

- Natl. Acad. Sci. USA*, **93**:765-769.
- [2] Ligterink W, Kroj, Zur Nieden U, et al., 1997, *Science*, **276**:2054-2057.
- [3] Hirt H., 1997, *Trends Plant Sci*, **2**:11-15.
- [4] Wilson C, Voronin V, Touraev A, et al., 1997, *Plant Cell*, **9**:849-857.
- [5] Zhang S, Du H, Klessig DF., 1998, *Plant Cell*, **10**:435-449.
- [6] Knetsch ML, Wang M, Snaar-Jagalska BE, et al., 1996, *Plant Cell*, **8**:1061-1067.
- [7] Shizoki K, Russel P., 1995, *EMBO J*, **14**:492-502.
- [8] Hare PD, Cress WA, Staden J Van, et al., 1997, *Plant Growth Regulation*, **23**:79-103.
- [9] Ghelis T, Jeannette E, Bardat F, et al., 2000, *FEBS Letters*, **474**:43-47.
- [10] Balboa-Zavala O, Dennis FG, 1977, *J Am Soc Hortic Sci*, **102**:633-637.
- [11] Black M, In: Addicott FT (ed) Absciscic acid.
- [12] Rajasekara K, Hein MB, Vasil IK, 1987, *Plant Physiol*, **84**:47-51.
- [13] Kiyose T, Nakajima M, Yamaguchi I, et al., 1992, *Biochem Physiol Pflanzen*, **188**:343-347.
- [14] Meurs C, Basra AS, Karssen CS, et al., 1992, *Plant Physiol*, **98**:1484-1493.
- [15] Galiba G, Tubersoa R, Kocsy G, et al., 1993, *Plant Breeding*, **110**:237-242.
- [16] Singh NK, Larosa PC, Handa AK, et al., 1987, *Natl. Proc. Acad. Sci. USA*, **84**:4108-4112.
- [17] Bartels D, Engelhardt K, Roncarati R, et al., 1991, *EMBO J*, **10**:1037-1043.
- [18] Levin DE, Errede B., 1995, *Curr Opin Cell Biol*, **7**:197-202.
- [19] Marshall CJ, 1995, *Cell*, **80**:179-185.
- [20] Bokemeyer D, Sorokin A, Du M., 1996, *Kidney Int*, **49**:1187-1198.
- [21] Ruderman JV, 1993, *Curr Opin Cell Biol*, **5**:207-213.
- [22] Wang M, Oppedijk BJ, Lu X, et al., 1996, *Plant Mol Biol*, **32**:1125-1134.
- [23] Gilroy S, Fricker MD, Read ND, et al., 1991, *Plant Cell*, **3**:333-344.
- [24] Gehring CA, Irving HR, Parish RW, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:9645-9649.
- [25] Vander VR, Heimovaara DS, Wang M, 1997, *Biophys J*, **72**:A336.
- [26] Hedrich R, Marten I, Lohse G, et al., 1994, *Plant J*, **6**:741-748.
- [27] Neill SJ, Hey SJ, Barrrt DHP, 1993, *J Exp Bott*, **44**:supp13.
- [28] Allan AC, Fricker MD, Ward JL, et al., 1994, *Plant Cell*, **6**:1319-1328.
- [29] Cutler S, Ghassemian M, Bonetta D, et al., 1996, *Science*, **273**:1239-1241.
- [30] Shinozaki K, Yamaguchi SK., 1997, *Plant Physiol*, **115**:327-334.
- [31] Leung J, Merlot S, Giraudat J., 1997, *Plant Cell*, **9**:759-771.
- [32] Heimovaara-Dijkstra S, Nieland TJF, Van der Meulen RM, et al., 1996, *Plant Grow Regu*, **18**:115-123.
- [33] Esser JE, Liao YJ, Schroeder JI., 1997, *J Exp Bot*, **48**:539-550.
- [34] York RD, Yao H, Dillon T, et al., 1998, *Nature*, **392**:622-626.
- [35] Hughes PE, Renshaw MW, Pfaff M, et al., 1997, *Cell*, **88**:521-530.
- [36] Wang M, Sedee NJA, Heidekamp F, et al., 1993, *FEBS Lett*, **329**:245-248.
- [37] Jacoben JV, Beach LR., 1985, *Nature*, **316**:275-277.
- [38] Wang M, Oppedijk BJ, Caspers MPM, et al., 1998, *J. Exp Bot*, **49**:1293-1301.
- [39] Leung J, Bouvier-Durand M, Morri PC, et al., 1994, *Science*, **264**:1448-1452.
- [40] Meyer K, Leube MP, Gill E., 1994, *Science*, **263**:1452-1455.
- [41] Hagenbeek D, Rock CD, Quatrano RS., 2000, *Plant physiology*, **123**:1553-1560.
- [42] Schmidt W, Schikora A, Tittel J., 2000, *Plant physiology*, **122**:1109-1118.
- [43] Bertauche N, Leung J, Giraudat J., 1996, *Eur J Biochem*, **341**:193-200.
- [44] Meskiene I, Bogre L, Glaser W, et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**:1938-1943.
- [45] Koornneef M, Leon-Koosterziel KM, Schwartz SH, et al., 1998, *Plant Physiol Biochem*, **36**:83-89.
- [46] Schmidt C, Schelle I, Liao YJ, et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**:9535-9539.
- [47] Hey JH, Bacon A, Burnett E, et al., 1997, *Planta*, **202**:115-123.
- [48] Pei ZM, Kuchitsu K, Ward JM, et al., 1997, *Plant Cell*, **9**:409-423.
- [49] Heimovaara-Dijkstra S, Mundy J, Wang M., 1995, *Plant Mol Biol*, **27**:815-820.
- [50] Zhao Z, Tan Z, Wright JH, et al., 1995, *J Biol Chem*, **270**:11765-11769.
- [51] Xu Q, Fu HH, Gupta R, et al., 1998, *Plant Cell*, **10**:849-857.
- [52] Herskowitz I, 1995, *Cell*, **80**:187-197.
- [53] Lorenzo O, Nicolas G, Rodriguez PL, et al., 2001, *Plant Physiology*, **125**:1949-1956.

