

籼稻与几个广亲和品种杂交 F₁ 的花药培养效果

张再君^{1,2} 梁承邨^{1*}

(1. 中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650; 2. 湖北农学院, 湖北 荆州 434103)

摘要: 对籼稻品种秋光与几个广亲和品种及对照品种秋光的杂种 F₁ 进行花药培养, 并对其中的一个组合所产生的白化苗做了 PCR 分析。结果表明: (1) 秋光是一个培养力很高的品种, 以秋光作为母本的粳/籼交组合的花药培养可以得到较高的培养力(绿苗率与愈伤组织诱导率的乘积); (2) 在供试的杂交组合中, 培养力高低的一般趋势是: 粳(籼)广亲和/籼(粳)广亲和 > 粳/广亲和 > 粳 > 粳/粳 > 粳/籼; (3) 与普通籼粳交相比, 由于广亲和品种的参与提高了杂种 F₁ 的绿苗分化率, 降低了白苗率; 出愈率、分化率及培养力与出愈速度并无直接关系, 选择适合的培养基并及时将愈伤组织转移到分化培养基上进行分化是提高花药培养的分化率和培养力的重要保证; (4) 混生(或嵌合体)白化苗的形成是在分化初期愈伤组织发生遗传变异的结果, 这种变异一经发生, 无法用再分化的方法诱导绿苗的形成。

关键词: 广亲和品种; 花药培养; 白化苗

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2002)01-0051-07

The Effects of Anther Culture of Rice in Hybrids F₁ from *Japonica* Crossed with Wide Compatibility Varieties

ZHANG Zai-jun^{1,2} LIANG Cheng-ye^{1*}

(1. The South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Hubei Agriculture College, Jinzhou 434103, China)

Abstract: Hybrids F₁ from *japonica* variety Akihikari crossed with several wide compatibility varieties, and with some *indica* varieties were used for anther culture on N₆ and SK₃ media to compare the callus induction rate, green and albino shoots, and the culture efficiency in these F₁s with those in Akihikari. The result showed that the anthers of variety Akihikari cultured on N₆ or SK₃ media had callusing rate 86.44% and 66%, green shoot rate 23.1% and 16.8%, and culture efficiency 20.0% and 11.1%, respectively, whereas anthers of hybrid F₁ from Akihikari crosses were more effective on SK₃ medium for induction and differentiation, suggesting that SK₃ was a suitable medium for anther culture of *japonica* with *indica* rices. It is concluded that *japonica* Akihikari is a variety with high efficiency in anther culture. The culture efficiency was in the order: *japonica* (*indica*) WCV × *indica* (*japonica*) WCV > *japonica* × WCV > *japonica* > *japonica* × *japonica* > *japonica* × *indica*. Callus velocity had no direct relation with callusing rate, green shoot rate, and anther culture efficiency. PCR analysis showed, albino or mixed albino shoots resulted from genetic variation at first stage of callusing.

Key words: Wide compatibility variety; Anther culture; Albino shoot

收稿日期: 2001-04-18 接受日期: 2001-12-25

基金项目: 广东省重点科技项目(990801), 中国科学院九五重大科技项目(KY951A13029); 广东省重大专项(A2010105)

* 通讯作者 Corresponding author

水稻广亲和品种的发现使亚种间杂种优势的利用成为可能,但是常规选育广亲和品种的方法是利用现有的广亲和品种的杂交转育及后代的多代选择与鉴定,不仅育种的周期长,而且多代选择必然丢失一些重组类型。应用花药培养已为水稻育种^[1-7]、遗传分析及籼粳分化^[8-15]研究建立了有效的双单倍体(DH, Double haploid)群体。花药培养是生物技术育种的主要技术措施之一,花培 DH 群体有丰富的变异类型,其在育种上的应用不存在重大障碍^[16]。关于广亲和品种杂交 F₁ 的花培的研究未见详细报道。为探讨水稻广亲和品种对籼粳交杂种花培效率的影响,建立高效选育广亲和品种的花培育种体系,我们对秋光与几个广亲和品种的杂种 F₁ 进行了花药培养,并对花粉植株的白苗现象作了 PCR (Polymerase chain reaction) 分析。

