

# 黄瓜游离小孢子培养诱导成胚和植株再生

詹 艳, 陈劲枫\*, Ahmed Abbas Malik

(南京农业大学园艺学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

**摘 要:** 以 10 个不同基因型黄瓜为试材进行游离小孢子培养, 通过对成胚条件的系统研究, 从 '7447' 和 'Poinsett97' 中获得了子叶形胚和再生植株。研究结果表明: 基因型和小孢子发育时期是限制黄瓜游离小孢子成胚的关键因子。不同品种间胚状体产量差异显著, 每皿产胚 1.5 ~ 33.4 个。单核靠边期是进行黄瓜游离小孢子培养的最佳时期。低温预处理有利于胚状体的诱导, 4℃ 预处理 2~4 d 为宜, 以处理 2 d 的胚状体产量最高。外源激素在诱导胚状体时并非必需, 但低浓度外源激素 ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2, 4-D、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA) 能促进小孢子成胚。NLN 和 B<sub>5</sub> 两种基础培养基在诱导胚状体上无显著差异。子叶形胚易分化成苗, 而其它类型的胚状体未能获得再生植株。

**关键词:** 黄瓜; 小孢子培养; 胚状体; 植株再生

**中图分类号:** S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 02-0221-06

## Embryoid Induction and Plant Regeneration of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Through Microspore Culture

ZHAN Yan, CHEN Jin-feng\*, and Ahmed Abbas Malik

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Isolated microspore culture in cucumber was studied by using 10 different varieties of cucumber. Cotyledonary embryoids and plantlets were obtained from '7447' and 'Poinsett97' genotypes for the first time. The results showed that genotype and the developmental stage of microspore were the key factors in embryoid induction. The embryoid yield was different significantly among different genotypes. Embryoid yield per culture dish varied from 1.5 - 33.4. The late-uninucleate stage of microspore was found optimum for isolated microspore culture in cucumber. Cold-pre-treatment (4℃) for 2 - 4 days also promoted embryoid induction, while the highest embryoid yield was obtained from microspore pre-treated at 4℃ for 2 days. The results also indicated that low concentration of exogenous hormones ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2, 4-D and  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA) were conducive to embryogenesis, whereas NLN and B<sub>5</sub> medium had no significant difference on embryoid induction. The regenerated plantlets were obtained only from cotyledonary embryoids and no plantlet was produced from the embryoids at other developmental stages.

**Key words:** cucumber; microspore culture; embryoid; plant regeneration

利用花药培养和游离小孢子培养可快速获得纯系和突变体, 缩短育种年限, 提高育种效率。但迄今为止仅见两例黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 花药培养成功的报道 (Kumar et al, 2003; Song et al, 2007), 国内外尚无有关黄瓜游离小孢子培养成功的报道。本试验中首次通过黄瓜游离小孢子培养获

收稿日期: 2008 - 10 - 15; 修回日期: 2008 - 12 - 15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671419, 30700541); 国家高技术研究发展计划专项 (2006AA100108, 2006AA10Z108, 2008AA10Z150); 教育部 '111' 计划项目 (B08025); 国家支撑计划项目 (2006BAD13B06, 2006BAD01A7-5-11); 江苏省高新技术项目 (BG2007301)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jfchen@njau.edu.cn)

得了胚状体及再生植株,较详细地研究了小孢子离体发育过程以及基因型、小孢子发育时期、预处理和培养基等因素对黄瓜游离小孢子培养的影响,为进一步建立和完善黄瓜小孢子培养体系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以 10 份不同基因型黄瓜材料作为游离小孢子培养的供体。其中‘长春密刺’购于新疆农业科学院园艺研究所,经本实验室多代自交保存;‘北京截头’由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供;‘7011A’和‘Poinset97’由美国威斯康辛大学园艺系提供;‘康德’购于荷兰瑞克斯旺种子;‘津优 31’购于天津科润黄瓜研究所;‘7447’、‘6520’、‘6529’和‘宁佳 3 号’是本实验室配制的杂交品种。2006 年秋和 2007 年春将试材种植于南京农业大学园艺圃的塑料大棚中,常规管理。

