

综述 Review

花药和小孢子培养技术应用于大麦育种的回顾与展望

王亦菲, 陆瑞菊, 黄剑华*

上海市农业科学院生物技术研究所, 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海201106

摘要: 大麦是世界上重要的农作物之一, 也是啤酒和饲料工业的重要原料, 因此培育耐逆、抗病、丰产、优质大麦新品种, 可以大大提高大麦的产量和品质。育种方法的改进, 可以提高大麦遗传改良的效率。本文对大麦的花药和小孢子培养技术在遗传改良上的应用进行了综述, 对依据小孢子培养技术, 发展多项大麦遗传改良技术的前景展开了讨论。

关键词: 大麦; 花药; 小孢子; 育种

Review and Perspective on the Application of Anther and Microspore Culture in Barley Breeding

WANG Yi-Fei, LU Rui-Ju, HUANG Jian-Hua*

Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

Abstract: Barley (*Hordeum vulgare* L.) is one of the most important cereal crops in the world, and used as the raw materials for malting and animal feed. Therefore, in order to improve the yield and quality of barley, it is critical to breed new cultivars with the traits of stress tolerance, anti-disease, high yield and excellent quality. Efficiency of genetic improvement for barley can be increased by development of breeding methods. This paper reviewed the work on the application of anther and microspore culture in barley genetic improvement, and discussed the perspective of multiple technologies for barley genetic improvement based on the microspore culture technology.

Key words: barley; anther; microspore; breeding

作物育种包含三个主要过程: 一是通过各种途径创造变异, 二是按育种目标选择变异, 三是使有益变异迅速稳定并将其发展成为新品种。近代作物育种的历史表明, 育种新技术和新方法的应用将会极大地提高作物育种的效率。

60年代印度科学家从毛叶曼陀罗花药中首次诱导出单倍体植株(Guha和Maheshwari 1964), 利用大麦花药离体培养方法产生单倍体植株最早成功于1973年(Clapham 1973), Kohler和Wenzel于1985年报道了大麦小孢子离体培养。花药和小孢子离体培养技术被国内外有关科学家和育种者所重视和采用, 是因为花药培养再生植株经染色体加倍成纯合加倍单倍体(doubled haploids, DHs), 再生植株的所有基因都已纯合固定, 理想的等位基因不会在以后的世代中由于分离而丢失, 可以避免杂种后代的严重分离, 从而加速性状重组过程, 缩短育种年限, 使各种隐性性状得以表现出

来, 以致可以在配子体水平上进行优良基因的筛选, 极大地提高选择效率, 尤其可以提高由主效基因控制的质量性状和多基因控制的数量性状的选择效率。

大麦是啤酒业的主要原料, 中国已成为全球最大的啤酒生产和消费国, 啤酒年产量已接近3 000万吨, 需要啤麦330万吨, 同时, 大麦又是优质饲料。江苏、上海沿海地区是种植大麦的适宜地区, 培育耐逆、抗病、丰产、优质大麦新品种, 无疑可以提高这些地区栽培大麦的产量和品质。

与其他主要农作物相同, 包括诱变育种、细

收稿 2014-10-15 修定 2014-11-26

资助 上海市科委基础重点项目(14JC1405300)、上海市种业发展项目[沪农科种字(2012)第7号]、国家大麦青稞产业技术体系(CARS-05)和上海市农业科学院学科领域建设专项(LY11)。

* 通讯作者(E-mail: sw1@saas.sh.cn; Tel: 021-62201032)。

胞无性系变异技术、加倍单倍体育种、分子标记辅助以及转基因育种等各类育种技术在大麦育种实践中得到了不同程度的应用。本文对大麦花药和小孢子培养技术在遗传改良上的应用进行综述,对依据小孢子培养技术,发展多项大麦遗传改良技术的前景展开讨论。