1 材料和方法

材料 籼稻品种秋光及其与广亲和品种 T984、培矮 64、轮回 422、02428、IR58、粳稻品种台中 65、籼稻品种 IR36 和南京 11 的杂种 F₁; 培矮 64 × 02428、02428 × 培矮 64、秋光 / 特青、台中 65 (粳) × 特青 (籼)。

花药培养 1999 年春季配制杂交组合,夏季播种,9 月中下旬取材料进行花药培养,以形态指标和镜检的方法相结合,取花药发育时期为单核期的穗子,置于 10±1℃ 下预处理 7-10 d; 剥取幼穗用 70% 乙醇浸泡 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 0.1% HgCl₂ 浸泡 10-15 min, 无菌水冲洗 3 次, 置于培养皿中吸干水分, 取出花药接种。脱分化阶段为暗培养, 温度为 26-28℃, 分化阶段用 2 支 40 W 的日光灯、15 cm 的距离光照 14 h。脱分化培养基为: (1): N₆ + 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 6% Sucrose + 7 g Agar; (2): SK₃ + 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 3 mg L⁻¹ NAA + 6% Sucrose + 7 g Agar。相应的分化培养基分别为: (1) N₆ + 1 mg L⁻¹ NAA + 2 mg L⁻¹ KT + 3% Sucrose + 4 g Agar + 2 g Agarose; (2) MS + 1 mg L⁻¹ NAA + 2 mg L⁻¹ KT + 1 mg L⁻¹ IAA + 3% Sucrose + 4 g Agar + 2 g Agarose。分别在接种后 60 d 统计愈伤组织总数并计算愈伤组织诱导率, 分化 40 d 统计绿苗数并计算绿苗分化率和培养力, 同时考察杂种 F₁ 的结实率。

愈伤组织诱导率 (%) = 愈伤组织数 / 接种花药数 × 100%

绿苗分化率 (%) = 分化绿苗数 / 愈伤组织数 × 100%

培养力 (%) = 愈伤组织诱导率 (%) × 绿苗分化率 (%)

白苗率 (%) = 分化白苗数 / 分化绿苗白苗总数 × 100%

白化苗与绿苗的 RAPD 分析 以 CTAB (Cetyltriethylammonium bromide 十六烷基三乙基溴化铵) 法提取 02428 × 培矮 64 组合分化的白化苗、绿苗及相应的愈伤组织的 DNA。

随机引物扩增 DNA 分析 (1) 用一经选择在水稻上无多态性的随机引物 Primer120 作为绿苗、白苗及其愈伤组织 DNA 扩增的引物; (2) PCR 反应体系: 总反应体积为 20 μl, 其中模板 DNA 20 ng, MgCl₂ 2.5 mol/L, dNTP 200 μmol/L, 随机引物 0.3 μmol/L, Taq 酶 1U 及 10× 反应缓冲液, 反应混合液混合均匀后覆盖 20 μl 矿物油, 在 PCT-100 型 PCR 仪 (MJ Research Co.) 进行 DNA 扩增; (3) 反应程序: 94℃ 5 min 一个循环; 94℃ 1 min、36℃ 1 min、72℃ 1.5 min 44 个循环, 最后一个循环为 72℃ 7 min; (4) 1.5% 琼脂糖凝胶, 100 V 电压电泳 2 h, EtBr 染胶并在 UV 光下观察分析, 拍照。

2 结果和分析

2.1 花药培养的结果

在表 1 中, 从花药培养的出愈率和绿苗分化率上看, 同一供试材料在不同的培养基上得到的培养结果不相同, 有的适合于 N₆ 培养基、有的适合于 SK₃ 培养基。籼稻品种秋光在 N₆ 和 SK₃ 培养