### 1.2 小孢子分离和培养

于盛花期从健壮植株上取小孢子处于单核靠边期的花蕾。接种前将花蕾在 4℃ 下预处理 2 d。参照 Sato 等 (1989) 的方法 (稍作改动) 分离、纯化小孢子。将预处理后的花蕾用 70% 酒精消毒 30 s, 然后用 0.1% 升汞消毒 8 min, 最后用无菌水冲洗 3 次, 每次 30~60 s。在无菌条件下将花蕾置于 10 mL 离心管中, 加入适量提取液  $B_5-13$  ( $B_5 + 13\%$  蔗糖), 用玻璃棒挤压花蕾使小孢子释放出来, 再用 200 目细胞筛过滤。滤液经  $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 3 min, 弃上清液。重复离心 3 次至上清液无色透明, 弃上清液, 沉淀即为纯化的小孢子。最后用液体培养基 (表 4) 悬浮小孢子, 并用血球计数板计数, 调整小孢子密度约为  $1.0 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。于超净台上用直径 60 mm 的培养皿分装小孢子悬浮液, 每皿 2 mL, 用 Parafilm 封口膜封口后, 在 25℃ 下进行静止暗培养, 至产生肉眼可见的胚状体。之后进行  $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡暗培养, 至形成子叶形胚。培养 30 d 后, 将子叶形胚及部分球形胚转移至胚状体萌发培养基 MS-BA ( $MS + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 3\%$  蔗糖 + 0.8% 琼脂) 上, 25℃ 光照 16 h 培养。而另一部分球形胚继续在诱导培养基中进行振荡暗培养。

### 1.3 各因素对小孢子培养的影响试验

基因型试验: 以上述 10 份材料为试材, 在胚状体诱导培养基 [ $NLN + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2, 4\text{-D} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 13\%$  蔗糖 (表 4, B 培养基)] 上培养。

小孢子发育时期试验: 以‘长春密刺’、‘Poinset97’和‘康德’3 份材料为试材, 分别取单核早期和单核靠边期的小孢子在胚状体诱导培养基 (表 4, B 培养基) 上培养。

温度试验: 以‘7447’、‘长春密刺’、‘Poinset97’和‘康德’为试材, 在胚状体诱导培养基 (表 4, B 培养基) 上培养。低温预处理: 将花蕾在 4℃ 下分别预处理 1、2、4 和 6 d; 高温预培养: 于接种后分别置于 33℃ 培养 1 d 和 2 d。以未进行温度处理的材料作为对照。

培养基试验: 以‘7447’、‘长春密刺’、‘Poinset97’和‘康德’为试材, 分别以 5 种不同的胚状体诱导培养基 (表 4) 进行培养。

试验中的所有器材除封口膜以外均用 121℃ 高压灭菌 20 min。每个材料每个处理接种 4 个培养皿。培养过程中, 分别于培养后 2、4、8、10 和 12 d 取少许培养物在 OLYMPUS 显微镜下观察游离小孢子的发育情况。在胚状体诱导培养基上培养 30 d 后, 统计胚状体产量 (平均每皿获得的胚状体个数, 包括处于球形、心形和子叶形等各时期的胚状体) 和子叶形胚产量 (平均每皿获得的子叶形胚个数)。在萌发培养基上培养 20 d 后, 统计植株再生率 (分化成苗的胚状体个数占接种胚状体总数的百分率)。

### 1.4 数据分析

Microsoft excel 软件处理数据, 用 SPSS 11.5 软件进行方差分析和显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 小孢子离体发育过程中的细胞学观察