1 花药培养技术应用于大麦遗传改良的研究

花药培养技术应用于大麦育种,其前提工作是建立花药培养高频再生技术。黄剑华等(1993, 2001)和孙月芳等(2003)报道了以改良大麦迟钝基因型花药培养胚性愈伤组织形成频率为目的的研究结果,采取一定的综合措施,即:取主茎或大分蘖穗中的花药、供体材料适当早播、适当提高诱导培养基中生长素的使用浓度和添加水解酪蛋白(casein acid hydrolysate, CH)、麦穗和花蕾提取液及脯氨酸等,均可以提高迟钝基因型的花药培养效果。黄剑华等(1991)报道了以上百份大麦基因型为供试材料,获得平均绿苗分化率5%的研究结果,继而又报道了大部分供试材料的绿苗率提高到10%以上,部分达到50%以上的花药培养结果(黄剑华等1998)。华为等(2013)使用甘露醇预处理大麦花药,再在相应的诱导培养基和再生苗培养基上培养,获得了大量分化绿苗。利用该方法比较了10个大麦杂交组合花药预处理4 d和5 d的效果,结果表明花药预处理4 d或5 d对培养效果没有显著差异,均能达到较高的绿苗产率。同时利用该方法比较了25个杂交组合的花药培养效果,发现组合间存在显著差异,而且绿苗产率与花药培养反应率(培养的花药中诱导出愈伤组织的花药比率)和绿苗分化率呈极显著正相关。Guasmi等(2013)报道了通过优化培养技术(取单核中期的花药接种和花药经过 $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇预处理20 d),使3份不同基因型大麦‘Igri’、‘Saida’和‘Libya’的花药培养反应率分别达到80%、60%和30%。

国内外科学工作者利用大麦花药培养方法,对促进抗病、耐逆、高产及品质遗传改良的方法和技术进行了研究,同时,获得了相应的优良大麦种质材料。

通过抗大麦黄花叶病(barley yellow mosaic virus, BaYMV)六棱品种与感病二棱品种杂交 F_1 的花药培养,快速获得了二棱抗BaYMV的重组体,又证

实了大麦花药培养后代植株中有一半为抗性植株的设想,并且获得了一批较好的花培株系材料(Foroughi-Wehr和Friedt 1984; Foroughi-Wehr和Wenzel 1990);通过花药培养技术与轮回选择的结合,加速了抗BaYMV和大麦云纹病(*Rhynchosporium secalis*)两种病害的大麦新株系培育进程(Dletzmann和Foroughi-Wehr 1996);以瑞典引进的大麦核质互作型雄性不育三系与当地大麦品种(系)杂交,其 F_1 经花药培养再生的植株染色体加倍后,从中筛选出4个具开颖、抗大麦黄花叶病(BaYMV)的保持系,培育出不育率在97.20%~98.48%的4个不育系和结实率大于95.00%的2个恢复系(杜永芹等1996);通过抗病材料与感病材料杂交 F_1 的花药培养,获得双单倍体群体,对该群体的抗感分离比进行了分析,获得了大麦抗秆锈、叶锈和白粉病的遗传控制模式(Steffenson等1995);结合抗BaYMV育种工作,开展了大麦花药培养研究,从花培后代中选出一些理想株系,进行了鉴定试种(朱睦元1994)。

在含盐培养基上培养大麦花药并选择耐盐花药培养再生植株的研究结果表明,在盐胁迫培养基上通过 F_1 花药培养筛选耐盐基因型是可行和有效的(Ye等1987);孙月芳等(2005)报道了辐照处理花药后在铝胁迫培养基上诱导形成愈伤组织并在铝胁迫培养基上少量分化形成绿苗; Bian等(2013)应用花药培养获得大麦DH株系用于耐酸铝基因标记筛选,获得的新标记被进一步定位到4H染色体上的一个与酸土耐性相关的QTL(数量性状位点)区域,可以解释DH群体66.9%的表型变异;通过比较双单倍体株系与 F_2 集团(F_2 bulks)方法对改良大麦耐旱性的效率,明确了利用花药培养产生双单倍体的技术可以用于抗旱高产大麦新品种的选育程序(Mayer等1995);王军等(2007)以源于大麦(‘Yerong’×‘Franklin’)杂交组合的加倍单倍体(DH)群体165个系为材料,考查湿害处理和对照的株高、穗长、穗下节长、单株穗数、主穗粒数、单株粒重、单株粒数、单株干重、千粒重、绿叶数和叶绿素含量,以各性状的耐湿系数作为衡量DH系耐湿性的指标,应用主成分分析法、动态聚类分析和隶属函数法,从样本相关矩阵出发,对大麦DH群体165个系的主要性状进行综合分析,提出了3个反映大麦主要耐湿性状的主成分及函数式,前