基上的出愈率达 86.44% 和 66%, 绿苗分化率也达 23.1% 和 16.8%, 培养力分别为 20.0% 和 11.1%, 说明秋光是一个培养力很高的粳稻品种, 但是相比而言它更适合于用 N₆ 进行花药培养; 而在秋光的杂交组合中, 除秋光/T984 相对更适合于 N₆ 外, 其他 8 个组合则更适合于 SK₃ 培养基的诱导与分化, 说明 SK₃ 确实是一个广泛适合于作粳/籼杂交组合花药培养的培养基。

表 1 秋光及其与几个广亲和品种杂交组合的花药培养结果
Table 1 The rates of callusing and green shoots in anther culture of variety Akihikari and its crosses

组合或品种 Combinations	组合类型 Cross type*	培养基 Media	接种花药数量 No. of incubated anther	出愈率 Callusing rate (%)	绿苗分化率 Green shoots rate (%)	培养力** Efficiency (%)	白苗率 Albino rate (%)	出愈速度 Days for 50% callusing	结实率 Seed setting percentage
Akihikari	J	N ₆	450	86.44	23.1	20.0	40.79	35	97.86
		SK ₃	450	66.00	16.8	11.1	48.45	35	97.86
Akihikari × T984	J/WCV	N ₆	540	50.74	43.07	21.85	42.72	28	93.78
		SK ₃	630	20.79	45.04	9.36	41.58	28	93.78
Akihikari × Pejai64	J/WCV	N ₆	360	43.06	15.48	6.67	51.02	34	61.62
		SK ₃	216	74.07	30	22.22	44.19	43	61.62
Akihikari × Lunhui422	J/WCV	N ₆	630	26.67	1.19	0.32	80.00	48	63.61
		SK ₃	180	21.67	17.95	3.89	46.15	35	63.61
Akihikari × 02428	J/WCV	N ₆	216	32.41	4.29	1.39	76.92	37	94.76
		SK ₃	288	70.14	25.25	17.71	57.14	46	94.76
Akihikari × IR58	J/WCV	N ₆	-	-	-	-	-	-	36.3
		SK ₃	360	20.28	65.75	13.33	28.36	43	36.3
Akihikari × Taizhong65	J/J	N ₆	434	72.58	4.13	3.00	69.05	33	95.17
		SK ₃	216	71.3	14.29	10.19	68.57	34	95.17
Akihikari × IR36	J/I	N ₆	360	28.61	0	0.00	100.00	45	29.5
		SK ₃	450	41.78	9.04	3.78	75.71	49	29.5
Akihikari × Nanjing 11	J/I	N ₆	720	4.17	0	0.00	100.00	42	28.74
		SK ₃	450	14.44	38.46	5.55	72.52	42	28.74
Akihikari × Teqing	J/I	N ₆	216	5.56	0	0.00	100.00	41	36.63
		SK ₃	354	14.41	7.84	1.13	82.61	52	36.63
Taizhong65 × Teqing	J/I	N ₆	216	37.5	0	0.00	100.00	36	59.5
		SK ₃	434	53.69	31.76	17.05	33.33	36	59.5
Pejai64 × 02428	WCV/WCV	N ₆	144	35.42	5.88	2.08	88.46	36	84.11
		SK ₃	288	55.21	84.91	46.87	12.90	35	84.11
02428 × Pejai64	WCV/WCV	N ₆	216	68.52	5.41	3.71	38.46	35	76.68
		SK ₃	450	96.22	63.97	61.55	8.28	44	76.68

* J: *Japonica* rice; I: *Indica* rice; WCV: Wide compatibility variety; ** Efficiency: Callus induction rate × green shoot rate

