

籼稻不同品种成熟胚的组培发育特性及其超微结构的观察

田亲亲^{1,2}, 阎丽娜², 陆长梅¹, 李霞², 魏晓东², 方先文²

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)
(2. 江苏省农业科学院粮食作物研究所, 江苏省优质水稻工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

[摘要] 以 3 种籼稻成熟胚为外植体, 接种于愈伤组织诱导培养基(M8+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+2 mg/L 2,4-D+2 mg/L 6-BA+1 mg/L ABA+0.5 mg/L KT+1 mg/L NAA), 记录其愈伤的出愈率, 统计分析表明其出愈率有显著差异, 并分别取接种 9 d、15 d 时不同材料的愈伤组织观察其不同诱导天数下超微结构的变化, 并记录其愈伤过程中的褐化率. 结果显示, 3 种水稻材料在相同的诱导时间下细胞的发育阶段不同: 扬辐粳 6 号的愈伤组织细胞发育较快, 较早地进入了成熟阶段; 而恢 76 愈伤组织细胞则发育较慢, 较长时间仍然处于分生阶段; 黄华占则发育更慢. 可见, 不同籼稻出愈率和分化的高低主要与愈伤组织细胞发育速度的快慢、生理功能的强弱、以及其衰老的程度有密切关系. 而褐化, 不仅与黑色物质聚集早晚有关系, 而且与愈伤组织细胞中液泡的发育有着密切关系. 通过调高培养基中细胞分裂素类的含量, 有利于提高其出愈率.

[关键词] 籼稻, 成熟胚, 愈伤组织, 超微结构

[中图分类号] S511 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2013)01-0068-06

Comparison of Ultrastructure of Callus Induction in *Indica* Rice With Different Callus Induction Rates

Tian Qinqin^{1,2}, Yan Lina², Lu Changmei¹, Li Xia², Wei Xiaodong², Fang Xianwen²

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)
(2. Institute of Foods Crop, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Jiangsu High Quality Rice R&D Center, Nanjing 210014, China)

Abstract: Mature embryos from 3 *Indica* rice varieties as explants were implanted in the induction medium(M8+30 g/L Sucrose+10 g/L Agar+5 g/L Sorbitol+2 mg/L 2,4-D+2 mg/L 6-BA+1 mg/L ABA+0.5 mg/L KT+1 mg/L NAA) and the callus inductivities of these materials were different significantly at 0.01 level, respectively. At the same time, the callus incubated for 9 d and 15 d were observed by a transmission electron microscope, and the callus' browning rate was recorded at the same time. The results showed that the 3 rice materials developed differently at the same induction period. The callus cells from Yangfuxian 6 developed fast, while those from Hui 76 developed relatively slow, and the development of callus cells from Huanghuazhan was the slowest. The performances in callus ultrastructure were also consistent with their cell development periods. It suggested that the callus induction in *Indica* rice had close relation with their cell development rates, physiological functions and senescences as well. The callus browning was also related to the accumulation period of some black substance and the development of their vacuoles. The rate of callus induction in *Indica* rice would be increased by adding cytokinin in medium for callus induction.

Key words: *Indica* rice, mature embryo, callus tissue, ultrastructure

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上重要的粮食作物之一, 种植面积广, 需求量大, 世界上近一半人口都以大米为食, 因而对其进行品种改良备受关注. 随着生物技术的发展, 利用生物技术手段改良水稻品种资源越来越受重视. 采用转基因工程, 将外源基因导入水稻, 不仅丰富水稻的基因型, 而且对培育优质、高产、多抗新品