两个为穗粒因子, 第3个为绿叶数因子; 对165个系的耐湿能力进行基于3个主成分的三维空间下的动态聚类分析和综合评价, 将其分成高度耐湿、中度耐湿和极不耐湿3类; 栾海业等(2014)以耐湿大麦品种‘泰兴9425’与湿害敏感品种‘Franklin’构建的花药培养DH系及亲本为材料, 在湿害胁迫条件下, 考察了大麦苗期与耐湿性相关的根长、根鲜重、根干重、茎叶鲜重和茎叶干重, 各性状均表现为连续分布, 且都存在一定数量的双向超亲遗传类型, 为多基因控制的数量性状, 5个根系及茎叶性状共检测到13个QTL。利用大麦花药培养方法“固定”突变体杂种优势, F_1 花培产生的DH株系表现出较明显的产量优势(Polok等1997)。

在利用花药培养结合传统育种技术选育大麦新品种研究上, 我国科技工作者取得了可喜的成绩。1996年江苏沿海地区农业科学研究所与中国科学院遗传研究所合作, 利用花药培养技术, 培育出优质大麦新品系‘91单2’, 而后, ‘91单2’通过江苏省品种审定, 定名‘单二’(李安生等2000)。1997年上海市农业科学院与浙江省嘉兴农业科学研究所合作, 利用花药培育技术, 培养 F_2 代的花药, 在4年时间内, 选育出高产大麦新品系‘花94-30’。‘花94-30’分别通过上海、浙江、江苏、湖北、安徽等地的品种审定, 定名‘花30’(黄剑华等2000b)。该品种推广种植面积接近1 000万亩(相关成果获2003年上海市科技进步一等奖)。杨建明等(2003)在报道大麦育种研究进展时, 提及建立了成熟的大麦花药培养DH育种技术, 运用该技术已先后育成了‘单二’、‘单95168’、‘单57’等啤酒大麦新品种和优质啤酒大麦材料。黄剑华等应用杂交结合花药盐胁迫培养技术育成大麦新品种‘花22’(郎淑平等2006), 该品种已经成为江苏、上海等地的主要栽培品种(相关成果获2008年上海市科技进步二等奖)。

澳大利亚和加拿大的育种工作者利用大麦花药培养形成加倍单倍体育种技术, 获得了一大批优良加倍单倍体株系, 一些商业公司将花药培养形成加倍单倍体技术用于大麦新品种培育程序(私人通讯)。

2 小孢子培养技术应用于大麦遗传改良的研究

相对花药培养, 小孢子培养是真正意义上的

细胞培养系统, 且是单倍体、单细胞系统, 其所形成的再生植物全部为单倍体或加倍单倍体。小孢子细胞内只有一套染色体(基因), 单倍体细胞内基因发生的任何变化, 可以通过染色体加倍一次性纯合。

大麦小孢子离体培养高频再生是应用于遗传改良的关键, 该培养研究也取得了较好的进展。大田种植的杂交 F_1 材料游离小孢子培养的平均绿苗再生频率为11株· $(10^5$ 个小孢子) $^{-1}$, ‘花22’的绿苗再生频率达253株· $(10^5$ 个小孢子) $^{-1}$ (陈志伟等2012)。运用培养基中添加完整小花的方法, 明显提高了多个基因型大麦小孢子离体培养的胚状体诱导及其绿苗分化率(Lu等2008)。在迟钝型的六棱春性大麦上, 通过改变植物生长调节剂, 采用噻苯隆(thidiazuron)和麦草畏(dicamba)以及细胞分裂素3-[(9H-嘌呤-6-氨基)甲基]苯酚(meta-topolin), 成倍提高了小孢子培养绿苗分化率(Esteves等2014)。Castillo等(2014)以2份春性六棱大麦和2份春性二棱大麦为供试材料, 通过研究, 观察到(1)适宜的幼穗取材时间, (2) $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇预处理2 d或结合低温、高温的15 d预处理, (3)诱导培养基中添加甘露醇($32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)以及(4)每mL 10^6 个小孢子的培养密度都能够明显提高小孢子离体培养的绿苗再生频率。

