。70198 和 80Q54 同时诱导出胚状体和愈伤组织, 90234 仅产生胚状体, 70Q78 和 80Q52 仅产生愈伤组织。70198、80Q54 和 90234 诱导胚状体数分别为 95、56 和 27 个, 胚状体产率分别为每皿 10.56、7.00 和 6.75 个。70198、

表 2 不同基因型胡萝卜产生胚状体和愈伤组织诱导率及培养时间

Table 2 The frequency and days of embryoids and calli inducing from different carrot genotypes

材料 编号 Code	培养皿数 Number of petri dish cultured	形成胚状体或 愈伤组织皿数 Number of petri dish with embryoids or calli	胚状体数 Number of embryoids	胚状体产率 Production of embryoids	胚状体诱 导天数/d Days of forming embryoids	愈伤组织数 Number of calli	愈伤组织产率 Production of calli	愈伤组织 诱导天数/d Days of forming calli
70198	70	9	95	10.56	109	32	3.56	109
70Q78	46	1	0	0	0	3	3.00	177
80Q48	9	0	0	0	0	0	0	0
80Q49	31	0	0	0	0	0	0	0
80Q50	35	0	0	0	0	0	0	0
80Q51	15	0	0	0	0	0	0	0
80Q52	35	1	0	0	0	1	1.00	182
80Q53	31	0	0	0	0	0	0	0
80Q54	41	8	56	7.00	92	67	8.38	92
80Q68	4	0	0	0	0	0	0	0
90234	24	4	27	6.75	95	0	0	0

70Q78、80Q52 和 80Q54 诱导愈伤组织数分别为 32、3、1 和 67 个，愈伤组织产率分别为每皿 3.56、3.00、1.00 和 8.38 个。胚状体和愈伤组织诱导所需时间较长，不同基因型形成肉眼可见胚状体或愈伤组织均在 92 d 以上，其中 80Q52 在培养 182 d 后才有愈伤组织形成。

2.2 胚状体形成过程观察

胡萝卜游离小孢子发育过程存在两种不同途径，分别是胚状体途径和愈伤组织途径。胡萝卜小孢子初期为肾形，细胞壁较厚，大小 15 ~ 25 μm (图 1, A)，培养过程中小孢子膨大延长，细胞壁变薄，长度可达原来的 1.5 ~ 4 倍，几乎找不到萌发孔的痕迹，有明显大液泡 (图 1, A)。细胞核