将杂交组合类型分为四类, 即粳/广亲和(J/WCV)、粳/粳(J/J)、粳/籼(J/I)和广亲和/广亲和(WCV/WCV)。在培养力方面, 总的趋势是粳(籼)广亲和/籼(粳)广亲和 > 粳/广亲和 > 粳/粳 > 粳/籼。在粳/籼杂交组合中, 典型粳/籼组合, 如秋光/IR36、秋光/南京 11、秋光/特青, 它们在 N₆ 培养基上的出愈率较低, 分化率为 0, 在 SK₃ 上虽然有一定的出愈率和分化率, 但是培养力仍然很低, 而同样属粳/籼组合的台中 65/特青, 虽然在 N₆ 上分化率和培养力为 0, 但在 SK₃ 培养基上的出愈率和分化率分别高达 53.69% 和 31.76%, 培养力为 17.05% (表 1)。将出愈率、分化率与杂种结实率结合分析, 发现台中 65/特青的结实率显著大于其他几个粳/籼杂交组合; 粳/粳组合的秋光/台中 65 也适合于在 SK₃ 培养基上诱导与分化。在广亲和/广亲和组合中的培矮 64/02428、02428/培矮 64 中, 正反交 F₁ 均适于在 SK₃ 培养基上进行花药的诱导与分化, 虽然在 N₆ 上诱导率

也很高,但分化率却很低。在 SK₃ 上培养,以 02428 为母本的培养力明显大于以培矮 64 为母本的,表明在这一杂交组合的花培中存在明显的正反效应(母性效应),也许是由于 02428 是梗稻细胞质的原因。

以出愈量达到总愈伤数量的一半时的天数表示出愈速度,可以发现秋光/T984 的出愈速度快,仅 28 d,其他组合(含秋光)出愈速度为 33-52 d。虽然有的组合在两种培养基上的出愈速度一致,如秋光、秋光/T984、台中 65/特青和培矮 64/02428,但它们在两种培养基上出愈率、分化率以致培养力都存在较大的差异;而有的组合表现为出愈快的培养力高,有的组合则表现为出愈慢的培养力高,说明出愈率、分化率及培养力与出愈速度并无直接关系。因此选择适合的培养基并适时将愈伤组织转移到分化培养基上进行分化是提高花药培养的分化率和培养力的重要保证。当然在培养后期一定时期,愈伤组织由于营养条件的变化,愈伤的质量会降低,分化率会随之下降。

2.2 白化苗 DNA 的 PCR 分析

白化苗的产生是禾本科植物花药培养的特征之一。由表 1 可见,四个籼粳交组合的秋光×IR36、秋光×南京 11、秋光×特青和台中 65×特青在 N₆ 培养基上只有白苗,而在 SK₃ 培养基上的白苗率却相对较低。与以上四个籼粳交组合相比,几个广亲和品种参与的杂交组合的花培白苗率明显低得多,而且 SK₃ 上的白苗率更低些。虽然由于广亲和品种的参与提高了籼粳杂种花培的绿苗分化率,降低了白苗率,但仍不能改变部分愈伤组织分化为白苗的分化方向。从总体上看,各类组合的白苗率的大小顺序为籼/粳 > 粳/粳 > 粳/广亲和 > 广亲和/广亲和。

白化苗、绿苗及相应的愈伤组织 DNA 的 PCR

分析结果表明(图 1),同一杂交组合的白化苗愈伤组织(图 1:1)、绿苗(图 1:4、6)及绿苗相应愈伤组织(图 1:3、5)的 PCR 的带型相同,而白化苗 DNA 的 PCR 则少一条带,还有一条带很弱(图 1:2),说明白化苗可能发生了遗传性变异。观察发现,很多在分化早期呈现绿色的愈伤组织也产生白化苗或不能分化成苗;分离白化苗基部的绿色愈伤组织再诱导,仍不能分化形成绿苗,只能分化成白化苗,或不能成苗,这说明在分化初期,愈伤组织发生了遗传性的变异,而且这种变异一经产生或形成,无法用再分化的方法诱导绿苗的形成。

3 讨论

3.1 培养材料的基因型对出愈率、绿苗分化率及培养力的影响

在影响水稻花药培养效率的诸因素中,作用最强的是接种材料的基因型,水稻不同种、亚种、品种间花药培养力有明显差异。沈锦华等^[14]报道,在栽培稻中培养力的高低顺序是糯 > 粳 > 粳/籼 > 籼/籼 > 籼。韦鹏霄等^[15]认为(未见详细数据),不同类型水稻的花药培养力大小顺序为:粳/粳杂种 > 粳稻品种 > 粳/籼杂种 > 糯稻品种 > 籼/粳杂种 > 籼/籼杂种 > 籼稻品种 > 栽/野杂种 > 野生