陆瑞菊等(2011a, b)研究了大麦小孢子愈伤组织培养阶段的诱导培养基中NaCl含量和氮含量与愈伤组织产量的关系。并提出NaCl胁迫和氮素胁迫下, 不同基因型小孢子培养愈伤组织产量的相对值与苗期植株高度、茎叶干重、主根长度和根干重的相对值以及单株产量的相对值存在一致性, 说明供试品种小孢子水平与植株水平的耐盐性和耐低氮性存在相关性和一致性, 为开展小孢子水平的抗盐、耐低氮筛选奠定了理论基础。

陆瑞菊等(2012)以大麦品种‘花30’作为供试材料, 比较了甲基磺酸乙酯(ethylmethylsulfone, EMS)处理小孢子、平阳霉素(pingyangmycin, PYM)处理小孢子、 ^{60}Co γ -射线辐照离体穗上的游离小孢子、 ^{60}Co γ -射线辐照干种子后再取其植株上花药中小孢子这4种处理, 然后考察这些处理后的游离小孢子在 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl胁迫培养下的愈伤组织产量和愈伤组织在0.5% NaCl胁迫筛选下分

化的绿苗产量。结果表明, EMS处理离体小孢子和 ^{60}Co γ -射线辐照干种子的愈伤组织产量和绿苗产量明显优于平阳霉素处理小孢子和 ^{60}Co γ -射线辐照离体穗的。以16份源于种子辐照处理的再生植株自交一代种子为供试材料, 比较了在0.5% NaCl胁迫下种子的发芽率和幼苗的成活率以及植株的分蘖数、株高和单株产量。结果表明, 原始品种‘花30’的发芽率为0, 而供试的16份耐盐变异体中, 有14份材料在NaCl胁迫下的发芽率优于‘花30’, 鉴定出4份耐盐性明显优于‘花30’的变异体材料。

以EMS处理大麦品种‘花30’的游离小孢子, 小孢子经过低氮胁迫培养获得再生植株, 再生植株自交后获得加倍单倍体(DH)株系, 在正常施肥和低氮胁迫两种施肥条件下对DH株系进行鉴定, 选择株高、单株有效穗和单株产量3个农艺性状作为鉴定指标, 并与原始亲本‘花30’进行比较。结果表明: 在大田正常施肥和低氮胁迫条件下, DH株系中株高、有效穗和单株产量3个性状出现了明显的正向变异, 在低氮胁迫下的表现更为明显。说明利用游离小孢子的EMS处理结合低氮胁迫筛选培养, 可以获取提高了耐低氮性的纯合变异体(陆瑞菊等2014)。

在应用小孢子培养技术选育大麦优良品种研究上, 我国科技工作者取得了领先的业绩。黄剑华等在国际上首次利用杂交结合小孢子盐胁迫培养的育种方法育成优良啤酒大麦品种‘花11’(黄剑华等2000b; 陆瑞菊等2002)。该品种在江苏、上海沿海地区大面积种植。它的耐盐性、抗逆性和丰产性均优于‘花30’。该品种与‘花30’均来自于同一杂交组合, ‘花30’是通过花药培养技术为核心的育种方法育成的, 一定程度上揭示了小孢子水平的培养更易于产生耐逆性、丰产性更好的再生植株(相关成果获2011年上海市科技进步一等奖)。

陈志伟等(2012)报道了大麦空间诱变与小孢子培养复合育种技术, 其主要特点为: 供试大麦品系的种子搭载卫星上天, 返回地面后种植于大田, 取其植株上花药中的小孢子(单倍体细胞), 进行高盐、低氮、缺水、病菌毒素等胁迫因子的离体培养, 存活小孢子携带了相应的抗性变异基因, 经进一步的生长发育, 筛选出携带抗性变异基因的胚

状体, 再经胁迫分化培养, 获得具相应抗性的再生苗, 通过染色体自然或人工加倍, 获得加倍单倍体纯合抗性再生植株, 自交一代经大田的高盐、低氮、缺水、病菌接种鉴定, 筛选出抗盐、耐低氮、抗旱、抗病能力明显提高的优异新种质, 通过进一步的综合农艺性状考察, 即可以在二年内获得耐盐、节肥、抗旱、抗病新品系。首次应用空间诱变与小孢子盐胁迫培养复合育种技术育成‘空诱啤酒1号’(沪农品认大麦2010第002号)和‘空诱啤酒2号’(沪农品认大麦2012第001号) 2份优良大麦新品种。