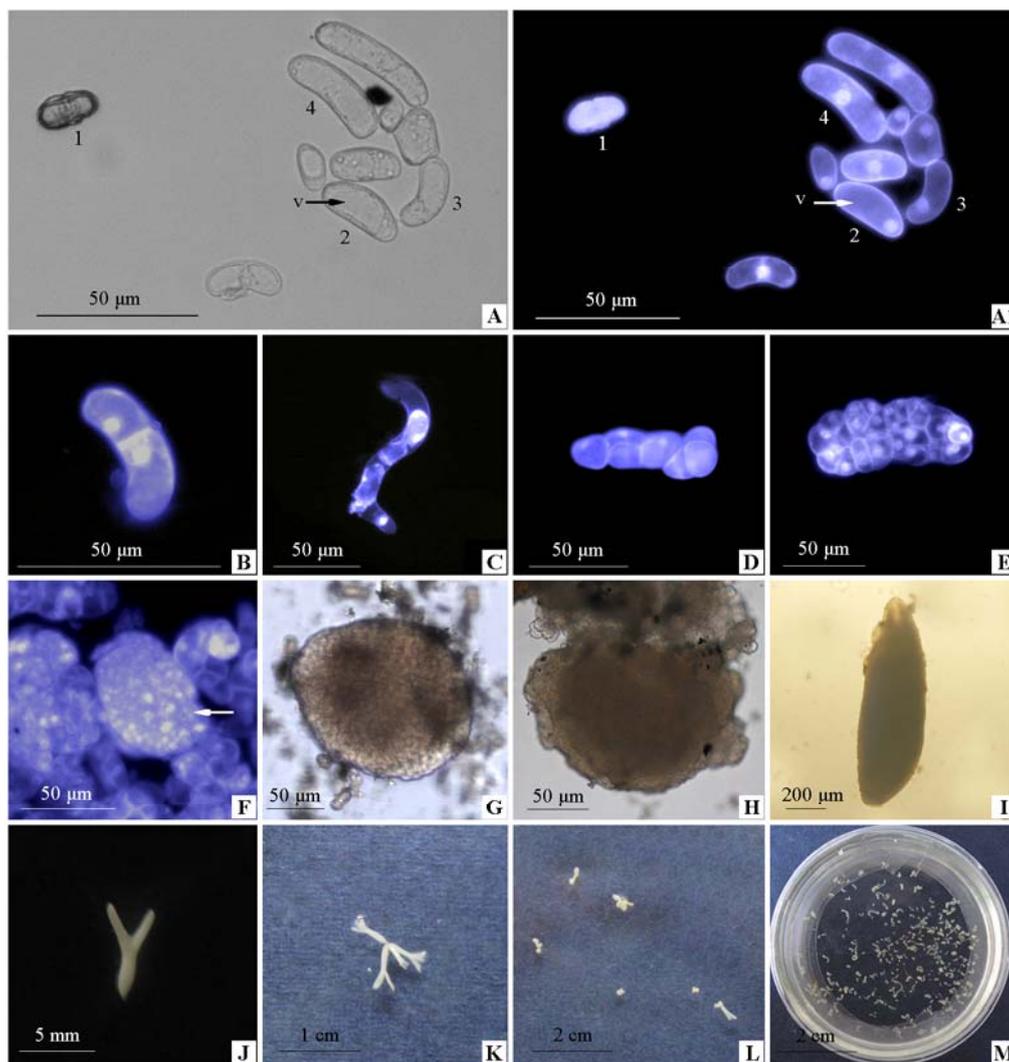


图 1 胚状体形成过程

A 和 A1. 小孢子膨大 (1: 未萌动小孢子; 2: 单核处于一端的膨大小孢子; 3: 核开始向小孢子中央移动; 4: 核位于小孢子中央; v: 液泡); B. 第 1 次细胞纵向分裂; C. 细胞多次分裂后成串排列; D. 细胞极性分化; E. 多细胞团; F、G. 球形胚; H. 心形胚; I. 鱼雷形胚; J. 子叶胚; K. 连体胚; L. 各种形状胚状体; M. 培养皿中形成大量胚状体。

Fig. 1 The development of embryoids in carrot microspore culture

A, A1. Initiation of microspores expanding (1: Normal microspore; 2: Nuclear lying on the side of swelled microspore; 3: Nuclear moving to the center of microspore; 4: Nuclear locating at the center of microspore; v: Vacuole); B. The first division of microspore; C. Cells arranging in series; D. Differentiation of cell; E. Multicellular mass; F, G. Globular embryo; H. Heart shape embryo; I. Torpedo shape embryo; J. Embryo at cotyledonary stage; K. Polyembryo; L. Embryos with various shapes; M. Lots of embryos in petri dish.

先位于小孢子一端, 然后逐渐向中央移动, 并开始进行细胞分裂 (图 1, A1), 首先纵向分裂 2~3 次, 形成一串细胞, 紧密排列在一起 (图 1, B、C), 再经横向和纵向多次分裂后, 形成长形多细胞团 (图 1, D、E), 进一步发育成球形胚 (图 1, F、G), 心形胚 (图 1, H), 鱼雷形胚 (图 1, I), 子叶胚 (图 1, J), 最后形成大量胚状体 (图 1, M)。在培养过程中, 也出现连体胚, 簇生胚以及畸形胚等 (图 1, K、L)。