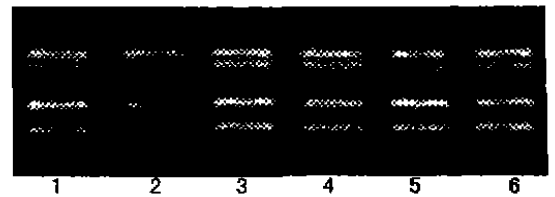


图 1 白化苗与绿苗及其愈伤组织 DNA-PCR 比较
Fig. 1 The PCR of DNA in albino and green shoots and their calli

1. 白化苗愈伤组织 Calli from albino shoots; 2. 白化苗 Albino shoots; 3. 绿苗愈伤组织 Calli from green shoots; 4. 由 3 分化的绿苗 Green shoots differentiated from 3; 5. 另一丛绿苗愈伤组织 Calli from another green shoots; 6. 由 5 分化的绿苗 Green shoots differentiated from 5.

稻;在籼型三系杂交稻花培中,组合(杂种 F_1)的培养力高于不育系;从光(温)敏核不育水稻及两系杂交稻组合的花药培养得到的培养力为:粳/粳杂种 F_1 > 粳型恢复系 > 粳型不育系 > 粳/籼杂种 F_1 > 籼/粳杂种 F_1 > 籼/籼杂种 F_1 > 籼型恢复系 > 籼型不育系。

李自超等^[10]报道,广亲和品种在组织培养适应性方面可表现籼稻和粳稻两亚种的特点。王建平等^[11]认为,广亲和品种无论在其本身直接花培中或在其杂交 F_1 中都有较好的适应性,品种的广亲和性对于提高籼粳亚种间杂种 F_1 的出愈率有明显的正效应。

本研究认为:不同杂交组合的培养力大小顺序为,粳(籼)广亲和/籼(粳)广亲和 > 粳/广亲和 > 粳 > 粳/粳 > 粳/籼,这与李自超等^[10]、王建平等^[11]的研究结果基本相似,说明由于广亲和品种的参与,使得籼粳交 F_1 的花培效率明显提高,分析其主要原因,可能是广亲和品种的参与,使 F_1 的花粉育性明显提高,籼粳杂种优势在花培上得到表现。广亲和品种的参与对于籼粳交组合出愈率有明显提高,这说明利用花药培养快速高效选育广亲和品种是可行的,同时提示广亲和品种可能在远缘杂交上起桥梁作用,这有待进一步研究。

3.2 培养基的选择

培养基是植物花药培养中影响培养力的重要因素,选用被普遍认为适合于籼粳交杂种花药培养的 N_6 和 SK_3 两种培养基的结果显示, SK_3 更适合于籼粳交杂种的花药培养,尤其适合于籼、粳广亲和品种间杂种的花药培养。在试验中,我们得到的 02428/ 培矮 64 正反交花药培养的最高出愈率、分化率分别达 96.22% 和 84.91%,培养力高达 61.55%,其他与秋光的杂交组合的最高出愈率、分化率及培养力也分别达 74.07%、65.75% 和 22.22%,这与很多文献^[12,14,15]的结果相比,是一个相对较高的培养水平,充分显示了 SK_3 培养基在籼粳交杂种花药培养上的巨大潜力。这一结果比较理想的主要原因可能是:(1)选择了合适的培养基;(2)在分化培养基中加入了少量琼脂糖;(3)选择了培养力高的基因型和与之相适应的培养基;(4)与广亲和品种参与有关;(5)可能与铁盐的配制有关。铁盐在提高花药培养的绿色苗分化率方面有重要的作用^[13],因此铁盐的配制也是培养基配制中的重要环节。据我们的经验,铁盐在冰箱中保存容易形成沉淀,但是如果在配制过程中将铁盐置于 60-80℃ 下络合 1-2 h,铁盐便可以在冰箱中长期保存,这也可能是我们得到培养力高的一个重要因素。