依据上述研究结果, 作物种子、小孢子经过诱变后, 其耐逆、抗病性会发生变异, 且这种变异能够传递给后代。小孢子水平的耐逆、抗病定向筛选, 可以提高抗性配子体的检出率, 经染色体加倍后, 所获的抗性基因可一次性纯合。

与花药胁迫培养筛选方法相比, 小孢子胁迫筛选方法的灵敏度更高, 更易筛选出抗性变异体, 经染色体加倍后, 抗性变异体的纯合率达100%; 与花药培养技术相比, 游离小孢子脱离了花药壁的保护, 直接置于离体培养环境, 诱导形成的胚状体和再生植株的抗逆性比花药培养的更强。

3 小结与展望

综上所述, 大麦花药培养技术主要应用于生产加倍单倍体株系, 加快优良性状的聚合以及构建DH作图群体, 提高重要性状的遗传控制分析效率; 而在小孢子培养上, 主要集中在技术优化研究上。依据基于植物细胞全能性科学原理的小孢子培养技术的特点和优势, 笔者所在实验室正在运用大麦小孢子培养技术, 构建DH作图群体, 研发单倍体诱变及胁迫筛选技术, 构建基于小孢子突变体的“近等基因系”, 探索基于小孢子培养的大麦单倍体转基因技术。以下对基于小孢子培养为核心的多项大麦遗传改良新技术进行简要阐述与展望。

3.1 基于小孢子培养的大麦加倍单倍体及作图群体构建技术

小孢子植株经染色体加倍成纯合双单倍体(DHs)后所有基因都已纯合固定, 理想的等位基因不会在以后的世代中由于分离而丢失, 可以避免杂种后代的严重分离, 从而加速性状重组过程, 缩短育种年限, 使各种隐性性状得以表现出来, 以致

可以在配子体水平上进行优良基因的筛选,极大地提高选择效率,尤其可以提高主效基因控制的质量性状和多基因控制的数量性状的选择效率。通过大田的一次性鉴定,即可选育出优良纯合株系。可以迅速聚合位于不同品种的抗性、丰产性优良基因,培育出抗性更强、丰产性更好的新品种。

杂交一代花药中含有大量的基因重组配子体(小孢子)。通过小孢子培养方法可以获得基因重组胚状体。通过染色体加倍,即可获得基因重组的纯合加倍单倍体分子永久作图群体。

DH群体与常规群体相比有以下优点:提高各种纯合基因型出现的频率,缩小试验规模。并且DH群体为永久性群体,可多年多点种植,有效减少环境误差,提高试验分析的准确性;DH群体在分子生物学上的应用最具优势的就是构建遗传连锁图及QTL分析,因为群体中每个个体在遗传上都是纯合的,非常适于连续性资料积累。

3.2 基于小孢子培养的大麦单倍体诱变及胁迫筛选技术

单倍体细胞仅含一组染色体,任何一种基因都不存在与其对应的等位基因,经诱变引发突变后,在培养过程中给予病毒素、营养、非生物逆境等胁迫处理,可以获得携带相应突变抗性基因的再生加倍单倍体(DHs)植株,所有基因一次性纯合,经过大田一次性筛选,即可获得理想的纯合株系。

3.3 基于小孢子培养的大麦转基因技术

由于小孢子细胞为单倍体细胞,可以发展成为转基因的理想受体。外源基因整合进入大麦染色体组后,经染色体加倍后不存在等位基因的干扰,且所有基因均一次纯合,所控性状的遗传稳定性好。另外,随着小孢子原生质体培养技术的突破,利用单倍体原生质体可直接吸收外源DNA。

3.4 基于小孢子培养的大麦单倍体细胞杂交技术

二个单倍体原生质体融合后,更易于存活和再生植株,可以发展成为多基因转移的新颖载体。不同类型的野生或栽培大麦均含有一些有价值的多基因控制性状,通过单倍体原生质体可以转到其他种或属植物的原生质体中去。也可以将其他植物中所含的多基因性状转到大麦单倍体原生质体中。