2.3 愈伤组织形成过程观察

与胚状体发生相比, 形成愈伤组织的小孢子呈现不同的特征, 肾形小孢子膨大成球形 (图 2, A、

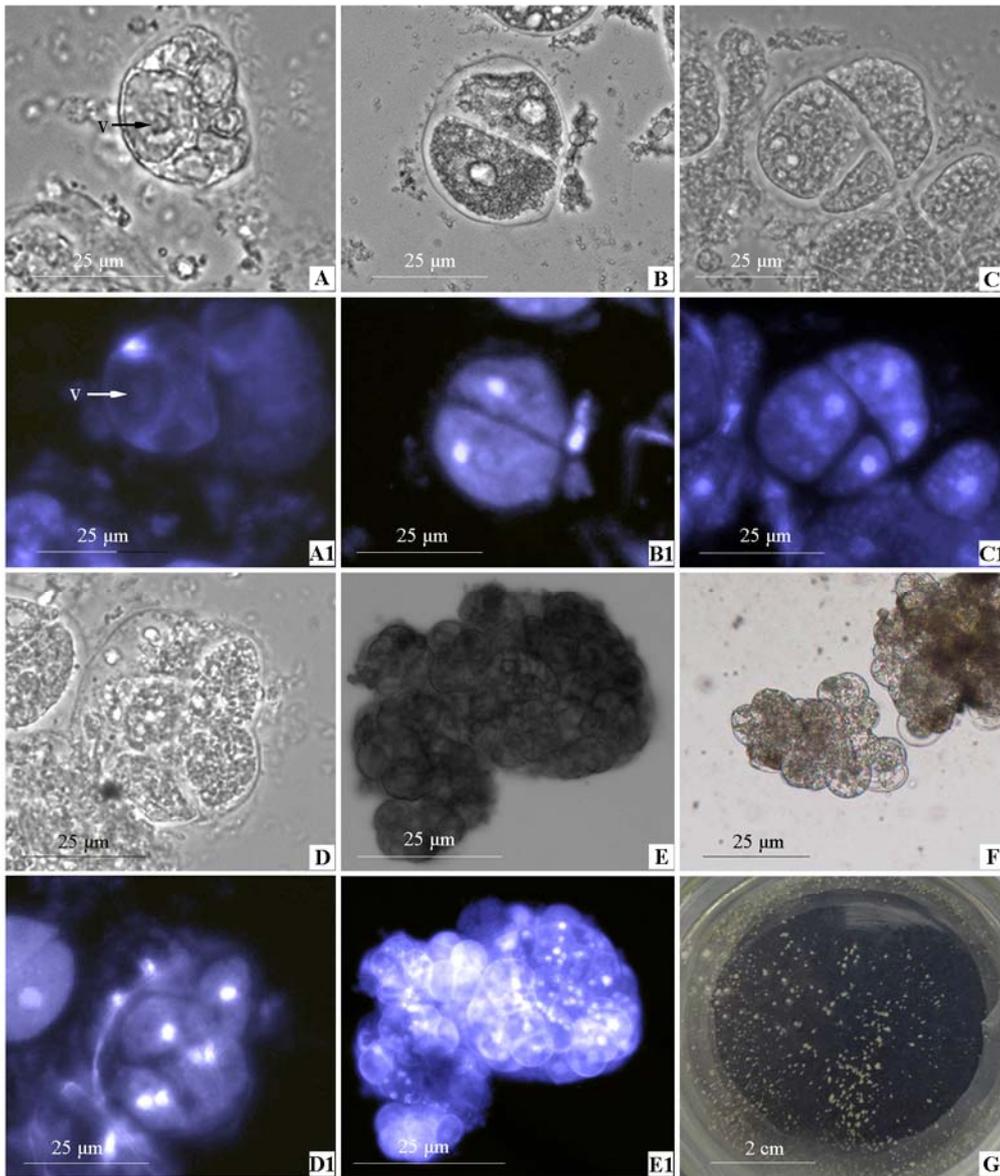


图 2 愈伤组织形成过程

A 和 A1. 初期膨大小孢子, v: 液泡; B 和 B1. 膨大小孢子进行首次横向均等分裂, 2 细胞; C 和 C1. 小孢子进行第 2 次分裂, 4 细胞; D 和 D1. 小孢子进行第 3 次分裂, 8 细胞; E 和 E1. 多细胞团; F. 愈伤组织; G. 培养皿中形成大量愈伤组织。

Fig. 2 The development of calli in carrot microspore culture

A, A1. Swelled microspore; v: Vacuole; B, B1. The first symmetric division of microspore, 2 cells; C, C1. The second symmetric division of microspore, 4 cells; D, D1. The third division of microspore, 8 cells; E, E1. Multicellular mass; F. Calli; G. Lots of callus in petri dish.