种的现代水稻育种指明发展方向. 利用水稻成熟胚进行组织培养具有材料来源广、取材不受季节和地理环境限制,而且接种操作方便、不易染菌等优点,因而被很多水稻生物技术专家及学者使用^[4,5]. 由于籼稻作为我国现在的主栽品种,因此,加强籼稻组织培养技术的研究尤显重要. 目前对籼稻的成熟胚再生体系已有不少报道^[6-8],主要侧重在对外源不同理化因子和激素的调优,从而达到较高的出愈率^[9-11]. 但是由于组织培养过程中多是非胚性的愈伤组织,植株的总体再生率不高,甚至无法获得再生植株. 而且从总体出愈率上看籼稻成熟胚明显低于粳稻品种^[12-14]. 生物体的形态结构和生理机能是相互联系和适应的,形态结构的变化是生理机能实现的基础和前提^[16]. 而愈伤组织诱导是水稻组织培养的最关键步骤,并且对分离原生质体、植株的再生及种质选育均有广泛的应用价值^[15]. 阎丽娜等^[20]研究了出愈率不同的粳稻成熟胚在愈伤诱导过程中超微结构的差异,发现:在透射电镜下,诱导相同时间、出愈快的水稻品种类型的愈伤组织较早地形成完整的细胞结构,表现为细胞壁形成、细胞形状规则、细胞核变圆、液泡较大,尤其是线粒体数目较多并靠近细胞核,并可以看到线粒体的内嵴,同时可看到内质网与细胞核、线粒体等形成发达的网状内膜系统,表明此阶段细胞生理功能趋于完善、发育完全;而出愈迟的品种类型则同期细胞内细胞器发育不完全,尤其是线粒体数目比较少、未见内质网、生理功能较弱,而呈现细胞发育初级的结构特征,看来,不同粳稻出愈率和分化的高低主要与愈伤组织细胞发育速度的快慢、生理功能的强弱、以及其衰老的程度有密切关系. 因此,进一步研究造成籼稻出愈率低的结构差异,将有助于揭示籼稻出愈率低的内在原因. 为此,本文在前期大量筛选的基础上^[14],选取了有代表性的出愈率不同的籼稻材料作为研究对象,拟观察其在不同诱导时期的愈伤组织细胞超微结构的变化,探讨出愈率不同的籼稻材料成熟胚诱导过程中细胞超微结构的差异,试图明确其细胞发育和分化的规律性,从而为揭示籼型水稻胚性细胞的分化机理的揭示提供信息,并为籼型水稻成熟胚组织培养再生技术中最适培养基的筛选以及遗传改良提供技术支撑和理论依据.

1 材料和方法

1.1 样品的采集

参照 Yan 等方法^[2],选取出愈率显著不同的 3 个籼稻材料(扬辐籼 6 号、恢 76 和黄华占),分别接种于 M8+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+2 mg/L2,4-D+2 mg/L6-BA+1 mg/LABA+0.5 mg/LKT+1 mg/LNAA 的诱导培养基中. 分别取不同诱导时期诱导 9 d 和 15 d 大小、生长状态一致的愈伤组织,统一用于测定.

1.2 愈伤组织细胞的电镜制备

将愈伤组织从培养基中取出后,立即投入到预冷的 2.5% (pH 7.2)戊二醛中进行抽气固定,2 h 后用锋利刀片切取愈伤组织的外部(大约 0.1 cm 厚),然后再次投入到预冷的 2.5% (pH 7.2)戊二醛中进行抽气固定,然后将愈伤切片投入到有新的戊二醛溶液的 EP 管中,于 4 ℃ 保存,待样品全部取到后,统一供透射电镜观察.

将供试样品用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 3 次,再经梯度浓度丙酮脱水,环氧树脂浸透和包埋,聚合成包埋块后在超薄切片机上切成 50 nm ~ 70 nm 的切片,醋酸双氧铀和柠檬酸双重染色,于南京农业大学生命科学学院实验中心电镜室日立 H-7650 透射电子显微镜下观察、摄影并记录^[15,16].

1.3 数据分析

愈伤组织诱导率=(产生的愈伤组织米粒数/接种的米粒数)×100%,
绿苗分化率=(分化绿苗的愈伤组织块数/转移的愈伤组织块数)×100%,
显著性差异分析使用了统计软件 SPSS 17.0 进行 ANOVA.

2 结果与分析

2.1 3 种籼稻愈伤组织诱导 25 d 后出愈率的比较

将 3 种籼稻的成熟种子接种于同一诱导培养基上,设置 2 组,其中 1 组用于计算品种の出愈率. 利用 ANOVA 进行统计分析,发现 3 种籼稻品种の出愈率存在极显著差异,如表 1 所示在 25 d 时 3 个品种の出愈率,可见扬辐籼 6 号出愈最高,黄华占出愈最低;而表 2 则表示 3 种材料的绿苗分化率,结果表明,这 3 种材料的愈伤组织的绿苗分化率之间存在极显著差异,与出愈率结果相一致,扬辐籼 6 号绿苗分化率最高,黄华占分化率最低.