显微观察发现, 刚接种的单核靠边期小孢子呈圆球形或近球形, 细胞内具有一个大液泡, 大小均匀一致 (图 1, A)。培养 2 d 后部分小孢子膨大, 细胞内大液泡消失, 内含物增多 (图 1, B)。4 d 后发现部分小孢子发生第 1 次均等分裂 (图 1, C)。2 周后肉眼可见大小不均的球形胚, 呈乳白色 (图 1, D)。培养 30 d 后, 材料 ‘7447’ 和 ‘Poinsett97’ 的球形胚进一步发育成心形胚和子叶形胚 (图 1, E、F)。之后将子叶形胚及部分球形胚和心形胚转移至萌发培养基 MSBA 上, 培养 20 d 后, 部分子叶形胚萌发形成根叶俱全的再生小植株 (图 1, G、H), 部分未能正常分化 (图 1, G), 而球形胚和心形胚则停止发育, 褐化死亡。在诱导培养基上继续培养的球形胚和心形胚停止发育, 20 d 后褐化死亡。

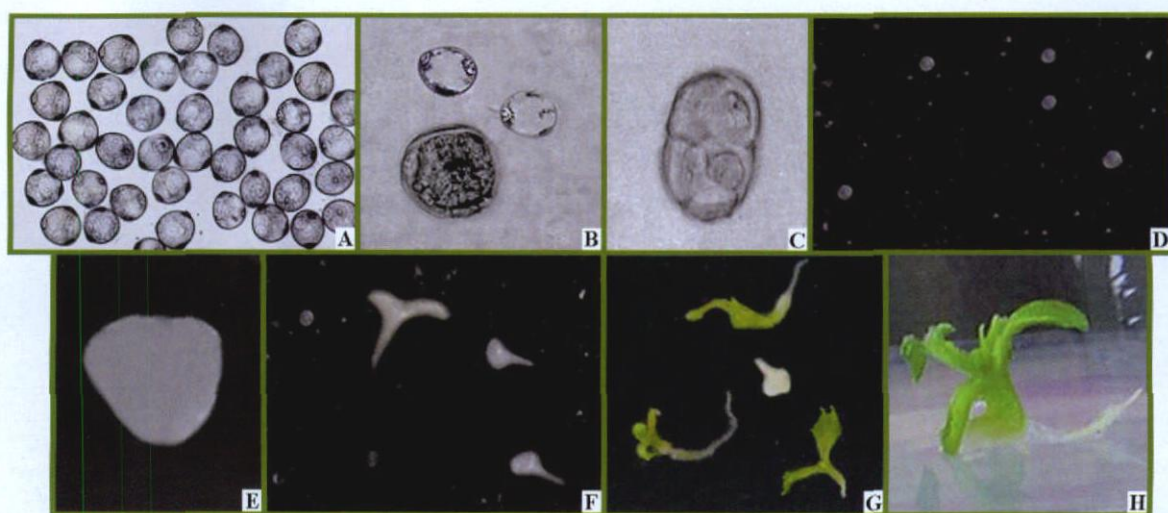


图 1 小孢子离体发育过程和植株再生

- A. 新接种的单核靠边期小孢子 (200 ×); B. 膨大的细胞 (200 ×); C. 培养 4 d 后, 细胞发生第 1 次均等分裂 (200 ×);  
D. 培养 14 d 后, 形成肉眼可见的球形胚 (20 ×); E. 培养 20 d 后形成的球形胚 (40 ×);  
F. 培养 30 d 形成子叶形胚 (20 ×); G. 子叶形胚萌发及未能正常萌发的胚状体;  
H. 根、芽、叶俱全的再生小植株。

Fig 1 Isolated microspores development in vitro and plantlets regeneration

- A. Fresh isolated late-uninucleate stage microspores (200 ×); B. An expended microspore (200 ×);  
C. The first cell division after 4 d culture (200 ×); D. Globular embryoid (20 ×); E. A heart-shaped embryoid (40 ×);  
F. Cotyledonary embryoid (20 ×); G. Embryoid germination and a cotyledonary embryoid keeping white;  
H. A complete plantlet with roots, shoots and leaves

### 2.2 基因型对胚状体诱导的影响

在 10 份供试材料中, 分别从 ‘7447’、‘长春密刺’、‘Poinsett97’ 和 ‘康德’ 中获得了胚状体 (表 1)。其中产量最高的是 ‘7447’, 为每皿 31.2 个, 最低的是 ‘康德’, 为每皿 1.5 个。‘7447’ 和 ‘Poinsett97’ 获得子叶形胚, 其他 7 份材料中有部分基因型的游离小孢子或出现膨大, 或已启动分裂, 但最终未能继续分裂形成胚状体。