A1), 含有大液泡, 细胞质浓密, 细胞器活跃。膨大小孢子首次分裂为均等横向分裂, 形成 2 细胞, 有明显的细胞板和液泡 (图 2, B、B1), 2 细胞继续进行分裂形成 4 细胞 (图 2, C、C1), 8 细胞 (图 2, D; D1) 以及多细胞团 (图 2, E、E1), 逐渐形成肉眼可见愈伤组织 (图 2, F、G), 这些愈伤组织的细胞之间松散而无序的连接在一起。

2.4 再生植株倍性鉴定

对 3 个基因型 70198、70Q78 和 80Q54 产生的 137 株再生植株倍性进行鉴定, 单倍体、二倍体及三倍体的比例分别是 68.6%、29.9%和 1.5%; 不同基因型之间再生植株倍性比例不同, 70198 单倍体比例高达 81.4%, 而 80Q54 只有 33.3%; 在 70198 和 80Q54 中分别检测到 1 株三倍体 (表 3)。

表 3 不同基因型胡萝卜游离小孢子培养获得再生植株倍性鉴定
Table 3 Ploidy analysis of plants regenerated from IMC of three carrot accessions

材料编号 Code	再生植株 Number of plants	单倍体 Haploid plant		二倍体 Diploid plant		三倍体 Triploid plant	
		株数 Number	比例/% Ratio	株数 Number	比例/% Ratio	株数 Number	比例/% Ratio
70198	97	79	81.4	17	17.5	1	1.0
70Q78	7	4	57.1	3	42.9	-	-
80Q54	33	11	33.3	21	63.6	1	3.0
总计 Total	137	94	68.6	41	29.9	2	1.5

3 讨论

目前有关胡萝卜游离小孢子培养的文献报道较少, 仅从个别基因型中诱导出胚状体或愈伤组织 (Matsubara et al., 1995; Ferrie et al., 2010; Górecka et al., 2010)。

本研究中通过改善胡萝卜小孢子提取方法, 从 5 份基因型材料中诱导产生胚状体或愈伤组织。对 70198、70Q78 和 80Q54 的 137 株再生植株进行倍性鉴定, 68.6%为单倍体植株, 29.9%为二倍体植株 (表 3)。本试验诱导形成胚状体和愈伤组织的时间较长, 最短的 80Q54 培养 92 d 后才有肉眼可见愈伤组织和胚状体, 80Q52 在 182 d 后仍有新的愈伤组织形成 (表 2), 这与本课题组之前胡萝卜花药培养 60 d 后才产生小孢子愈伤组织或胚状体的结果 (庄飞云 等, 2010) 较为相似。Górecka 等 (2010) 观察到胡萝卜游离小孢子在培养后 14 d 才出现第 1 次分裂。结球甘蓝游离小孢子在培养 3 d 后就可见到小孢子第 1 次分裂, 13 d 肉眼可见胚状体 (方淑桂 等, 2006), 紫菜藁小孢子的首次分裂发生在热激诱导后 2~3 d (Wang et al., 2009)。胡萝卜孢子体发育启动时间较长, 这可能是阻碍胡萝卜游离小孢子培养技术发展的关键。通过离体或活体条件下的胁迫处理可以促进培养中的小孢子或未成熟花粉粒由配子体发育途径转变为孢子体发育途径 (Zorinants et al., 2005)。除热激处理外, 目前普遍采用的胁迫处理有: 饥饿、低温、秋水仙碱等。李光威等 (2001) 认为饥饿处理对小麦游离小孢子胚胎诱导有促进作用, Gu 等 (2004) 试验表明 4 °C 低温预处理 2~4 d 可明显增强低诱导率甘蓝型油菜小孢子的胚胎发生能力, 但何种胁迫方式更有利于启动胡萝卜孢子体发育还有待进一步研究。

对胡萝卜小孢子产生胚状体和愈伤组织的形成过程进行细胞学观察, 发现两者存在完全不同的结构特征。Zorinants 等 (2005) 认为胚性小孢子的形成过程包括小孢子膨大、短暂的细胞周期停滞、与 DNA 复制或有关信息的表达、小孢子核移向中央等, 与本试验观察现象类似。首先胡萝卜小孢子膨大延长至原来大小 1.5~4.0 倍, 细胞核位于小孢子一端, 随着小孢子发育, 逐渐移向