表 1 3 种籼稻品种 25 d 时的愈伤诱导率

Table 1 Callus induction frequency of 3 *Indica* rice varieties after 25 d cultivation

材料名称	接种粒数/个	出愈总数/个	总出愈率/%	平均出愈率/%
扬辐粳 6 号	159	158	99.4	98.2 ^{Aa}
	163	160	98.2	
	177	172	97.2	
恢 76	162	133	82.1	80.5 ^{Bb}
	170	138	81.2	
	157	123	78.3	
	178	88	49.4	
黄华占	168	85	50.6	48.9 ^{Cc}
	172	80	46.5	

注:A~C 和 a~c 分别表示 3 个籼稻品种在同一培养基上出愈率的显著性差异分析. 其中,A~C 表示极显著($P<0.01$),a~c 表示显著($P<0.05$).

表 2 同一分化培养基上 3 种籼稻愈伤组织的绿苗分化率

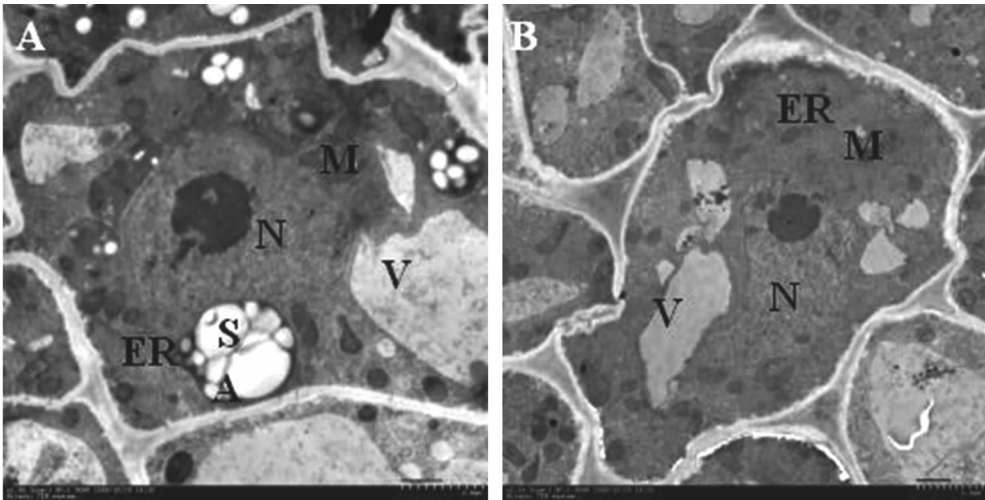
Table 2 Callus differentiation rate of 3 *Indica* rice varieties on the same differentiation medium

材料名称	转入愈伤数/个	分化绿苗数/个	绿苗分化率/%	平均出愈率/%
扬辐粳 6 号	129	112	86.9	86.0 ^{Aa}
	123	105	85.46	
	127	109	85.8	
恢 76	122	59	48.4	49.3 ^{Bb}
	120	61	50.8	
	127	62	48.8	
	128	51	39.8	
黄华占	128	50	39.1	39.7 ^{Cc}
	122	49	40.2	

注:A~C 和 a~c 分别表示 3 个籼稻品种在同一培养基上出愈率的显著性差异分析. 其中,A~C 表示极显著($P<0.01$);a~c 表示显著($P<0.05$).

2.2 扬辐粳 6 号不同诱导天数愈伤组织细胞超微结构的变化

扬辐粳 6 号的成熟胚接种 9 d 时,开始诱导出愈伤组织,从图 1A 可见,此时已经形成细胞壁,整个细胞比较规则,细胞核变圆,液泡较大,线粒体较多,大多数靠近细胞核,可以清楚地看到线粒体的嵴.同时可看到内质网与细胞核、线粒体等形成发达的网状内膜系统,表明此阶段细胞生理功能趋于完善.内质网依