严菊强^[12]曾经报道,轮回 422 具有较高的培养力,而 02428 相对较低,按照一般规律,秋光/轮回 422 的培养力应该大于秋光/02428 的培养力,但我们的试验结果恰恰相反,无论是在 N_6 培养基、还是在 SK_3 培养基上,秋光/02428 的培养力都大于秋光/轮回 422 的培养力,这可能是因为 02428 是一个广亲和性较好的粳稻品种,李兴莲等(1995)也认为,02428 本身在组织培养上有较好的适应性(转自王建平等^[11])。

3.3 关于白化苗的问题

广亲和品种的参与使籼粳交组合的花培白苗率比粳粳交组合的低,这一结果与王建平等^[11]和王敬驹等^[14]的不同,这可能与培养条件和转移分化的时间有关。王敬驹等认为花药接种后最初 8 d 对高温最为敏感,随着高温下培养时间的延长,绿苗分化率大幅下降,白化苗大幅上升,据此我们认为王建平等^[11]所设定的暗培养温度(28℃)稍高,特别是在 30-50 d 之间转移分化也显迟。仔细观察发现,一些组合在接种后 14 d 左右由花药尖端吐露水珠,20 d 左右即出现愈伤。由统计出愈速度

可以看出,很多组合在 35 d 左右已经达到出愈高峰期。因此我们认为在培养过程中及时转移分化愈伤组织是花药培养过程中的一个非常重要的环节。

孙敬三等^[17,20]在研究水稻花粉白苗和绿苗的蛋白质和 RNA 带谱特征时发现,绿色叶片的蛋白质电泳有 15 条带,而白色叶片只有 13 条带,已知缺失两条带中有一条为组分 I 蛋白质,因此提出,花粉白苗的质体 DNA 很可能不健全;研究花粉绿苗和白苗植株中核糖体 RNA(rRNA)组成时发现,与绿苗植株的 rRNA 相比,白苗植株质体核糖体 23S RNA 和 16S RNA 不存在。Day^[21]研究表明,小麦花粉白苗质体 DNA 有相当大的一段易缺失区域,所检查白苗均具有各种不同程度的缺失,但它们均在易缺失区段内。一般白苗质体 DNA 分子量仅为绿苗的 1/4,质体 DNA 在总 DNA 中的比例(%)为绿苗的 1/6,拷贝数也比绿苗低得多,而绿苗未见类似的缺失,这与孙敬三等对水稻花粉白苗 RNA 和蛋白质的研究结果相吻合。试验中我们观察到,白化苗有两种不同的表现形式,即由愈伤组织直接长出的白化苗和绿白苗混生或嵌合体现象。在 02428/ 培矮 64 组合中绿白苗混生或嵌合体现象较多,通常是在分化初期,分化的愈伤组织逐步转成绿色,似乎都会分化成绿苗,但是常常有部分绿色愈伤不能分化成苗,或形成绿白苗混生或嵌合体。我们试图使嵌合体基部的绿色愈伤组织再分化出绿苗,以便既提高花培的总出愈率,又提高绿苗分化率,降低白苗率,但结果均未能成功。对这类白化苗做了 PCR 分析,结果显示同一杂交组合的白化苗愈伤组织、绿苗及其相应愈伤组织的 PCR 的带型相同,而与愈伤及绿苗 DNA 的 PCR 带型相比,白化苗 DNA 的 PCR 则少一条带,还有一条带很弱,据此推测这类白化苗是在愈伤组织分化初期遗传物质发生变异的结果,因为该 PCR 的引物 Primer120 证明在水稻中不具有多态性,进一步推测这一变异可能是白化苗的 DNA 缺失了相应的片段,使得 PCR 反应不能扩增出来。这又进一步从 PCR 这一分子生物学的方法上验证了孙敬三等和 Day 等的结果。然而由愈伤组织直接长出的白苗更为常见。资料显示^[19],培养基对愈伤组织分化绿苗或白苗的影响,主要是在诱导愈伤组织的发生阶段,受分化培养基的影响较小。本试验的混生白苗的 PCR 表明,混生白苗的变异发生在分化初期,而不在愈伤组织的发生阶段。可见两类不同的白化苗的形成原因是不同的,愈伤组织直接分化形成白苗的原因有待进一步应用分子生物学的方法做详细的研究。