核果类果树原生质体培养研究进展

吴延军*,** 张上隆* 徐昌杰* 张岚岚*

(* 浙江大学华家池校区园艺系 杭州 310029 ** 安徽农业大学园艺系 合肥 230036)

从 20 世纪 70 年代初首次从烟草原生质体成功地培养出再生植株以来, 至今已有 250 多种高等植物的原生质体培养获得成功。原生质体是“裸露”的植物细胞, 具有全能性, 能在适应的培养条件下诱导再生植株。同时, 由于没有细胞壁的障碍, 原生质体

能够直接高效地摄取外源 DNA 或遗传物质、各种细胞器甚至细胞核; 又可以与异种原生质体经诱导融合而形成体细胞杂种。这些特性不仅大大提高了育种效益, 而且使亲缘关系较远、常规育种不可能进行的许多杂交组合成为可能。

果树多为多年生木本植物,童期长、遗传上高度杂合,这使得传统的果树育种成效受到了很大的限制。原生质体培养的以上优点无疑给果树育种带来新的机遇。经过20多年来的发展,人们进一步认识到原生质体技术对杂合性果树育种具有的优越性和应用潜力。园艺学上的核果类果树是指植物分类学上蔷薇科桃李亚科 Drupaceae (Prunoideae) 桃李属 (*Prunus* Linn) 果实为核果的一类果树,包括桃、杏、李、扁桃、樱桃等,是我国落叶果树的重要种类。因此果树原生质体培养在近年来获得了较为迅速的发展。相对于以柑桔为代表的柑果类果树和以苹果、

梨等为代表的仁果类果树,核果类果树原生质体研究中成功的例证不多,本文综述核果类果树原生质体培养方面的研究进展及有关问题。

一、材料来源及预处理

原生质体的材料来源非常丰富,从理论上说,一切植物活细胞均可以用作原生质体的来源。从核果类果树原生质体分离的例子看,选择分离原生质体的材料是原生质体培养成功与否的重要限制因子之一,其中主要包括选择材料的基因型(种或品种特性)、材料的类型2个方面(如表1所示)。