M. 线粒体;N. 细胞核;S. 淀粉粒;V. 液泡;ER. 内质网;A. 造粉体;
A,B: 分别表示在基本培养基中培养 9 d 和 15 d 时的愈伤组织细胞结构

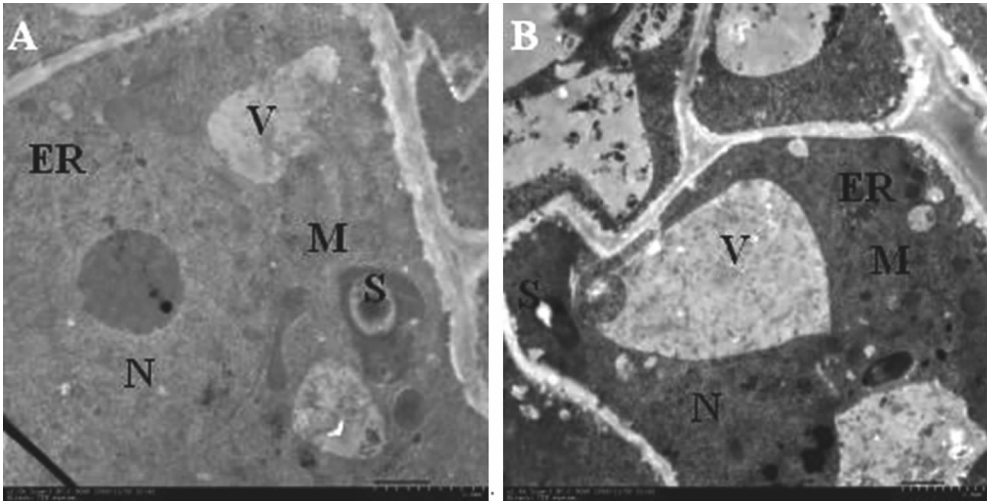
图 1 扬辐粳 6 号愈伤组织的透射电镜观察(标尺为 10 μm)

Fig.1 Transmission electron microscopic observation on callus from Yangfuxian 6(The bar in the picture represents 10 μm)

靠线粒体为形成成熟细胞所需的蛋白质和脂类等大分子提供能量,淀粉粒大量存在、聚集在一起,但是由于其生理活动的能力不强、利用率不高,因此,出现了很多能量的贮藏形式造粉体. 到诱导 15 d 时,细胞核形状开始拉长,线粒体很少,但是仍然可以清楚地看到嵴. 液泡较小,也观察到有少量黑色物质聚集,这与阎丽娜等对粳稻的观察结果类似^[6],推测这可能是液泡以吞噬这些氧化物质、减少愈伤组织的褐化(图 1B). 此时观察到内质网很少,没有淀粉粒. 这些都是细胞衰老的标志,表明细胞此时已经开始衰老,可以明显看出,该材料衰老得比粳稻快,这是与粳稻的不同之处.

2.3 恢 76 不同诱导天数愈伤组织细胞超微结构的变化

恢 76 的成熟胚接种 9 d 时也诱导出愈伤组织,与扬辐籼 6 号类似,此时它的细胞壁已形成,整个细胞和细胞核形状较规则,细胞核很大,线粒体不清晰、体积小、数目少,但是可以看见发达的内质网,以及少量的高尔基体,共同形成发达的网状内膜系统(图 2A). 由于内质网是依靠线粒体提供能量形成成熟细胞所需的蛋白质和脂类等大分子的,此时已经形成了极少量的圆形淀粉粒,表明糖代谢功能已具备. 15 d 时,细胞内出现了较大的液泡,液泡内有少量黑色物质,但是没有聚集成一团. 细胞核被挤到细胞的一侧,线粒体较之 15 d 时有所增加,清晰可辨. 内质网短小,但是数量很多. 单粒淀粉粒的数量有所增加(图 2B). 表明此时的细胞正处于成熟时期,可见诱导率中等的籼稻恢 76 的细胞发育过程明显比同期扬辐籼 6 号的迟,可见细胞发育的快慢可能与其愈伤组织的诱导有关.



M. 线粒体;N. 细胞核;S. 淀粉粒;V. 液泡;ER. 内质网;
A、B: 分别表示在基本培养基中培养 9 d 和 15 d 时的愈伤组织细胞结构
图 2 恢 76 号愈伤组织的透射电镜观察(标尺为 10 μm)

Fig. 2 Transmission electron microscopic observation on callus from Hui 76(The bar in the picture represents 10 μm)

