

苹果四倍体品种天星的花粉形态及 胚囊发育特征研究

李林光¹, 王颖², 王玉霞^{1,3}, 张志宏³, 伊凯⁴, 刘志⁴

(¹山东省果树研究所, 泰安 271000; ²吉林农业大学园艺学院, 长春 130118;

³沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110866; ⁴辽宁省果树科学研究所, 鞍山 115009)

摘要:利用扫描电子显微镜(SEM)和激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)技术对二倍体富士苹果及其四倍体芽变品种天星的花粉性状及胚胎发育特征进行了观察与研究,结果表明:四倍体天星品种的畸形花粉率为10.27%,明显高于富士,花粉萌发率低,为62.42%。2个品种的花粉粒大部分侧面观为长椭圆形,具3沟型萌发孔沟,两极端形状宽而平整,极面观为三角形,但四倍体天星的花粉粒的极轴长和赤道轴长均大于二倍体富士,但P/E值小,差异显著,其花粉粒形状不及二倍体富士规则且饱满程度也低。四倍体天星的花粉表面为纵向条状纹饰,有少量分叉和穿孔,花粉外壁略显粗糙,不如二倍体富士的外壁光滑。天星和富士均为蓼型胚囊,二者均存在异常胚囊现象,天星的异常胚囊现象包括极核位置异常、极核数目异常、卵器结构异常、胚囊内有多个发育滞后的细胞等;而在富士中仅发现少数胚囊结构不完整的现象。

关键词:苹果;四倍体;花粉;胚囊

Pollen Characteristic and Embryonic Development of Tensei Apple

LI Lin-guang¹, WANG Ying², WANG Yu-xia^{1,3}, ZHANG Zhi-hong³, YI Kai⁴, LIU Zhi⁴

(¹Shandong Institute of Pomology, Taian 271000; ²College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118;

³College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866; ⁴Liaoning Science
Institute of Pomology, Xiongyue 115009)

Abstract: The pollen characteristics and embryonic development of Fuji(2x)apple and its bud mutation Tensei (4x), were observed by using Scanning Electron Microscope (SEM) and Laser Scanning Confocal Microscope (LSCM). The results showed that the rate of the abnormal pollens was 10.27%, which was larger than that of diploids. The rate of pollen germination of Tensei was 62.42%, which was lower than that of diploids. The pollens of both cultivars were 3-colporate, and the main shape was oblong and two polars of pollen were wide and flat, polars were triangle. But the shape of Tensei was less than Fuji, or the full extent was lower than Fuji. The pollen surface of Tensei was strips ornamentation, with a few of bifurcations and perforations. The pollen surface of Tensei was slightly rough, which of Fuji was smooth. The equatorial axis length and polar axis length of tetraploid were longer than diploid, but P/E value of tetraploid was less than diploid, which was significant difference. The embryo sac of Tensei and Fuji is chenopodiad-type, and there was abnormal embryo sac between them. The embryo sac of Tensei was abnormal in varying degrees, including polar nucleus was in abnormal position, abnormal number of polar nuclei, abnormal structure of egg apparatus and the stasis of embryo development. There were only few incomplete embryo sacs in Fuji.

Key words: Apple; Tetraploid; Pollen; Embryo sac

孢粉学是探讨植物起源、演化、分类及亲缘关系的基础学科之一。电子显微镜研制及应用,使孢粉

学研究出现了许多新的研究领域,获得纵深的发展^[1],迄今,利用电子显微镜已对苹果^[2]、葡萄^[3-4]、板栗^[5]等果树的自然多倍体或诱导多倍体进行了孢粉学研究。激光共聚焦显微技术已应用于生物芯片技术、激光显微操作系统、细胞骨架研究、生理生化、基因定位及胚胎学研究等领域^[6],目前,已经成功运用激光共聚焦显微镜对水稻^[7]、苹果属^[8]等多倍体的胚胎发育进行研究。天星(Tensei)是富士(Fuji)苹果的芽变,为四倍体品种^[9]。本研究运用扫描电子显微镜和激光扫描共聚焦显微镜对天星和富士的花粉性状及胚囊发育特征进行观察研究,以期为苹果多倍体育种提供一定的孢粉学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试材为苹果四倍体品种天星及其二倍体富士,生长于辽宁省营口市鲅鱼圈区熊岳镇辽宁省果树科学研究所,7年生,砧木为山定子,树势强健,生长结果正常。土壤为沙壤土,地势平坦。2007年天星盛花期为5月1日,富士盛花期为4月29日。