3.5 基于小孢子培养的大麦分子标记辅助育种技术

利用小孢子培养形成的DH作图群体和纯合突变体,易于筛选到与重要农艺性状连锁的分子标记。运用分子标记辅助选择和小孢子培养相结合的方法,不仅可使目的基因快速聚合,并且可使与分子标记连锁的目标性状易于选择和稳定遗传。

3.6 基于小孢子培养的大麦“近等基因”系构建技术

由于小孢子突变体和亲本类似于近等基因系,只有一个或主效基因的差别,与原始亲本相比,遗传背景相似而仅有目标性状差异。利用小孢子突变体,通过从形态、生理生化及分子水平上对变异机制进行研究,可以加深对大麦重要性状的生理、遗传控制机理的认识;同时,揭示一些谷类作物重要农艺性状分子调控的可能机制;也能够为进一步获取大麦重要性状的分子标记及自主知识产权的重要新基因奠定基础。

参考文献

- 陈志伟,陆瑞菊,黄剑华(2012). 大麦空间诱变与小孢子培养复合育种技术及应用. 上海农业学报, 28 (4): 160
- 杜永芹,陈如梅,张国荣,黄培忠,马俊虎,李承道(1996). 花药培养技术在杂交大麦三系选育中的应用. 上海农业学报, 12 (2): 10~12
- 华为,尚毅,贾巧君,汪军妹,朱靖环,林峰,顾玉坤,杨建明(2013). 大麦花药快速培养法及不同基因型对花药培养的影响. 浙江农业学报, 25 (3): 425~430
- 黄剑华,何南扬,陆瑞菊,王亦菲,孙月芳,龚来庭,周润梅(2000a). 大麦加倍单倍体技术与新品种选育. 农业生物技术学报, 8 (增): 6~10
- 黄剑华,陆瑞菊,孙月芳,周润梅(1998). 大麦高效双单倍体技术与品种改良. 上海农业科技, (总11): 33, 48
- 黄剑华,陆瑞菊,孙月芳,周润梅,王亦菲(2000b). 早熟高产优质大麦花-30的选育. 中国农学通报, 16 (1): 41~42
- 黄剑华,陆瑞菊,王亦菲,孙月芳,周润梅(2001). 提高迟钝型大麦花培反应率的因素. 上海农业学报, 16 (4): 15~17
- 黄剑华,陆瑞菊,张玉华,孙月芳,颜昌敬(1991). 大麦花培育种的绿苗高效再生. 上海农业学报, 7 (3): 封二
- 黄剑华,陆瑞菊,张玉华,孙月芳,周润梅(1993). 大麦花药培养反应迟钝基因型的胚状体诱导和绿苗再生. 上海农业学报, 9 (4): 19~22
- 郎淑平,龚来庭,黄剑华(2006). 大麦新品种“花22”选育经过及特征特性. 大麦与谷类科学, (4): 18~19
- 李安生,黄如鑫,陈和,李鸣,陈健,吴春,陈晓静,张敬,方红曼(2000). 优质啤酒大麦新品种“单2”的育成及其特性. 农业生物技术学报, 8 (增): 5~7
- 陆瑞菊,陈志伟,何婷,王亦菲,杜志钊,高润红,邹磊,黄剑华,陈佩度(2011a). 大麦单倍体细胞水平与植株水平耐低氮性的关系. 麦类作物学报, 31 (2): 292~296