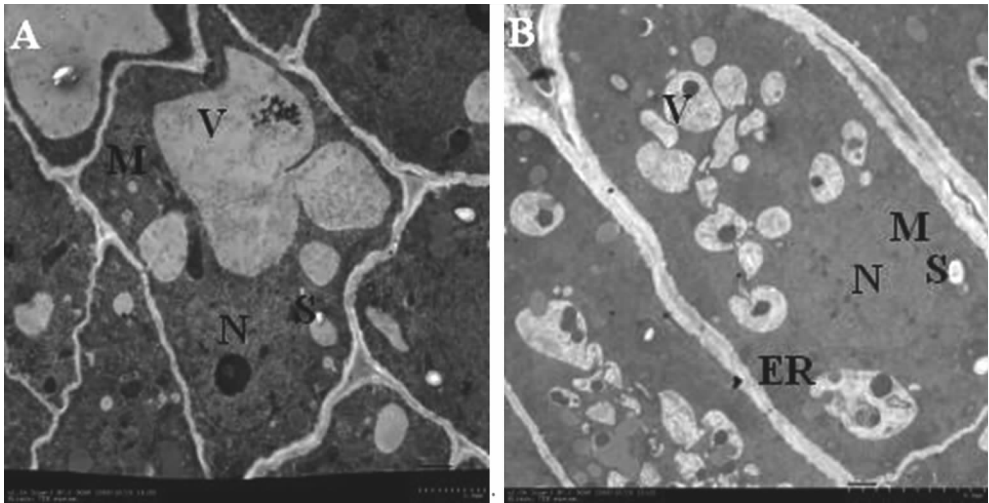
2.4 黄华占不同诱导天数愈伤组织细胞超微结构的变化

黄华占的成熟胚接种 9 d 时,整个细胞形状规则,细胞核较圆,液泡很大,液泡内已经有黑色的氧化物质开始聚集,有少量较小的单粒淀粉粒存在. 线粒体不清晰,体积小,数目少,且发育较迟,它可能尚处在细胞器合成阶段(图 3A). 到 15 d,整个细胞仍呈规则形状,细胞核呈圆形,单粒淀粉粒大量存在,线粒体多而发达,清晰可辨,可以清楚地看到嵴,内质网发达,液泡多而小,黑色氧化物质聚集在一起(图 3B). 说明此时细胞才进入分化阶段,但是也出现了衰老的物质,可见,出愈率比扬辐籼 6 号和恢 76 明显低的黄华占愈伤组织的发育更迟,而且细胞周期短、衰老快.

总之,比较 3 个品种的愈伤组织细胞可以发现:扬辐籼 6 号发育最快,细胞最早成熟,生理功能最强,衰老较慢,出愈率高;恢 76 居中;黄华占发育最慢,成熟最迟,但衰老快,生理功能弱,出愈率低. 这与粳稻的发育情况^[19]与出愈率的关系是一致的.

2.5 3 种籼稻愈伤组织褐化率的比较

15 d 后,将诱导的愈伤组织转入同一分化培养基中,(28±2)℃光照培养 7 d 后观察它们的褐化情况,统计褐化率,利用 ANOVA 进行统计分析. 在相同分化培养基上,不同品种籼稻愈伤组织之间的褐化率差异显著,其中黄华占的褐化率最低(为 0%),其次是扬辐籼 6 号(12.5%),恢 76 最高(25.0%). 将 3 个品



M. 线粒体;N. 细胞核;S. 淀粉粒;V. 液泡;ER. 内质网;
A、B: 分别表示在基本培养基中培养 9 d 和 15 d 时的愈伤组织细胞结构
图 3 黄华占愈伤组织的透射电镜观察(标尺为 10 μm)

Fig.3 Transmission electron microscopic observation on callus from Huanghuazhan(The bar in the picture represents 10 μm)

种的褐化率与愈伤组织细胞中液泡内氧化物最多时进行比较,发现黄华占液泡内的黑色氧化物在诱导初期时(9 d)已经有所集中,扬辐粳 6 号是在诱导末期(15 d)液泡内聚集了少量的黑色物质,而恢 76 在诱导末期(15 d)液泡内虽然也出现了黑色物质,但是并没有聚集在一起. 这表明了细胞内黑色的氧化物出现集中的情况越早褐化率就越低. 与此同时,水稻愈伤组织褐化不仅与液泡内黑色氧化物的出现迟早有关,更重要的是与液泡的吞噬和消化能力的强弱有很大的关系. 液泡的发育越早,其吞噬和消化能力越强,就越能较早地吞噬细胞内的有害物质,进而将其消化,如黄华占;而吞噬和消化能力较弱的恢 76 细胞的液泡,由于其不能及时地清除细胞内的有害物质,而最终导致较多的褐化;扬辐粳 6 号的情况则居中. 可见,供试水稻愈伤组织褐化率差异与愈伤组织中液泡的发育密切相关.