参考文献:

- [1] 王家银,张志雄,向跃武,等. 综合育种技术在杂交水稻恢复系上的选育效果 [J]. 西南农业学报, 1994, 7 (2): 7-12.
- [2] 向跃武,张志雄,张安中,等. 水稻综合育种技术与川恢 802 及其系列组合的培育 [J]. 中国稻米, 1997, 12: 6-9.
- [3] 张安中,向跃武,张志雄,等. 花药培养在水稻籼梗交恢复系选育上的应用 [J]. 作物学报, 1994, 20 (6): 758-762.
- [4] 刘传雪,潘国君,张淑华,等. 寒地水稻花培优异种质龙粳 8 号的评价研究 [J]. 中国农业科学, 1999, 32 (3): 39-43.
- [5] 周开达,汗旭东. 重穗型杂交稻育种 [M]. 成都: 四川科技出版社, 1997, 1-6.
- [6] 陈深广,程式华,孙宗修,等. 野败型水稻广亲和不育系 064 A 的选育 [J]. 中国农业科学, 1997, 30 (2): 21-26.
- [7] Bong B B, Swaminathan M S. Magnitude of hybrid vigor retain in double haploid lines of some heterotic hybrids [J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 253-257.
- [8] 王建平,孙传清,李自超,等. 两套水稻 DH 群体的形态指数和同工酶的籼粳分类研究 [J]. 中国农业科学, 1998, 31 (4): 8-15.
- [9] 李平,朱立煌,周开达,等. 利用 RFLP 分析水稻双单倍体的基因型 [J]. 植物学报, 1997, 39 (2): 137-143.
- [10] 陈英,陆朝福,何平,等. 籼粳杂种双单倍体的配子选择 [J]. 遗传学报, 1997, 24 (4): 322-329.
- [11] 陈英,何平,陆朝福,等. 籼粳交加倍单倍体后代性状遗传的研究 [J]. 作物学报, 1999, 25 (4): 451-457.
- [12] 严菊强,薛庆中,王以秀,等. 花培技术在水稻亚种间杂优育种研究中的应用 [A]. 第三届全国青年作物遗传育种会议文集 [C].

- 北京: 中国农业科技出版社, 1994, 61-67.
- [13] 胡含, 陈英. 植物体细胞遗传与作物改良 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1988, 54-58.
- [14] 韦鹏霄, 岑秀芬, 陈兆贵, 等. 水稻花药培养及育种应用研究 [J]. 广西农业生物科学, 1999, 18(1): 88-94.
- [15] 王建平, 陈亮, 李自超. 水稻广亲和品种在籼粳交 F_1 花药培养中的效应 [J]. 北京农业科学, 1999, 17(5): 17-19.
- [16] 王敬驹, 孙敬三. 花粉白苗的研究 [A]. 花药培养学术讨论会文集 [C]. 北京: 科学出版社, 1978, 141-150.
- [17] 孙敬三, 吴石君, 王敬驹. 水稻白化花粉植株质体核糖体 RNA 的缺失 [A]. 花药培养学术讨论会文集 [C]. 北京: 科学出版社, 1978, 151-154.
- [18] 沈锦华, 李梅芳, 陈银金, 等. 花药培养在水稻品种改良上的应用 [J]. 中国农业科学, 1982, 15(2): 15-19.
- [19] 李自超, 唐拥军, 王象坤, 等. 水稻广亲和籼粳杂交一代的花药培养初探 [J]. 北京农业科学, 1995, 13(1): 32-34.
- [20] Sun C S, Wu S C, Wang C C, et al. The deficiency of soluble proteins and plastid ribosomal RNA in the albino pollen shoots of rice [J]. Theor Appl Genet, 1979, 55: 193-197.
- [21] Day A, Ellis T H N. Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible basis for maternal inheritance of chloroplasts [J]. Cell, 1984, 39: 359-368.