表1 核果类果树原生质体制备的材料来源

树 种	基 因 型	材 料 来 源	参 考 文 献
桃	不详	悬浮细胞(叶愈伤组织起源)	Matsuta 等,1983 ^[26]
	不详	子叶	Matsuta, 1983 ^[26]
	不详	叶肉	Matsuta 等,1983 ^[26]
	Hakuho	悬浮细胞	Matsuta 等,1986 ^[5]
	砂子早生	胚性愈伤组织	甘霖等,1993 ^[9]
	May fair	叶肉	Chiariotti, 1991 ^[7]
	不详	叶肉	Mills 等,1994 ^[4]
	不详	胚性愈伤组织	Ganlin 等,1996 ^[17]
	甜樱桃	愈伤组织(起源不详)	Raff 等,1980 ^[27]
	樱桃杂种	叶肉	James 等,1982,1984 ^[28,29]
樱桃	樱桃杂种	愈伤组织(茎、叶起源)	Ochatt 等,1987,1988 ^[1,16]
	Colt 樱桃	叶肉	James 等,1982,1984 ^[28,29]
	樱桃杂种	悬浮细胞(根愈伤组织起源)	Ochatt 等,1987 ^[16]
	Colt 樱桃	悬浮细胞系	Ochatt 等,1987 ^[30]
	CAB 5H	叶肉	Ochatt 等,1988 ^[1]
	CAB 4D	根愈伤组织	Ochatt 等,1988 ^[1]
	Pontavium	叶肉	Ochatt 等,1990 ^[23]
	Early Rivers	叶肉	Ochatt 等,1991 ^[12]
	Van2D	叶肉	Ochatt 等,1991 ^[12]
	不详	悬浮细胞(茎愈伤组织起源)	Ochatt 等,1991 ^[12]
扁桃	MN51	叶肉、悬浮细胞	Wu, 1985 ^[20]
李	欧洲李	中果皮	Chiariotti, 1991 ^[7]
	P2980、P51	叶肉	Weinbaum 等,1979 ^[31]
	晚红李	悬浮培养物	Ochatt 等,1992 ^[30]
		无菌苗叶片	马锋旺等,1998 ^[2]
杏		种胚愈伤组织	
	San Castrese	叶肉	Marino-G 等,1991 ^[10]
	Thyrintos	叶肉、悬浮细胞	Chiariotti, 1991 ^[7]
	山杏	悬浮培养物	马锋旺等,1998 ^[3]
		无菌苗叶片	
		种胚愈伤组织	

基因型不同对原生质体的游离培养及再生成株具有很大的影响。同为核果类果树,樱桃原生质体培养成植株例证较多,而桃树原生质体至今尚未能再生植株。这一遗传性的差异也表现在同一树种的不同品种内,如 Ochatt 等研究酸樱桃 CAB 4D、CAB 5H 和 CAB 11E 三品种,CAB 4D 和 CAB 5H 可以成苗,而 CAB 11E 却未能成苗^[1]。

迄今为止,核果类果树已从大田植株,温室植株和试管植株的各种器官、组织以及愈伤组织、悬浮细胞中分离得到原生质体。试管苗生长的条件较大田易于控制,有叶片生长状况受季节影响小,本身无菌、使用方便、相对幼龄、材料来源量大等特点,已为大多数的人所采用。原生质体培养使用最多的材料类型是叶肉、愈伤组织和悬浮培养物。桃、樱桃、杏、

李等均可以用叶肉分离出原生质体,其中樱桃、杏、李均可由此类原生质体再生成植株。分离核果类果树的叶肉原生质体,通常是直接将叶片切碎后,投入酶液中处理,这种方法简单,并有可能获得大量的质量较一致的原生质体。