1.2 取样方法

2007年4月底在大蕾期采集花蕾,取其花药,经室温晾干后收集花粉。胚囊于花前1d取花期相对一致的花并切取子房部位,用皇家嘎拉品种进行人工授粉后开始取样,每天取样1次,直至花后5d,每次每个品种取样30朵花。

1.3 花粉萌发力测定

采用的培养基为15%蔗糖+1%琼脂+0.02%硼酸。花粉晾干后,用头发将花粉均匀条播在培养基上,4次重复,每重复播3行。置于25℃,湿度为65%的恒温箱中培养,6h后在光学显微镜下观察花粉的萌发情况,花粉萌发的标准以花粉管超过花粉粒直径为准^[10]。统计100粒以上,花粉萌发率(%)=(萌发花粉数/观察花粉总数)×100。

1.4 花粉形态观察

取少许晾干后花粉,轻拍,花粉均匀粘于双面胶

上,喷金镀膜后,置于日立S-450扫描电镜下观察,选取典型的花粉粒拍照。取6个不同的视野,每个视野选5个方位一致、典型的花粉调查花粉粒的极轴及赤道轴的长度。在200倍下调查畸形花粉包括小花粉和非椭圆形花粉的数量;同时对花粉粒大群体进行拍照。在1000倍下对花粉粒小群体进行拍照,在2000倍下分别对花粉粒的双沟侧面、单沟侧面和极面进行拍照,每品种取6个典型的花粉在5000倍下对花粉纹饰拍照。每项指标调查30个数据,通过DPS7.05进行统计分析。畸形花粉率(%)=(畸形花粉数量/花粉总数量)×100。

1.5 胚囊发育观察

取样后以FAA固定液固定24~48h,后转入70%乙醇中4℃保存备用。试验时梯度复水后(50%、30%、10%乙醇、蒸馏水)用4%蔗糖曙红溶液染色12~48h,水洗3次后乙醇梯度脱水(10%、30%、50%、70%、90%、100%)。50%水杨酸甲酯透明2h后转入100%水杨酸甲酯中透明12~48h。水杨酸甲酯封片,Zeiss510型激光扫描共聚焦显微镜观察,获取图像,LSCM Image Examiner软件处理图像。