### 2.3 小孢子发育时期对胚状体诱导的影响

如表 2 所示, 3 份材料均是只有单核靠边期的小孢子诱导成胚。因此单核靠边期是进行黄瓜游离小孢子培养的最佳时期。

表 1 基因型对花粉胚状体诱导（每皿胚产量）的影响

Table 1 Effect of genotype on embryoid induction (per dish)  
from isolated microspore culture

| 材料<br>Genotype      | 胚状体<br>Embryoid | 子叶形胚<br>Cotyledonary embryoid |
|---------------------|-----------------|-------------------------------|
| 7447                | 31.2a           | 3.0a                          |
| 长春密刺 Changchun Mici | 23.3b           | 0c                            |
| Poinsett97          | 5.8c            | 0.5b                          |
| 康德 Kangde           | 1.5d            | 0c                            |
| 其他 Others           | 0e              | 0c                            |

注：不同小写字母为差异达显著水平（ $P < 0.05$ ）。下同。

Note: The different small letter indicated significantly difference at 0.05 level. The same below.

表 2 小孢子发育时期对花粉胚状体诱导（每皿胚产量）的影响

Table 2 Effect of microspore developmental stage  
on embryoid induction (per dish)

| 材料<br>Genotype | 单核早期<br>Early-uninucleate |                                  | 单核靠边期<br>Late-uninucleate |                                  |
|----------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
|                | 胚状体<br>Embryoid           | 子叶形胚<br>Cotyledonary<br>embryoid | 胚状体<br>Embryoid           | 子叶形胚<br>Cotyledonary<br>embryoid |
| 长春密刺           | 0                         | 0                                | 21.7                      | 0                                |
| Changchun Mici |                           |                                  |                           |                                  |
| Poinsett97     | 0                         | 0                                | 5.0                       | 0                                |
| 康德 Kangde      | 0                         | 0                                | 1.8                       | 0                                |

2.4 温度处理对胚状体诱导的影响

试验结果显示：供试材料在 4℃低温预处理 2 d 和 4 d 时获得了胚状体（表 3），说明对花蕾进行一定的预处理是必要的。其中以 4℃低温预处理 2 d 效果最好，并且有子叶形胚形成，处理 4 d 的胚状体产量显著下降，未能诱导子叶形胚。可能短时间的处理尚未满足促使小孢子完成脱分化启动的要求，而长时间低温预处理会使小孢子因维持代谢消耗过多营养，造成活力下降或死亡，此外在进行预处理的同时小孢子仍会继续发育，经过长时间的预处理小孢子已不适宜进行培养。另外，进行高温预培养后未能获得胚状体，说明高温预培养抑制了小孢子成胚。

表 3 温度处理对胚状体诱导（每皿胚产量）的影响

Table 3 Effect of temperature treatment on embryoid induction (per dish)

| 温度 /<br>Temperature | 天数 /d<br>Days | 7447            |                                  | 长春密刺 Changchun Mici |                                  | Poinsett97      |                                  | 康德 Kangde       |                                  |
|---------------------|---------------|-----------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------|----------------------------------|
|                     |               | 胚状体<br>Embryoid | 子叶形胚<br>Cotyledonary<br>embryoid | 胚状体<br>Embryoid     | 子叶形胚<br>Cotyledonary<br>embryoid | 胚状体<br>Embryoid | 子叶形胚<br>Cotyledonary<br>embryoid | 胚状体<br>Embryoid | 子叶形胚<br>Cotyledonary<br>embryoid |
| 对照 Control          |               | 0               | 0                                | 0                   | 0                                | 0               | 0                                | 0               | 0                                |
| 4                   | 1             | 0               | 0                                | 0                   | 0                                | 0               | 0                                | 0               | 0                                |
| 4                   | 2             | 33.4a           | 2.0                              | 24.5a               | 0                                | 3.7a            | 1.5                              | 2.0a            | 0                                |
| 4                   | 4             | 21.7b           | 0                                | 11.2b               | 0                                | 0b              | 0                                | 0b              | 0                                |
| 4                   | 6             | 0               | 0                                | 0                   | 0                                | 0               | 0                                | 0               | 0                                |
| 33                  | 1             | 0               | 0                                | 0                   | 0                                | 0               | 0                                | 0               | 0                                |
| 33                  | 2             | 0               | 0                                | 0                   | 0                                | 0               | 0                                | 0               | 0                                |

注：对照，未进行温度处理。

Note: Control, anthers were cultured without temperature treatment.