悬浮培养物作为原生质体的来源具有得率高、活性大、分裂能力强等优点,但稳定悬浮培养系的建立须经过多次继代培养。原生质体分离期间酶解液会对细胞膜产生伤害作用,而悬浮培养物可能易承受酶的作用,具有分离处理后增殖性较强的特性。Ochatt 等在 Colt 樱桃上利用细胞悬浮系分离的原生质体培养再生植株获得了成功^[1]。中国李^[2]、山杏^[3]的无菌苗叶片、种胚愈伤组织和悬浮培养物三种材料类型为起始材料,以悬浮培养物的原生质体得率和活力最高。

除以上两主要因素外,为了获得得率高、存活力强的原生质体,还必须在试验目的的基础上考虑材料的组织和细胞生理条件。桃叶片较小时(长度在 4–10mm 之间)是最好的原生质体分离材料,如果叶片增大至中等或最大(22–30mm 长),分离效果明显下降^[4];从桃树叶片愈伤组织来源的悬浮细胞中分离原生质体,5 天龄的悬浮细胞获得的原生质体得率较高,而从 7 天龄的材料分离的原生质体细胞分裂更旺盛^[5]。

一些研究还对分离原生质体的材料作了预处理。野樱桃快速生长的悬浮细胞先用半胱氨酸预处理后再酶解,原生质体用细胞琼脂糖包埋法(semisolid agarose lenses in liquid medium)培养,10 天后原生质体再生细胞第一次分裂,后转入固体培养基中诱导形态分化^[6]。

二、原生质体分离和培养

酶是果树原生质体分离中重要的物质。用于果树原生质体分离的酶主要是果胶酶和纤维素酶。前者作用于细胞间隙的果胶质,使细胞相互分开;后者直接作用于细胞壁,使细胞壁分解释放原生质体。有时为了增强以上两种酶的作用,还加入了半纤维素酶、离析酶和崩溃酶。Chiariotti 使用 25 种酶组合均可从杏、桃、扁桃的 4 个品种的叶肉细胞中得到原生质体,但 25 种酶组合中只有 8 种可以从扁桃 MN51T 和杏 Thyrintos 的悬浮细胞中分离得到原生质体^[7]。首例甜樱桃和酸樱桃叶肉原生质体分离中使用了 1.0% 的纤维素酶 Onozuka R-10,1.0% 的半纤维素酶和 0.1% 的果胶酶 Y-23,并认为一般

木本植物原生质体分离需要这三种酶组合^[8]。中国李以 10g/L 纤维素酶 Onozuka R-10 + 5g/L Macerozyme R-10 酶解时具有活力的原生质体得率最高^[2]。在酶解液中加入 10g/L 半纤维素酶明显提高了原生质体得率。在杏的酶解液中加入半纤维素酶也可以明显提高原生质体得率^[3]。Mills 等比较不同的酶组合对桃叶片原生质体分离的影响发现在几种酶组合中以纤维素酶 Onozuka R-10(2%) + Macerace(0.5%)组合的分离效果最好,原生质体活力达到 90%,而使用 Pectolyase Y-23 分离效果不好^[4]。桃胚性愈伤组织用 0.5% 纤维素酶(Onozuka R-10) + 0.75% pectinase (polygalacturonase)酶液组成的酶解得率最高^[9]。由此可见即使是从同种果树取同类材料也可能因果树品种、品系以至细胞系的不同,而对同样的酶有不同的反应。因此不同的材料应通过试验确定适宜的酶液类型及组成。

稳压剂是与酶同等重要的原生质体分离物质,它具有保持原生质体状态的作用。这种物质必须与酶液一起加入,以防原生质体破裂。不同类型的渗透压调节剂在原生质体分离时并无显著影响,糖、糖醇、盐类或有机物均可以作为稳压剂。糖醇是理想的稳压剂,常用的糖醇有甘露糖醇和山梨糖醇,在核果类果树原生质体分离中一般用甘露糖醇作为稳压剂^[10]。马锋旺分离李原生质体发现酶解液中低浓度的甘露糖醇(0.3–0.4mol/L)分离的原生质体因过分吸胀而易破裂,高浓度(0.8mol/L)时原生质体有所收缩、活力下降,而 0.5–0.7mol/L 的甘露糖醇分离的原生质体形态完整饱满^[2]。杏原生质体的分离适宜的渗透压为用 0.6mol/L 甘露糖醇^[3]。