中央(图 1, A、A1)。在胚状体形成初期, 细胞即按一定规则进行排列, 细胞之间连接紧密, 而愈伤组织只是松散地连接在一起, 可以明显区分单个细胞。在玉米游离小孢子培养中也出现相似的结构, 分为类胚状体结构和类愈伤结构(Goralski et al., 1999; Matthys-Rochon, 2002), 类胚状体结构形状规则, 细胞质浓密, 而类愈伤组织结构形状不规则且有大量空泡状细胞(Massonneau et al., 2005)。胚状体发生和愈伤组织发生是单倍体培养获得再生植株的两种途径, 但胚状体能直接形成再生植株, 而愈伤组织需要经过进一步分化诱导才能形成再生植株, 这两种发生途径与基因型存在密切关系(表 2)。相关发生机制还需进一步研究。

References

- Adamus A, Michalik B. 2003. Anther cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Folia Hort*, 15 (2): 49 - 58.
- Aionesei T, Touraev A, Heberle-Bors E. 2005. Pathways to microspore embryogenesis // Palmer C E, Keller W A, Kasha K J. Haploids in crop improvement(II). *Biotechnology in agriculture and forestry* 56. Germany: Springer-verlag Berlin Heidelberg: 11 - 32.
- Dunwell J M. 2010. Haploids in flowering plants: Origins and exploitation. *Plant Biotechnol Journal*, (8): 377 - 424.
- Fang Shu-gui, Chen Wen-hui, Zeng Xiao-ling, Zhu Chao-hui, Liao Xiao-zhen, Zheng Xue-li. 2006. Isolated-microspore culture and plantlet regeneration in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.). *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (1): 158 - 160. (in Chinese)
- 方淑桂, 陈文辉, 曾小玲, 朱朝辉, 廖晓珍, 郑学立. 2006. 结球甘蓝游离小孢子培养及植株再生. *园艺学报*, 33 (1): 158 - 160.
- Ferrie A M R. 2003. Microspore culture of *Brassica* species // Maluszynski M, Kasha K J, Forster B P, Szarejko. *Doubled haploid production in crop plants*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 205 - 215.
- Ferrie A M R, Bethune T D, Mykityshyn M. 2010. Microspore embryogenesis in Apiaceae. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 104 (3): 399 - 406.
- Ferrie A M R, Caswell K L. 2010. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 104 (3): 301 - 309.
- Górecka K, Kowalska U, Krzyzanowska D, Kiszczak W. 2010. Obtaining carrot (*Daucus carota* L.) plants in isolated microspore cultures. *J Appl Genet*, 51 (2): 141 - 147.
- Górecka K, Krzyzanowska D, Górecki R. 2005. The influence of several factors on the efficiency of androgenesis in carrot. *J Appl Genet*, 46 (3): 265 - 269.
- Górecka K, Krzyzanowska D, Kiszczak W. 2009. Plant regeneration from carrot (*Daucus carota* L.) anther culture derived embryos. *Acta Physiol Plant*, 31 (6): 1139 - 1145.
- Goralski G, Matthys-Rochon E, Vergne P, Przywara L. 1999. Androgenetic development: A fascinating embryo formation process. *Acta Biologica Cracoviensia*, 41: 51 - 65.
- Gu H H, Hagberg P, Zhou W J. 2004. Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Growth Regulation*, 42 (2): 137 - 143.
- Kowalska U, Rybaczek D, Krzyzanowska D, Kiszczak W, Górecka K. 2008. Cytological assessment of carrot plants obtained in anther culture. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 50: 7 - 11.
- Li Guang-wei, Lan Su-que, Sun Bao-qi. 2001. Study on isolated microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 16 (1): 83 - 87. (in Chinese)
- 李光威, 兰素缺, 孙宝启. 2001. 小麦游离小孢子培养的研究. *华北农学报*, 16 (1): 83 - 87.
- Lian Yong, Liu Fu-zhong, Chen Yu-hui, Song Yan, Zhang Song-lin. 2004. Plant regeneration by isolated microspore culture of somatic hybrid of eggplant. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (2): 233 - 235. (in Chinese)
- 连勇, 刘富中, 陈钰辉, 宋燕, 张松林. 2004. 茄子体细胞杂种游离小孢子培养获得再生植株. *园艺学报*, 31 (2): 233 - 235.
- Liu Fan, Zhao Hong, Chen Bin, Zhang Yue-yun. 2007. Embryogenesis of microspore derived multicells in *Capsicum annuum* L. *Journal of Molecular Cell Biology*, 40 (6): 371 - 379. (in Chinese)
- 刘凡, 赵泓, 陈斌, 张月云. 2007. 辣椒游离小孢子细胞团培养的胚状体形成. *分子细胞生物学报*, 40 (6): 371 - 379.
- Maluszynski M, Kasha K J, Forster B P, Szarejko I. 2003. *Doubled haploid production in crop plants*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers:

309 - 335.