2.5 培养基对胚状体诱导的影响

表 4 说明，较低浓度的外源激素可以促进胚状体诱导。‘长春密刺’、‘7447’和‘康德’在外源激素浓度较低的培养基（B 和 E）上都诱导了胚胎发生。‘长春密刺’在无外源激素的培养基（A）和浓度较高的培养基（C 和 D）上，虽有胚状体产生但产量明显降低。说明外源激素是影响小孢子胚胎发生的重要因素，但要求浓度较低。本试验最适宜的外源激素配比为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2, 4\text{-D} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ 。

从表 4 还可以看出相同基因型在 B 和 E 两种诱导培养基上的胚状体产量差异不显著。但‘7447’在培养基 B 上的子叶形胚产量显著高于在培养基 E 上的产量。可见，在黄瓜游离小孢子培养中，B<sub>5</sub>和 NLN 作为基本培养基使用时虽然诱导获得的胚状体产量差异不显著，但 NLN 更有利于球形胚进一步发育形成子叶形胚。

表 4 培养基对胚状体诱导的影响

Table 4 Effect of embryo induction medium on embryo induction

| 培养基 / (mg · L <sup>-1</sup> ) Medium |                |        |      | 7447     |                       | 长春密刺 Changchun Mici |                       | Poinset97 |                       | 康德 Kangde |                       |
|--------------------------------------|----------------|--------|------|----------|-----------------------|---------------------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 编号                                   | 培养基            | 2, 4-D | 6-BA | 胚状体      | 子叶形胚                  | 胚状体                 | 子叶形胚                  | 胚状体       | 子叶形胚                  | 胚状体       | 子叶形胚                  |
| Code                                 | Medium         |        |      | Embryoid | Cotyledonary embryoid | Embryoid            | Cotyledonary embryoid | Embryoid  | Cotyledonary embryoid | Embryoid  | Cotyledonary embryoid |
| A                                    | NLN            | 0      | 0    | 16. 4b   | 0                     | 17. 5b              | 0                     | 0b        | 0                     | 0b        | 0                     |
| B                                    | NLN            | 0. 5   | 0. 2 | 30. 8a   | 3. 3                  | 23. 3a              | 0                     | 5. 8a     | 0. 8                  | 1. 5a     | 0                     |
| C                                    | NLN            | 1. 0   | 0. 5 | 0c       | 0                     | 4. 3c               | 0                     | 0b        | 0                     | 0b        | 0                     |
| D                                    | NLN            | 2. 0   | 1. 0 | 0c       | 0                     | 0d                  | 0                     | 0b        | 0                     | 0b        | 0                     |
| E                                    | B <sub>5</sub> | 0. 5   | 0. 2 | 30. 0a   | 0. 8                  | 20. 8a              | 0                     | 6. 0a     | 0                     | 1. 8a     | 0                     |

注：所有的培养基均使用 0. 22 μm 微孔滤膜过滤灭菌，蔗糖 13%，pH 5. 8。其他 6 份试材均未获得胚状体。

Note: All the media were filter sterilized using 0. 22 μm pore size filter, the concentration of sucrose was 13% and pH 5. 8. No embryo was obtained from the rest of materials tested

2. 6 胚状体萌发和植株再生

将获得的子叶形胚、部分球形胚和心形胚，转移至胚状体萌发培养基 MS-BA 上。培养 20 d 后，球形胚和心形胚褐化死亡，发育成熟的子叶形胚正常萌发形成根芽俱全的小植株（图 1，H），处于初期的子叶形胚则有很大部分未能正常分化，或未能变绿，或褐化死亡，或仅有根分化（表 5）。由此可见，子叶形胚最易成苗。因此，胚状体能否正常发育形成成熟的子叶形胚是影响成苗的关键。