2 结果与分析

2.1 花粉形态比较

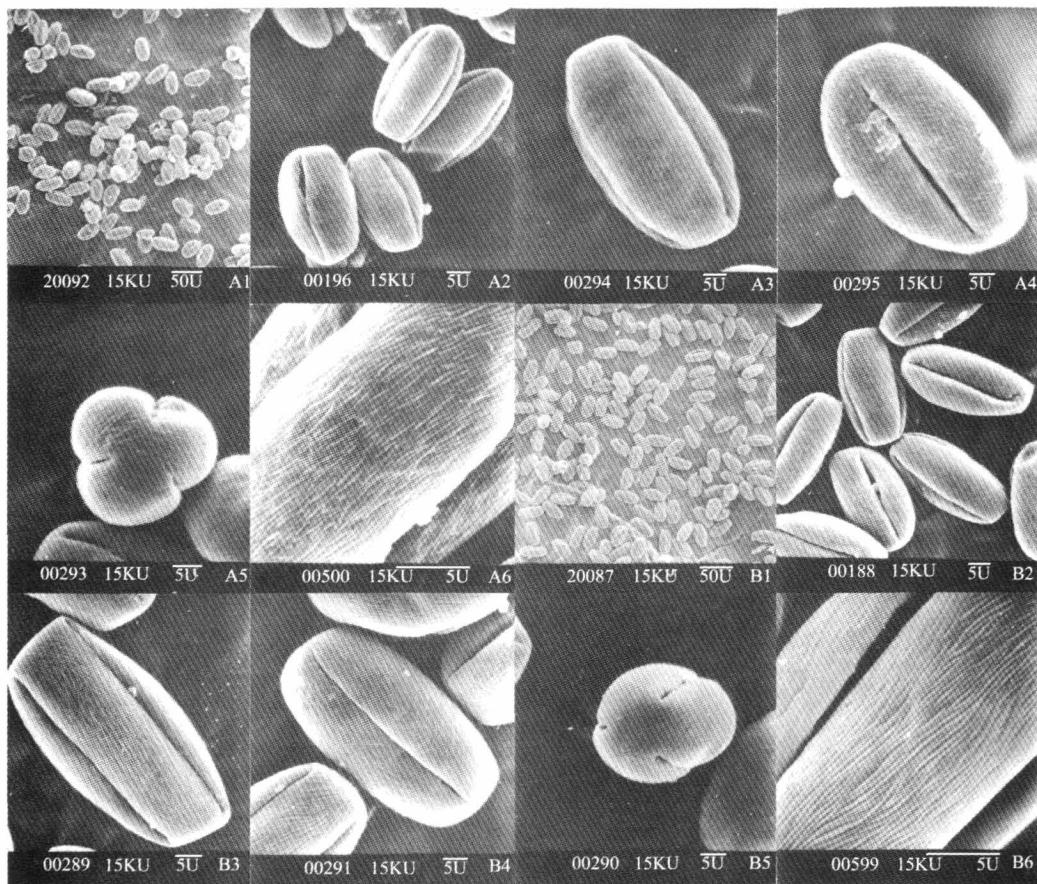
通过图版I观察可知,四倍体天星和二倍体富士花粉的大部分侧面观均为长椭圆形,极面观为三角形,两极端形状宽而平整,具3沟型萌发沟孔,萌发沟长,至近两端;天星花粉粒与富士相比较大,极轴长为44.16μm,赤道轴长为23.84μm,均大于富士的43.95μm和22.03μm。P/E值为1.87,与富士P/E值2.00相较小,但是差异明显。由表1可以看出,花粉萌发率富士为86.76%,天星低于富士,为62.42%,差异明显。天星的花粉形状不及富士规则,且饱满度低于富士,小花粉和非椭圆形花粉比较多,畸形花粉率为10.27%,高于富士的5.24%,差异明显。

表1 天星和富士的花粉粒性状扫描电镜观察比较

Table 1 Comparing the SEM observation of pollen morphology of apple

品种 Cultivar	倍性 Ploidy	极轴长(μm) Polar axis length	赤道轴长(μm) Equatorial axis length	极轴/赤道轴 P/E	畸形花粉率(%) The rate of abnormal pollens	花粉萌发率(%) Pollen germination rate
天星 Tensei	4x	44.16 ± 3.27 a	23.84 ± 2.37 a	1.87 ± 0.29 b	10.27a ± 0.56	62.42b ± 0.39
富士 Fuji	2x	43.95 ± 1.88 a	22.03 ± 1.47 b	2.00 ± 0.16 a	5.24b ± 0.34	86.76a ± 0.41

每列内不同字母表示差异达5%水平 Different letters in each column mean significant at 0.05 level



图版 I 天星和富士的花粉形态

Plate I Pollen morphology of Tensei and Fuji

A1:天星花粉群体 $\times 200$;A2:天星花粉群体 $\times 1000$;A3、A4:天星花粉粒的侧面观 $\times 2000$;

A5:天星花粉粒的极面观 $\times 2000$;A6:天星花粉粒的纹饰 $\times 5000$;B1:富士花粉群体 $\times 200$;

B2:富士花粉群体 $\times 1000$;B3、B4:富士花粉粒的侧面观 $\times 2000$;B5:富士花粉粒的极面观 $\times 2000$;B6:富士花粉粒的纹饰 $\times 5000$

A1: cluster of Tensei pollen used $\times 200$, A2: cluster of Tensei pollen used $\times 1000$,