- Massonneau A, Coronado M J, Audran A, Bagniewska A, Mol R, Testillano P S, Goralski G, Dumas C, Risueno M C, Matthys-Rochon E. 2005. Multicellular structures developing during maize microspore culture express endosperm and embryo-specific genes and show different embryogenic potentialities. *European Journal of Cell Biology*, 84: 663 - 675.
- Matsubara S, Dohya N, Murakami K. 1995. Callus formation and regeneration of adventitious embryos from carrot fennel and mitsuba microspores by anther and isolated microspore cultures. *Acta Horticulturae*, 392: 129 - 137.
- Matthys-Rochon E. 2002. Fascinating questions raised by the embryogenic development in plants. *Biologia*, 57: 1 - 4.
- Tyukavin G B, Shmykova N A, Monakhova M A. 1999. Cytological study of embryogenesis in cultured carrot anthers. *Russian Journal Plant Physiology*, 46: 876 - 884.
- Wang Tao-tao, Li Han-xia, Zhang Jun-hong, Ouyang Bo, Lu Yong-en, Ye Zhi-biao. 2009. Initiation and development of microspore embryogenesis in recalcitrant purple flowering stalk (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *purpurea* Hort.) genotypes. *Scientia Horticulturae*, 121: 419 - 424.
- Zhuang Fei-yun, Pei Hong-xia, Ou Cheng-gang, Hu Hong, Zhao Zhi-wei, Li Jin-rong. 2010. Induction of microspores derived embryos and calli from anther culture in carrot. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (10): 1613 - 1620. (in Chinese)
- 庄飞云, 裴红霞, 欧承刚, 胡 鸿, 赵志伟, 李金荣. 2010. 胡萝卜小孢子胚状体和愈伤组织诱导. *园艺学报*, 37 (10): 1613 - 1620.
- Zoriniant S, Tashpulatov A S, Heberle-Bors E, Touraev A. 2005. The role of stress in the induction of haploid microspore embryogenesis // Palmer C E, Keller W A, Kasha K J. *Haploids in crop improvement (II)*, biotechnology in agriculture and forestry 56. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 35 - 52.

征 订

欢迎订阅 2012 年《中国生态农业学报》

《中国生态农业学报》由中国科学院遗传与发育生物学研究所和中国生态经济学会主办,中国科学院主管,科学出版社出版。系中国期刊方阵双效期刊、中国科技核心期刊、中文核心期刊、RCCSE 中国权威学术期刊,为中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊文摘、中国科学引文数据库、中国科技论文与引文数据库、CNKI 中国期刊全文数据库源刊,并被国际农业生物学文摘(CABI)、美国化学文摘(CA)、哥白尼索引(IC)、美国乌利希国际期刊指南等国际数据库及检索单位收录。

荣获第三届、四届全国农业优秀期刊一等奖和首届北方优秀期刊奖,被评为 2009 年中国北方优秀期刊,连续多届获得河北省优秀期刊奖。

《中国生态农业学报》主要报道全球环境变化与农业、农业生态系统与生态农业理论基础、农田生态系统与农业资源、生态农业模式和技术体系、农业生态经济学、农业环境质量及环境保护、农业有害生物的综合防治等领域创新性研究成果。

适于从事农业生态学、生态学、生态经济学以及环境保护等领域科技人员、高等院校有关专业师生、农业及环境管理工作者和基层从事生态农业建设的技术人员阅读与投稿。

《中国生态农业学报》国内外公开发行,国内刊号 CN13-1315/S,国际刊号 ISSN1671-3990。月刊,国际标准大 16 开本,128 页,每期定价 35 元,全年 420 元。邮发代号: 82-973,全国各地邮局均可订阅。漏订者可直接汇款至编辑部补订(需另加邮资 50.00 元)。

地址: (050022) 河北省石家庄市槐中路 286 号 中科院遗传发育所农业资源中心 《中国生态农业学报》编辑部。

电话: (0311) 85818007; 传真: (0311) 85815093。

网址: <http://www.ecoagri.ac.cn>; E-mail: editor@sjziam.ac.cn。