表 5 胚状体萌发与植株再生

Table 5 Embryo germination and plantlet formation

| 材料<br>Genotype      | 胚状体个数 Number of embryo |      | 成苗数 Number of plantlet |      | 成苗率 / % Regenerated plantlets |       |
|---------------------|------------------------|------|------------------------|------|-------------------------------|-------|
|                     | 球形胚和心形胚                | 子叶形胚 | 球形胚和心形胚                | 子叶形胚 | 球形胚和心形胚                       | 子叶形胚  |
|                     | GEM and HEM            | CEM  | GEM and HEM            | CEM  | GEM and HEM                   | CEM   |
| 7447                | 60                     | 36   | 0                      | 11   | 0                             | 30. 7 |
| Poinset97           | 30                     | 11   | 0                      | 3    | 0                             | 25. 0 |
| 长春密刺 Changchun Mici | 60                     | 0    | 0                      | 0    | 0                             | 0     |
| 康德 Kangde           | 20                     | 0    | 0                      | 0    | 0                             | 0     |

GEM: Globular embryo; HEM: Heart-shaped embryo; CEM: Cotyledonary embryo

3 讨论

黄瓜基因型、小孢子发育时期、预处理和培养基成分是影响游离小孢子培养胚状体诱导和植株再生的重要因素。

供试的 10 份不同基因型材料中仅 3 份启动雄核发育，之后细胞继续分裂获得了球形胚，另外 7 份材料有的部分细胞膨大但未能启动分裂，有的虽然有少数细胞发生分裂，但未能继续分裂成胚，且不同基因型间胚状体产量差异显著。这与人（曹鸣庆等，1993；张丽，2004；）的研究结果一致。同时，该 3 份获得胚的材料中，仅从 ‘7447’ 和 ‘Poinset97’ 获得的球形胚正常发育形成子叶形胚，且子叶形胚产量很低。显然供体基因型对黄瓜游离小孢子培养具有决定性的影响。

本研究中仅单核靠边期的小孢子诱导成胚。前人（陈军等，1995；Hu & Kasha, 1997；申书兴等，1999；卢钢和曹家树，2001；）的研究也已证实，对多数植物而言单核居中期至单核靠边期的花粉最易诱导胚胎发生。这可能是因为单核靠边期的小孢子正处于面临不同分裂方式和发育途径的敏感时期，所以容易诱导成功。而单核早期的小孢子则需要比较苛刻的条件才能启动雄核发育，因此难以诱导成胚。可见，小孢子发育时期是影响诱导成胚的又一关键因素，而单核靠边期是进行黄瓜游离小孢子培养的最佳时期。

在游离小孢子培养中已被证实采用一定的预处理可以促进或提高胚状体产量。本研究采用了 6 种

不同的预处理,发现4℃低温预处理2~4 d为宜,且以处理2 d效果最好。低温预处理可以改变小孢子的理化特性,促进雄核发育的启动。这与申书兴等(1999)和Sato等(2002)的报道一致。

基本培养基和外源激素对游离小孢子培养具有重要影响(Oleszczuk et al, 2004)。本试验采用了B<sub>5</sub>和NLN两种基本培养基,发现二者在诱导胚状体时无显著差异,但NLN更有利于球形胚正常发育形成子叶形胚。因此NLN较B<sub>5</sub>更适宜作为基本培养基。另一方面,虽然在诱导花粉胚状体时外源激素并不是必需的,但低浓度2,4-D (0.5 mg·L<sup>-1</sup>)和6-BA (0.2 mg·L<sup>-1</sup>)更利于促进小孢子成胚,但姜凤英和冯辉(2006)研究认为6-BA对羽衣甘蓝小孢子胚发生有促进作用,而2,4-D和NAA会抑制胚发生。这可能是因为不同作物对外源激素的要求不同。同时高浓度激素反而不利于胚状体诱导,这可能与较高浓度2,4-D产生毒害作用有关。