A3 and A4: side morphology of Tensei pollen used $\times 2000$, A5: polar morphology of Tensei pollen used $\times 2000$,

A6: exine morphology of Tensei pollen used $\times 5000$, B1: cluster of Fuji pollen used $\times 200$,

B2: cluster of Fuji pollen used $\times 1000$, B3 and B4: side morphology of Fuji pollen used $\times 2000$,

B5: polar morphology of Fuji pollen used $\times 2000$, B6: exine morphology of Fuji pollen used $\times 5000$

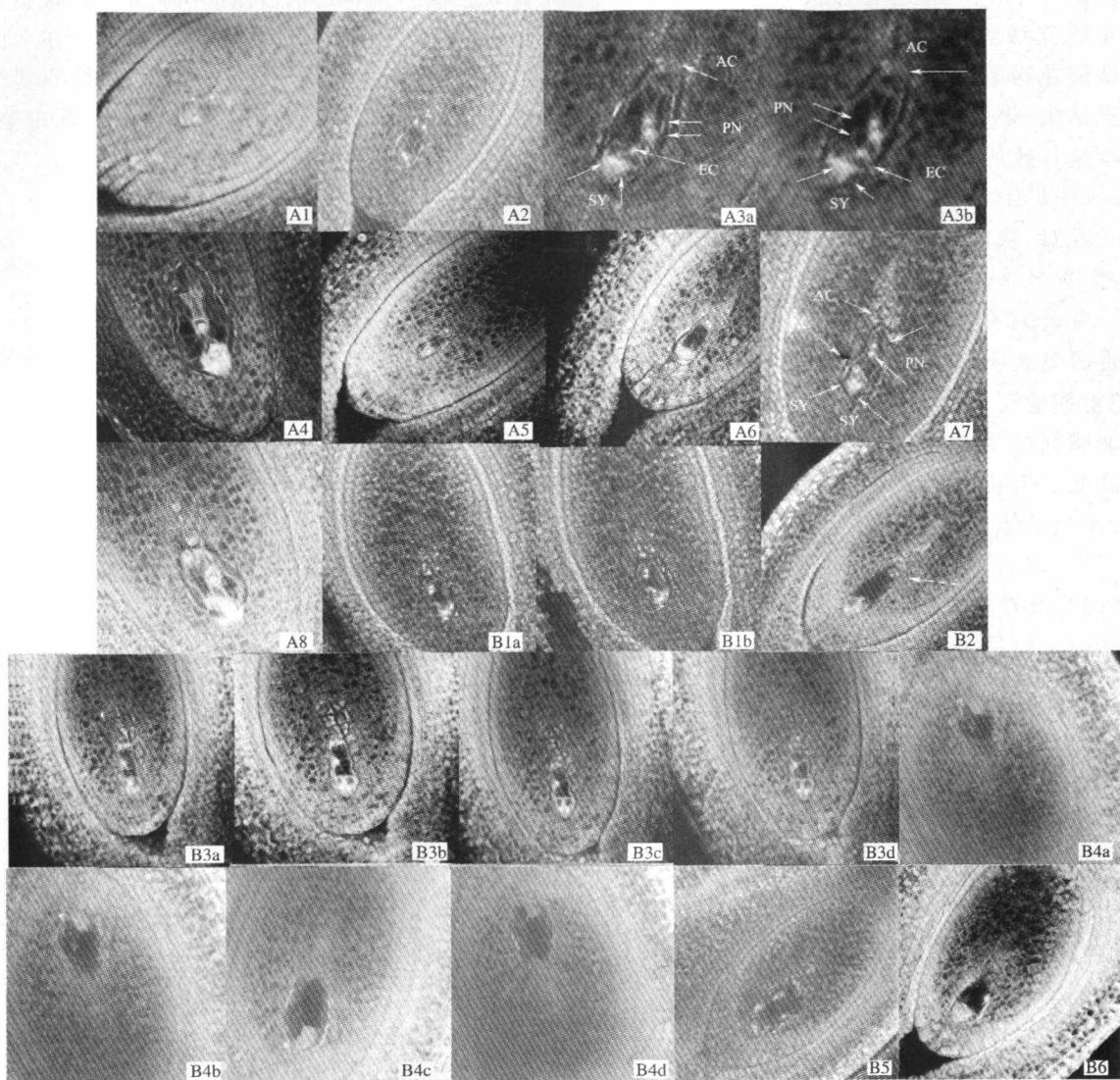
天星的花粉外壁略显粗糙,而富士的花粉外壁较光滑;天星花粉萌发沟宽,略深,花粉表面为纵向平行条状纹饰,排列比富士紧密,分叉特别多,具较少量回旋状纹饰;而富士条状纹饰排列较密,少见分叉,且回旋状纹饰多。天星的穿孔为近圆形,侧面观、极面观均分布有穿孔,侧面观相对平滑。