酶解液中加入适合的物质有利于原生质体的分离^[11]。如许多研究都在分离酶液中加入聚乙炔吡咯烷酮(PVP),其具有吸附酚类物质、阻碍酶解期间原生质体褐变老化的作用。在山杏原生质体酶解液中加入不同浓度的 PVP 结果表明其对原生质体的分离有明显影响,浓度以 1% 的效果最好。在甜樱桃嫁接苗 Early River、Van 2D 和自根苗 Pontavium 8574V813 苗叶肉原生质体酶解液中加入 PVP-10(1% w/v)可显著提高有活力原生质体的得率^[12]。在杏和中国李种胚愈伤组织的酶解液中加入不同浓度的 PVP 对提高原生质体得率、活力和分裂能力也具有显著的效果^[13]。但是在桃悬浮细胞分离原生质体的酶解液中加入 Ca^{2+} 则抑制原生质体的分离^[14]。

液体浅层培养是果树原生质体培养的主要方

法,具有操作简单、便于添加培养基且通气性好等优点^[15]。在固体培养中,一些研究认为低熔点琼脂糖可减少对原生质体的损伤,其效果比琼脂更好^[16]。液体浅层培养与 LEP(低熔点琼脂糖包埋)培养相比,后者细胞分裂速度快,较适合于桃的原生质体培养^[17]。

原生质体的接种密度影响培养效果。接种密度过大,原生质体再生细胞团小,影响生长;密度过小,原生质体内含物外渗。中国李原生质体培养在 0.5×10^5 个/L 的密度下方可启动细胞分裂,以 2×10^5 个/L 的密度细胞分裂频率和植板率最高。随着密度的增大,褐化现象逐渐加重,细胞分裂频率逐渐下降^[2]。山杏植板率达到 8.0×10^5 个/L 时原生质体不能发生细胞分裂。因此,要根据不同材料通过试验选用不同的接种密度^[3]。

MS 基本培养基稍加修改即能适合于核果类果树原生质体的培养,但其中高浓度的 NH_4^+ 易对原生质体产生毒害。在去掉 NH_4^+ , 添加 50mg/L CHR 的培养基中,原生质体就可形成细胞团。例如 Ochatt 等发现硝酸铵阻碍樱桃杂种和酸樱桃的叶肉原生质体细胞分裂。在这种情况下,要排除培养基中的硝态氮,可用酪朊水解物或者氨基酸等有机氮化合物来代替。 NH_4^+ 浓度对原生质体培养的影响只发生在再生细胞的起始阶段,对持续分裂能力影响较小,而且细胞团的形成过程中还可能需要一定浓度的 NH_4^+ 。除了 MS 培养基外也有许多研究使用了 K8P^[12,18]、MT^[19] 等培养基。

不同的渗透压调节剂和碳源对原生质体的发育有一定的影响。多数植物原生质体培养时用甘露糖醇作为渗透压调节剂和碳源。在降压条件下中国李对渗透压调节剂种类要求不严,在不降压条件下中国李以葡萄糖调节渗透压比较适宜^[2]。山杏原生质体培养以 0.55mol/L 山梨醇作渗透压调节剂,在培养过程中进行降压处理为宜^[3]。Ochatt 培养甜樱桃和酸樱桃时使用了 9% (约 0.5mol/L) 甘露糖醇为渗透压调节剂^[1]。

一般原生质体进行细胞分裂需要生长素和细胞分裂素的刺激。生长调节剂的种类和浓度因果树的种类和细胞类型不同而异。在核果类果树中常用到的生长素有 NAA、2,4-D、IAA 等,细胞分裂素有 BA、ZT、KT 等。有时将 1 种生长素与 2 种细胞分裂素,或者 2 种生长素与 1 种细胞分裂素配合使用。酸樱桃原生质体进行细胞分裂需要玉米素^[1],然而桃原生质体培养可以不添加任何生长激素,但需添