3 结论与讨论

植物组织培养是近年来迅速发展起来的一项高新技术,它已成为生物工程的一个重要组成部分. 而以水稻成熟胚作为外植体诱导出完整植株是植物组织培养应用广泛的技术手段. 但在籼稻愈伤诱导过程中常会出现诱导率低和组织褐化等问题. 因此,加强组织培养过程中关键技术与细胞生长及发育机制的研究,揭示其内在的规律性,对选择最适的培养条件以及研究体细胞的遗传特性有相当重要的意义.

以往一些关于植物愈伤超微结构的研究,多是对某个植物品种的胚性愈伤和非胚性愈伤进行对比观察^[17-19]. 而本实验则选择了 3 种出愈率不同的籼稻材料对其不同诱导过程中愈伤组织的变化进行系统的观察研究. 结果表明,经对比扬辐粳 7 号、恢 76 和黄华占成熟胚诱导的愈伤超微结构发现,细胞核及胞内各种细胞器等结构均发生了一系列的变化,且遵循细胞发育的规律,这与 Li^[1]等研究细胞去分化过程中细胞器的变化是相一致的,细胞核变大,细胞器种类增加,数目增多. 但是在相同的诱导时间,3 个品种的愈伤组织细胞的发育进程则有差异. 如扬辐粳 6 号愈伤组织的细胞发育较快,而恢 76 愈伤组织的细胞则发育较慢,黄华占则发育最慢,诱导末期还处于分生阶段. 此外,细胞中膜系统发育与出愈率之间也存在着密切关系. 出愈率较高的扬辐粳 6 号和恢 76 在诱导过程中,膜系统相当发达,表明细胞处于十分活跃的状态,最明显地观察到愈伤组织中线粒体由少到多,且内嵴发达,这与细胞分裂分化提供能量有关. 同时胚性细胞中质体淀粉粒大量积累,淀粉粒为进一步分裂和蛋白质等生理功能的完善贮备了丰富的能量. 而且在 3 个品种愈伤发育的后期,从液泡的发育情况,以及液泡对胞内黑色物质吞噬和消化作用的强弱来看,细胞内黑色物质出现集中的情况越早,褐化率就越低,虽然出现黑色物质的现象与粳稻的研究^[20]类似,但是其出现的时间明显地早于粳稻,可见,籼稻诱导的愈伤组织细胞相对寿命短,容易老化,这可能是其容易褐化的原因. 总之,从这 3 个水稻品种愈伤发育时期来看,细胞发育的快慢与出愈率有关,维持籼型水稻愈伤组织细胞的生命周期,可能是提高籼稻成熟胚高频出愈的关键.

不同基因型水稻在愈伤组织诱导过程中呈现的差异,可能是不同材料对培养基的激素配比要求不同,或与不同材料具有不同的内源激素水平有关,或者是水稻组织培养特性受遗传调控. 我们前期籼稻和粳稻成熟胚愈伤组织的最适的配方就验证了不同材料对培养基的激素配比要求不同这一结论,即粳稻只要有外源激素 2,4-D 就可以高频诱导出愈伤组织,而籼稻要在 2,4-D 的基础上联合添加细胞分裂素类激素^[5],本文籼稻愈伤的诱导培养基的组分也同样证明了这一结论,而对这一现象的研究可能是不同材料具有不同的内源激素,或是施加外源激素引起内源激素含量的变化,Lakshmanan 等^[3]研究表明,外源 2,4-D 在愈伤组织诱导过程中通过改变细胞内源 IAA 代谢而起作用. 可见,水稻愈伤组织发育的差异是籼稻和粳稻成熟胚组织培养力差异的重要结构基础. 因此,在进行籼稻成熟胚培养时,为了提高愈伤组织诱导效果,应选择适宜的基因型材料,同时注意其与激素的互作关系,从而建立合理的培养调控体系. 通过外源激素的调优,平衡籼稻内源生长素类高低有关,尤其是调高细胞分裂素的含量,可以控制其发育的快慢,延长细胞的生命,可能是提高其出愈率的关键. 如何通过外源激素或培养条件的调优,使发育迟缓的籼稻品种尽早发育或者使出愈不同的籼稻材料发育同步化,可能是提高籼稻出愈和分化的关键,也将是未来研制适应性广的水稻高频成熟胚再生技术的重要内容之一.