2.2 胚囊发育特征比较

由图版 II 可看出,天星和富士品种在胚囊发育过程中表现出来的特征大体相同,多数子房胚囊结构正常,为蓼型结构的胚囊。功能性大孢子经有丝分裂为二核胚囊、四核胚囊再分裂形成八核胚囊。表现为珠孔端由 1 个卵细胞和 2 个助细胞组成卵器,卵器上方 2 个极核,合点端是 3 个反足细胞(图

版 II A1~8)。

在这两个品种中除了大部分为正常结构的胚囊外,均存在不同程度的异常结构胚囊。在四倍体天星中观察到的异常情况是极核位置异常(图版 II B1a~b, B2),表现为极核不是位于卵器上方而是位于远离卵器的胚囊腔中央侧壁或在反足细胞附近等非正常位置;极核数目异常(图版 II B3a~d),只有 1 个极核;极核和反足细胞退化,卵器结构异常(图版 II B4a~d)。在天星中发现不一样的异常结构是胚囊内有多个细胞核,但是发育滞后(图版 II B5)。在二倍体富士中,观察到的异常情况是部分胚囊结构不完整,没有极核(图版 II B6),这种情况所占比率很少。



图版II 天星和富士的胚囊发育
Plate II The embryonic development of Tensei and Fuji

A1:二核胚囊,天星($\times 400$;4月30日);A2:四核胚囊,天星($\times 800$;4月30日);A3a、A3b:连片,八核胚囊,天星($\times 800$;5月1日);A4:极核融合和液泡高度液泡化,天星($\times 800$;5月4日);A5:二核胚囊,富士($\times 400$;4月30日);A6:四核胚囊,富士($\times 800$;5月1日);A7:八核胚囊,富士($\times 400$;5月1日);A8 极核融合,卵细胞高度液泡化,富士($\times 800$;5月3日);B1a~b:连片,极核位置异常,天星($\times 400$;5月2日);B2:极核位置异常,天星($\times 400$;5月2日);B3a~d:连片,只有一个极核,天星($\times 400$;5月2日);B4 a~d:连片,无极核,无反足细胞,卵器异常,天星($\times 400$;5月2日);B5:胚囊内有多核,但发育滞后,天星($\times 400$;5月2日);B6:没有极核,富士($\times 400$;5月3日)。EC:卵细胞;SY:助细胞;AC:反足细胞;PN:极核;SC:精核

A1:the two-nucleate embryo sac of Tensei($\times 400$;April 30th),A2:the four-nucleate embryo sac of Tensei($\times 400$;April 30th),A3a,A3b:the eight -nucleate embryo sac of Tensei($\times 800$;May 1th),A4:the two polar nucleus are fusalional, and the degree of the vacuoleof the egg apparatus deepen. Tensei($\times 800$; May 4th),A5:the two - nucleate embryo sac of Fuji($\times 400$;April 30th),A6:the four-nucleate embryo sac of Fuji($\times 400$;May 1th),A7:the eight-nucleate embryo sac of Fuji($\times 400$;May 1th),A8:the two polar nucleus are fusalional, and the degree of the vacuole of the egg apparatus deepen. Fuji($\times 800$; May 3th);B1a-b:polar nucleaus in abnormal position of Tensei($\times 400$;May 2th),B2:polar nucleaus in abnormal position of Tensei($\times 400$;May 2th),B3a-d:only one polar nucleui of Tensei($\times 400$;May 2th),B4a-d:no polar nucleaus,no antipodal cell and abnormal structure of egg apparatus. Tensei. ($\times 400$; May 2th),B5:the stasis of embryo development with more nucleaus of Tensei($\times 400$;May 2th),B6: no polar nucleaus,Fuji($\times 400$;May 3th). EC:egg cell. SY:synergid. AC:antipodal cell. PN:polar nuclei. SC:sperm cell