加麦芽提取物(ME)、椰乳(CM)等成分^[9]。多胺类物质的应用可以促进扁桃的原生质体进行细胞分裂^[20]。培养基中加入不同浓度的甘氨酸和抗坏血酸可提高中国李原生质体培养细胞的分裂率和植板率^[2]。加入甘氨酸和/或 PVP-10 明显降低原生质体褐变^[12]。培养基中加入水解酪蛋白和/或谷氨酸有利于桃原生质体的培养^[14]。

目前,还没有系统地进行过关于温度、光照、通气等环境条件对原生质体细胞分裂和生长影响的研究。一般将原生质体放在 25-28℃ 下进行黑暗或弱光照培养。如 Marino 将杏原生质体培养在弱光下^[21]。桃原生质体在暗中培养效果比光下培养好^[17]。

三、原生质体培养再生植株

尽管不少的核果类果树的原生质体在培养中能再生细胞壁,形成细胞团,但至今其原生质体能分化成植株的例子还不多,即使是与同为蔷薇科果树的苹果、梨相比其培养成植株的例子也很少。到目前为止,所有已获得原生质体培养再生植株的核果类果树均是经过诱导愈伤组织器官发生途径,原生质体在培养过程中形成的细胞团经转到增殖培养基上形成愈伤组织后,如何从愈伤组织诱导不定芽成了关键问题。只有樱桃的两个品种(CAB 5H 和 CAB 4D)是先诱导出不定根,然后再诱导出不定芽(在整个落叶果树中也惟此两例)。其他树种则先分化不定芽,然后从不定芽诱导不定根。对 Colt 樱桃的悬浮细胞原生质体用电脉冲处理,促进了细胞分裂和植株分化,再生植物生根率也明显提高^[22]。培养基中添加不同浓度的有机物可以提高再生率且再生类型不同,如单独添加水解酪蛋白促进根形成,由诱导出的不定根再诱导不定芽;在基本培养基中同时添加水解酪蛋白和维生素 B 则诱导直接分化茎状结构^[23]。原生质体经过愈伤组织成芽后与易生根的甜樱桃共培养则可以成功生根。这是首次从原生质体获得的甜樱桃顽拗型(recalcitrant species)植株^[12]。

核果类果树原生质体与同科(蔷薇科)但不同属的植物进行体细胞杂交,也可以获得再生植株。如:Ochatt 等将野生梨砧木品种(*Pyrus communis* var. *pyraster* L.) 叶肉原生质体和樱桃杂种砧木(*Prunus avium* × *pseudocerasus*) 品种(Colt)的悬浮细胞系原生质体经电激融合,原生质体培养在改良的 K8P 培养基上形成了愈伤组织,此愈伤组织在加

入玉米素的 MS 培养基上获得了属间体细胞杂种植株^[19]。杂种后代用形态特性、染色体数目、同工酶分析法进行了鉴定。这是首次获得的两个有性杂交不亲和的蔷薇科的属间体细胞杂种,也是两落叶果树原生质体融合、两木本植物原生质体融合成功的首例报道。Mottley 等 1995 年、1996 年报道了 frencham(玫瑰杂交种)愈伤组织来源的原生质体和来自 Colt 樱桃(欧洲甜樱桃与中国樱桃杂交种)的原生质体用聚乙二醇(PEG)诱导融合,获得了体细胞杂种植株。体细胞杂种再生植株后代用形态特性、染色体数目分析和 RAPD 法进行了鉴定^[24]。

四、结束语

核果类果树原生质体培养进展较为缓慢,虽然在樱桃、杏、李等核果类果树原生质体培养上取得了再生植株,但桃树的原生质体培养仍处在获得原生质体或由此原生质体培养得到愈伤组织的阶段。即使在成功的树种中,基因型和原生质体的来源也受到限制。在今后的研究中,应加强扩大核果类果树树种及筛选在目前条件下能适合原生质体培养的基因型研究;总结已取得的经验,扩大研究各种来源的原生质体分离培养条件,尤其是要加大和深入研究桃树原生质体培养。