- 陆瑞菊, 陈志伟, 何婷, 王亦菲, 杜志钊, 高润红, 邹磊, 黄剑华, 陈佩度(2011b). 两份大麦品种单倍体细胞与植株水平耐盐性的关系. 核农学报, 25 (2): 226~230
- 陆瑞菊, 黄剑华, 何南扬, 龚来庭, 王亦菲, 孙月芳, 周润梅(2002). 应用小孢子离体培养技术培育大麦新品系. 麦类作物学报, 22 (4): 88~90
- 陆瑞菊, 刘成洪, 何婷, 陈志伟, 徐红卫, 杜志钊, 高润红, 王亦菲, 邹磊, 郭桂梅等(2014). 源于大麦小孢子诱变—氮胁迫培养的DH株系田间耐低氮性表现. 核农学报, 28 (3): 412~417
- 陆瑞菊, 徐红卫, 陈志伟, 何婷, 杜志钊, 高润红, 王亦菲, 邹磊, 郭桂梅, 卜姝明等(2012). 源于小孢子培养的大麦耐盐变异体获取. 植物生理学报, 48 (11): 1069~1078
- 栾海业, 吕超, 张新忠, 陈和, 陈健, 沈会权, 陶红, 乔海龙, 臧慧, 许如根(2014). 大麦苗期根系和茎叶性状的QTL定位分析. 华北农学报, 29 (1): 98~100
- 孙月芳, 陆瑞菊, 王亦菲, 周润梅, 黄剑华(2003). 大麦幼穗和油菜花蕾提取液对大麦花药培养反应的影响. 麦类作物学报, 23 (2): 19~22
- 孙月芳, 陆瑞菊, 王亦菲, 周润梅, 黄剑华(2005). 大麦花药离体诱变及铝胁迫下的培养反应. 核农学报, 19 (2): 95~98
- 王军, 周美学, 许如根, 吕超, 黄祖六(2007). 大麦耐湿性鉴定指标和评价方法研究. 中国农业科学, 40 (10): 2145~215
- 杨建明, 沈秋泉, 汪军妹, 朱靖环, 张国平, 陈和, 李安生(2003). 863大麦育种研究进展. 大麦科学, (2): 12~15
- 朱陆元(1994). 大麦单倍体遗传育种. 见: 余志隆, 黄培忠(主编). 大麦遗传与改良. 上海: 上海科学技术出版社, 590~637
- Bian M, Waters I, Broughton S, Zhang XQ, Zhou MX, Lance R, Sun DF, Li CD (2013). Development of gene-specific markers for acid soil/aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). Mol Breeding, 32 (1): 155~164
- Castillo AM, Nielsen NH, Jensen A, Vallés MP (2014). Effects of n-butanol on barley microspore embryogenesis. Plant Cell Tiss Organ Cult, 117 (3): 411~418
- Clapham D (1973). Haploid *Hordeum* plants from anthers *in vitro*. Z. Pflanzenzuecht, 69: 142~155
- Dletzmann E, Foroughi-Wehr B (1996). Combination of resistances to barley yellow mosaic virus and *Rhynchosporium secalis* by recurrent selection with repeated haploid steps. Plant Breeding, 115: 179~182
- Esteves P, Clermont I, Marchand S, Belzile F (2014). Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: II-exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism. Plant Cell Rep, 33 (6): 871~879
- Foroughi-Wehr B, Friedt W (1984). Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture. Theor Appl Genet, 67: 377~382
- Foroughi-Wehr B, Wenzel G (1990). Recurrent selection alternating with haploid steps—a rapid breeding procedure for combining agronomic traits in inbreeders. Theor Appl Genet, 80: 564~568
- Guasmi F, Elfalleh W, Hannachi H, Feres K, Touil L, Marzougui N, Triki T, Ferchichi A (2013). Influence of various physical parameters on anther culture of barley. J Plant Nutr, 36 (5): 836~847
- Guha S, Maheshwari SC (1964). *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature, 204: 497
- Kohler F, Wenzel G (1985). Regeneration of isolated barley microspores in conditioned media and trials to characterize the responsible factor. J Plant Physiol, 121 (2): 181~191
- Lu RJ, Wang YF, Sun YF, Shan LL, Chen PD, Huang JH (2008). Improvement of isolated microspore culture of barley (*Hordeum vulgare* L.): the effect of floret co-culture. Plant Cell Tiss Organ Cult, 93: 21~27
- Mayer M, Gland A, Ceccarelli S, Geiger HH (1995). Comparison of doubled haploid lines and F₂ bulks for the improvement of barley in the dry areas of North Syria. Plant Breeding, 114: 45~49
- Polok K, Szarhko I, Maluszynski M (1997). Barley mutant heterosis and fixation of 'F₁-performance' in doubled haploid lines. Plant Breeding, 116: 133~140
- Steffenson BJ, Jin Y, Rossnagel BG, Rasmussen JB, Kao K (1995). Genetics of multiple disease resistance in a doubled haploid population of barley. Plant Breeding, 114: 50~54
- Ye JM, Kao KN, Harvey BL, Rossnagel BG (1987). Screening salt-tolerant barley genotypes via F₁ anther culture in salt stress media. Theor Appl Genet, 74 (4): 426~429