3 讨论

3.1 花粉特征

通过花粉粒特征进行倍性鉴定可了解孢原组织细胞的倍性水平,以花粉粒的特征进行倍性鉴定具

有重要的应用价值^[11]。多倍体品种的花粉粒表现巨大性,明显大于二倍体品种^[12]。本试验结果表明,四倍体天星的极轴长和赤道长均大于二倍体富士,但是极轴长差异不显著。其P/E值小于富士,差异明显。因此天星的花粉大小不能作为鉴定品种

的单一依据,必须与其他花粉性状结合才可靠。

在本研究观察结果中,天星与富士相比小花粉和非椭圆形花粉多,这与杨晓红^[13]对苹果属植物的花粉研究结果、多倍体花粉大小极不均匀、很多花粉呈不定型是一致的。这可能是由于四倍体的染色体加倍,小孢子母细胞在减数分裂过程中有些染色体不能正常配对,从而导致异常分裂,形成畸形花粉。减数分裂异常是影响多倍体育性的细胞遗传因素^[14-16]。邓秀新等^[17]对柑桔的同源及异源四倍体花粉育性研究表明,同源四倍体的平均花粉育性下降,小花粉数量大于二倍体品种,由此可知天星的小花粉和非椭圆形花粉可能没有育性,使天星的花粉萌发力降低。但减数分裂异常只是花粉育性低的部分原因,雄配子体在发育过程中异常也可能导致花粉败育^[18-19],以后可以对天星的雄配子体发育进行研究,来确定其花粉败育的具体原因。一般情况下,一个品种的花粉量多少与花粉萌发能力强弱,是决定雄配子参与受精能力强弱的标志^[20];而苹果花粉一般萌发率在30%,即在生活力较低的情况下,也能很好的结实^[21]。天星的花粉萌发率虽然比富士低,但是其萌发率为62.42%,说明其有一定的可育性,能正常授粉结实。

3.2 胚囊结构

本研究结果表明,四倍体天星正常胚囊的结构与二倍体富士是一致的,都属于典型的蓼型胚囊。这与王颖等^[8]在平邑甜茶与扎矮山定子杂交后代的四倍体皱叶矮生型株系上研究结果相同,张华华等^[22]研究也表明同源四倍体水稻受精、胚胎和胚乳发育过程及特点与正常的二倍体水稻的基本一致,这说明倍性的增加没有改变发育的过程。黄群策等^[23]研究认为同源四倍体水稻和二倍体水稻在发生受精作用的时间上没有很大的差异,这与本试验结果相同。但是在天星的胚囊中只观察到一个精核,这有可能是由于另一个精核被遮挡,没有扫描到,也有可能是另外一个精核已经与卵细胞融合,具体原因还需要进一步研究。

Guo等^[7]研究表明同源四倍体水稻中的雌性生殖单位退化、极核异常、胚囊退化、卵器退化、异常小胚囊和“双套结构”胚囊等6类异常胚囊,是其结实率低的原因。这可能是因为在大孢子母细胞减数分裂期间,产生的四价体、三价体、二价体和单价体等,引起同源染色体出现多种情况的异常分离,从而形成非整倍体的功能大孢子,这部分功能大孢子进一步发育时异常,最后导致成熟胚囊结构出现各种异常^[24]。

而王兰等^[25]对同源四倍体水稻研究证明极核数目异常和极核位置异常是不能正常受精的。在本试验中观察到的极核位置异常、极核数目异常、卵器结构异常、珠心细胞异常和发育滞后等胚囊异常现象,可能受精不正常,进而影响了天星的结实状况。