[参考文献]

- [1] Li F, Cui X, Feng Z, et al. The effect of 2,4-D and kinetin on differentiation of petiole cells in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biologia Plantarum*, 2012, 56(1): 121–125.
- [2] Yan L, Li X, Wu D. The comparison in tissue culture ability of mature embryo in different cultivars of rice [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2010, 9(6): 840–84.
- [3] Lakshmanan P. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(10): 1007–1015.
- [4] 魏晓东, 李霞, 姚殊, 等. 糯性和非糯性水稻品种成熟胚组织培养力的比较 [J]. *核农学报*, 2012, 26(1): 6–10.
- [5] 李霞, 陈婷, 周月兰. 籼粳稻成熟胚愈伤组织培养力的比较 [J]. *南京师大学报: 自然科学版*, 2005, 28(4): 103–108.
- [6] 阎丽娜, 李霞, 蔡庆生. 水稻武育梗 3 号成熟胚愈伤组织诱导及植株再生研究 [J]. *江苏农业科学*, 2009(6): 67–69.
- [7] 危晓薇, 王冬梅, 祖木热木·吐尔逊. 水稻成熟胚愈伤组织诱导及其植株再生 [J]. *新疆农业科学*, 2007, 44(6): 889–891.
- [8] 任永刚, 张建中, 张红梅, 等. 通过成熟胚离体获得巨胚水稻新品种及性状和稻米品质分析 [J]. *上海师范大学学报: 自然科学版*, 2011, 40(3): 289–294.
- [9] 黄绿红, 单杨, 李高阳, 等. 铜元素对籼稻成熟胚组织培养的影响 [J]. *湖南农业科学*, 2010(7): 6–8, 12.
- [10] 苗春波, 万志刚, 孙丙耀. 2,4-D 和 6-BA 对籼稻成熟胚愈伤组织诱导和植株再生的影响 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(27): 12927–12929.
- [11] 覃伟, 韦鹏霄, 岑秀芬, 等. 提高优质籼稻成熟胚离体培养效果的几个因子 [J]. *广西农业科学*, 2005, 36(3): 193–195.
- [12] 殷绪明, 徐庆国, 李海林. 粳型杂交稻亲本成熟胚愈伤组织再生体系的建立 [J]. *现代生物医学进展*, 2007, 7(3): 347–350.
- [13] 王萍, 徐大勇, 王罡, 等. 粳籼稻两个亚种成熟胚组织培养与再生能力的比较研究 [J]. *种子*, 2007, 26(10): 66–67.
- [14] 阎丽娜, 李霞, 吴丹. 不同类型水稻材料成熟胚组织培养力的比较 [J]. *中国农业科学*, 2010, 43(6): 1127–1135.
- [15] 宋春风, 孙大业, 张玉英, 等. 白芷愈伤组织的电镜制样技术及超微结构观察 [J]. *河北师范大学学报: 自然科学版*, 1998, 22(3): 396–398.
- [16] 王超, 李霞. 高光强下转玉米 PEPC 基因水稻和未转基因水稻秧苗叶片超微结构的比较 [J]. *华北农学报*, 2007, 22(4): 99–103.
- [17] 陈德海, 潘文兰, 杨涛. 草莓组织培养细胞发育过程的电镜观察 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 1999, 38(6): 918–923.
- [18] 陈颖, 曹福亮, 甘习华. 不同状态银杏愈伤组织蛋白质电泳分析及电镜观察 [J]. *西北植物学报*, 2006, 26(11): 2239–2243.
- [19] 杨涛, 陈德海, 吴荔萍. 安祖花组织培养及其细胞和叶绿体发育过程的电镜观察 [J]. *亚热带植物通讯*, 1998, 27(1): 1–7.
- [20] 阎丽娜, 李霞. 不同粳稻品种成熟胚诱导过程愈伤组织超微结构的比较 [J]. *南京师大学报: 自然科学版*, 2009, 32(4): 103–109.

[责任编辑: 黄 敏]