此外,本试验获得的球形胚仅少数能正常发育形成子叶形胚,而在随后的胚状体萌发阶段中,只有子叶形胚易分化成苗。因此,如何促使球形胚正常发育形成子叶形胚,是能否获得再生植株的关键,也是今后研究的重点之一。

## References

- Cao Ming-qing, Li Yan, Liu Fan. 1993. Influence of genotype and donor plant growth environment on embryogenesis from isolated microspores in Chinese cabbage (*B. rassaica campestris* ssp. *pekinensis*). *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 8 (4): 1 - 6. (in Chinese)
- 曹鸣庆, 李岩, 刘凡. 1993. 基因型和供体植株生长环境对大白菜游离小孢子胚胎发生的影响. *华北农学报*, 8 (4): 1 - 6.
- Chen Jun, Chen Zheng-hua, Liu Cheng-qing, Yao Yu-guang, Zhang Li-hua, Guan Yue-lan. 1995. Embryogenesis of isolated microspores of *B. rassaica napus* in culture. *Crop Research*, 9: 33 - 38. (in Chinese)
- 陈军, 陈正华, 刘澄清, 姚渝光, 张丽华, 关月兰. 1995. 甘蓝型油菜游离小孢子培养的胚胎发生. *作物研究*, 9: 33 - 38.
- Hu T C, Kasha K J. 1997. Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. *Plant Cell Rep*, 16: 520 - 525.
- Jiang Feng-ying, Feng Hui. 2006. Effect of the auxin and cytokinin on the frequency of embryogenesis in kale. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (3): 642 - 644. (in Chinese)
- 姜凤英, 冯辉. 2006. 植物生长调节剂对羽衣甘蓝小孢子胚发生的影响. *园艺学报*, 33 (3): 642 - 644.
- Kumar H G A, Murthy H N, Paek K Y. 2003. Embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Cucumis sativus* L. *Scientia Horticulturae*, 98: 213 - 222.
- Lu Gang, Cao Jia-shu. 2001. Study on microspore culture of the hybrids between Chinese cabbage and turnip. *Journal of Zhejiang University*, 27 (2): 161 - 164. (in Chinese)
- 卢钢, 曹家树. 2001. 白菜和芜菁杂种小孢子培养研究的初步研究. *浙江大学学报*, 27 (2): 161 - 164.
- Oleszczuk S, Sowa S, Zimny J. 2004. Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (*Triticosecale* Wittmack) cv. Boga. *Plant Cell Rep*, 22: 885 - 893.
- Sato S, Katoh N, Iwai S. 2002. Effect of low temperature pretreatment of buds or inflorescence on isolated microspore culture in *B. rassaica napus* (syn. *B. campestris*). *Breeding Science*, (52): 23 - 26.
- Sato T, Nishio T, Himi M. 1989. Plant regeneration from isolated microspore of Chinese cabbage (*B. rassaica campestris* ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep*, 8: 486 - 488.
- Shen Shu-xing, Zhao Qian-cheng, Liu Shi-xiong, Zhang Cheng-he, Li Zhen-qiu, Wang Yan-hua, Ren Qing, Wang Mei, Shang Ai-qin. 1999. Plant regeneration from isolated microspore culture of autotetraploid Chinese cabbage [*B. rassaica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Oleson]. *Acta Horticulturae Sinica*, 26 (4): 232 - 237. (in Chinese)
- 申书兴, 赵前程, 刘世雄, 张成合, 李振秋, 王彦华, 任清, 王梅, 尚爱芹. 1999. 四倍体大白菜小孢子植株的获得与倍性鉴定. *园艺学报*, 26 (4): 232 - 237.
- Song H, Lou Q F, Luo X D. 2007. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 90: 245 - 254.
- Zhang Li. 2004. Primary studies on the isolated microspore culture in radish (*Raphanus sativus* L.). *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (5): 676 - 678. (in Chinese)
- 张丽. 2004. 萝卜游离小孢子培养技术初探. *园艺学报*, 31 (5): 676 - 678.