参考文献

- [1] Marcucci M C, Sansavini S, Ciampolini F, et al. Distinguishing apple clone and cultivars by surface morphology and pollen physiology [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1984, 109(1): 10-19
- [2] 石荫坪,王强生.苹果与梨花粉母细胞减数分裂的研究[J].园艺学报,1980,7(3):1-8
- [3] 牛立新,张延龙.中国野生葡萄花粉形态学研究[J].园艺学报,2000,27(5):361-363
- [4] 韩继成,赵胜建,郭紫娟.三倍体葡萄品种花粉形态及其坐果率的研究[J].果树学报,2005,22(5):561-563
- [5] 石荫坪,李雅志,王强生.果树突变育种[M].上海:上海科学技术出版社,1986:258-261
- [6] 肖艳梅,付道林,李安生.激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)及其生物学应用[J].激光生物学报,1999,8(4):305-311
- [7] Guo H B, Feng J H, Lu Y G, et al. Abnormal Structure of Embryo Sac in Autotetraploid Rice [J]. Rice Science. 2006,13(4):257-264
- [8] 王颖,商月惠,王玉霞,等.平邑甜茶与扎矮山定子杂交后代的胚胎发育特征研究[J].园艺学报,2008,35(8):1093-1100
- [9] Fukushima Tenkoen Co. Ltd., Fukushima, Japan. Apple Tree ‘Tensei’. United States, US009909298P [EB/OL]. (1995-9-26) [2010-4-30] <http://www.patentgenius.com/patent/PP9298.html>
- [10] 杨传友,毕杰,杨先栋.十二种果树花粉贮藏试验[J].果树科学,1994,11(2):103-104
- [11] 李贺,石荫坪,束怀瑞.利用苹果花粉粒形态进行倍性鉴定[J].园艺学报,1998,25(2):133-138
- [12] 徐喜楼,徐惠瑛,盛炳成,等.苹果属花粉扫描电镜观察[J].南京农业大学学报,1985,2(2):124-129
- [13] 杨晓红.苹果属植物花粉观察研究[J].西南农业大学学报,1986(2):121-129
- [14] 张继益,蒋观敏,罗耀武.高粱同源四倍体及其杂交种的细胞遗传学研究[J].华北农学报,1997,12(3):1-6
- [15] Costa Júlia Y, Formi-Martins Eliana R. A Triploid Cytotype of *Echinodorus tenuellus* [J]. Aquatic Botany, 2004, 79:325-332
- [16] 张蜀宁,万双粉,张伟,等.同源四倍体青花菜花粉母细胞的减数分裂[J].园艺学报,2007,34(2):387-390
- [17] 邓秀新,Fred G, Gmitter J, et al. 柑桔同源及异源四倍体花粉育性研究[J].园艺学报,1995,22(1):6-20
- [18] 万双粉,张蜀宁,张伟,等.同源四倍体青花菜雄配子体的发育过程[J].园艺学报,2008,35(3):438-442
- [19] 孔艳娥,张蜀宁,侯喜林,等.芥菜细胞质四倍体白菜雄性不育系花药发育的研究[J].园艺学报,2009,36(2):267-272
- [20] 吕柳新,林顺权.果树生殖学导论[M].北京:中国农业出版社,1995:38-50
- [21] 胡适宜.被子植物胚胎学[M].北京:人民教育出版社,1982:54-58
- [22] 张华华,刘向东,卢永根,等.同源四倍体水稻受精与胚胎形成过程的观察[J].激光生物学报,2006,15(1):9-14
- [23] 黄群策,代西梅,贾宏汝.利用激光扫描共聚焦显微技术观察同源四倍体双胚苗水稻的胚胎学特征[J].激光生物学报,2007,16(3):253-258
- [24] Koul K K, Raina S N. Male and female meiosis in diploid and colchicetraploid *Phlox drummondii* Hook. (Polemoniaceae). [J]. Linne Soci, 1996, 122:243-251
- [25] 王兰,刘向东,卢永根,等.同源四倍体水稻胚乳发育:极核融合和胚乳细胞化[J].中国水稻科学,2004,18(4):281-289