原生质体系统是研究植物生理和遗传的优良体系之一。尤其是随基因操作技术的发展,原生质体系统在遗传物质转化中的作用日益明显。它是优良的转化受体系统。此受体系统不仅在禾本科植物中广泛使用,在果树界也有成功事例,如 Nyman 等采用电激法将带有 β -葡萄糖苷酸酶标记基因(GUS)的质粒 DNA 导入草莓叶肉和叶柄原生质体,再生出了转基因植株^[25]。由此可以预见,利用原生质体作为转化受体系统转移报告基因最终转化目的基因并获得再生植株在核果类果树树种上有很大的潜力。

摘 要

本文主要介绍了核果类果树原生质体培养的材料来源、分离培养、植株再生,简要介绍了其杂交和遗传转化,并对以后的工作进行讨论。

参 考 文 献

[1] Ochatt S., et al., 1998, *Plant Science Irish Republic*, 55 (1):75-79.

- [2] 马锋旺等,1999,西北农业大学学报,27(3):61-65.
 [3] 马锋旺等,1998,园艺学报,25(3):224-229.
 [4] Mills D., et al., 1994, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 36:1,99-105.
 [5] Matsuta N., et al., 1986, *Scientia Horticulturae*, 28:1/2, 59-64.
 [6] David H., et al., 1991, *Physiologia-Plantarum*, 82:1, A15; also Eighth international protoplast symposium.
 [7] Chiariotti-A., et al., 1991, *Physiologia-Plantarum*, 82:1, A16; also Eighth international protoplast symposium.
 [8] Revilla M., et al., 1987, *Plant-Science, -Irish-Republic*, 50:2,133-137.
 [9] 甘霖等,1994,植物生理学通讯,191-192.
 [10] 奚元龄等编译. 1992,植物细胞培养手册,第一版,农业出版社,602-625.
 [11] 潘增光等,1997,山东农业大学学报,28(2):215-220.
 [12] Ochatt-SJ., 1991, *Physiologia-Plantarum*, 82:1, A15; also Eighth international protoplast symposium.
 [13] 马锋旺等,1998,西北农业大学学报,26(6):10-13.
 [14] Matsuta-N., 1992, *Bulletin-of-the-Fruit-Tree-Research-Station*, NO.22, 59-66.
 [15] 陈振光等,1990,福建农学院学报,19(1):102-113.
 [16] Ochatt S.J., et al., 1987, *Plant Sci.*, 50:139-143.
 [17] Gan L., 1996, *Acta-Horticulturae*, NO. 374, 185-189.
 [18] Janeckova M., et al., 1993, *Zahradnictvi*, 20(3):163-167.
 [19] Ochatt S.J., et al., 1989, *Theoretical-and-Applied-Genetics*, 78:1,35-41.
 [20] Wu S. C and Kuniyuki A. H, 1985, *Plant Sci.*, 41:55-60.
 [21] Marino G., 1991, *Acta Horticulturae*, 293:391-394.
 [22] Ochatt S.J., et al., 1988, *Plant-Cell-Reports*, 7(6):393-395.
 [23] Ochatt S.J., 1990, *Plant-Cell-Reports*, 9(5):268-271.
 [24] Mottley J., et al., 1995, Second international symposium on roses, Antibes, France, 20-24 February. 1996. *Acta-Horticulturae*, No. 424:393-397.
 [25] Nyman M., Wallin A., 1992, *Plant Cell Reports*, 11:105-108.
 [26] Matsuta N., et al., 1983, *Jpn. J. Breed* 33 (Suppl. 1): 202-203 (in Japanese).
 [27] Raff J., et al., 1980, *Z. Pflanzenphysiol*, 98:225-234.
 [28] James D. J. et al., 1981, *Rep. E. Malling Res. Srm.*, 162-163.
 [29] Organogenesis. James D J and Jones O P. 1983, *Rep. E. Malling Res. Stn*, 61-62.
 [30] Ochatt S.J., et al., 1992, *Theor. Appl. Genet*, 83:1013-1018.
 [31] Weinbaum S. A., et al., 1979, *J. Am. Soc Hort Sci*, 104: 278-280.