苹果四倍体品种天星的花粉形态及胚囊发育特征研究

作者: 李林光, 王颖, 王玉霞, 张志宏, 伊凯, 刘志, LI Lin-guang, WANG Ying, WANG Yu-xia, ZHANG Zhi-hong, YI Kai, LIU Zhi
作者单位: 李林光, LI Lin-guang(山东省果树研究所, 泰安, 271000), 王颖, WANG Ying(吉林农业大学园艺学院, 长春, 130118), 王玉霞, WANG Yu-xia(山东省果树研究所, 泰安271000;沈阳农业大学园艺学院, 沈阳110866), 张志宏, ZHANG Zhi-hong(沈阳农业大学园艺学院, 沈阳, 110866), 伊凯, 刘志, YI Kai, LIU Zhi(辽宁省果树科学研究所, 熊岳, 115009)
刊名: 植物遗传资源学报 [ISTIC PKU]
英文刊名: Journal of Plant Genetic Resources
年, 卷(期): 2011, 12(4)

参考文献(25条)

1. 王兰;刘向东;卢永根 同源四倍体水稻胚乳发育:极核融合和胚乳细胞化 2004(04)
2. 杨晓红 苹果属植物花粉观察研究 1986(02)
3. 徐喜楼;徐惠瑛;盛炳成 苹果属花粉扫描电镜观察 1985(02)
4. 李震;石荫坪;束怀瑞 利用苹果花粉粒形态进行倍性鉴定 1998(02)
5. 杨传友;毕杰;杨先栋 十二种果树花粉贮藏试验 1994(02)
6. Fukushima Tenkoen Co. Ltd Fukushima, Japan. Apple Tree ‘Tensei’ 2010
7. 王颖;商月惠;王玉霞 平邑甜茶与扎矮山定子杂交后代的胚胎发育特征研究 2008(08)
8. Guo H B; Feng J H; Lu Y G Abnormal Structure of Embryo Sac in Autotetraploid Rice 2006(04)
9. 肖艳梅;付道林;李安生 激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)及其生物学应用 1999(04)
10. 石荫坪;李雅志;王强生 果树突变育种 1986
11. 韩继成;赵胜建;郭紫娟 三倍体葡萄品种花粉形态及其坐果率的研究 2005(05)
12. 牛立新;张延龙 中国野生葡萄花粉形态学研究 2000(05)
13. 石荫坪;王强生 苹果与梨花粉母细胞减数分裂的研究 1980(03)
14. Marcucci M C; Sansavini S; Ciampolini F Distinguishing apple clone and cultivars by surface morphology and pollen physiology 1984(01)
15. Kou K K; Raina S N Male and female meiosis in diploid and col chitetraploid Phlox drummondii Hook. (Polemoniaceae) 1996
16. 黄群策;代西梅;贾宏汝 利用激光扫描共聚焦显微技术观察同源四倍体双胚苗水稻的胚胎学特征 2007(03)
17. 张华华;刘向东;卢永根 同源四倍体水稻受精与胚胎形成过程的观察 2006(01)
18. 吕柳新;林顺权 果树生殖学导论 1995
19. 孔艳娥;张蜀宁;侯喜林 茎芥菜细胞质四倍体白菜雄性不育系花药发育的研究 2009(02)
20. 万双粉;张蜀宁;张伟 同源四倍体青花菜雄配子体的发育过程 2008(03)
21. 邓秀新;Fred G;Gmitter J 柑桔同源及异源四倍体花粉育性研究 1995(01)
22. 张蜀宁;万双粉;张伟 同源四倍体青花菜花粉母细胞的减数分裂 2007(02)
23. Costa Júlia Y; Forni-Martins Eliana R A Triploid Cytotype of Echinodorus tenuellus 2004
24. 张继益;蒋观敏;罗耀武 高粱同源四倍体及其杂交种的细胞遗传学研究 1997(03)
25. 胡适宜 被子植物胚胎学 1982