

植物原生质体培养

孙勇如 安锡培 主编

科学出版社

内 容 简 介

本书对植物原生质体有关的各研究领域,如基础理论、体细胞杂交、遗传转化、细胞器转移等作了全面的阐述和评价;展望了原生质体再生体系在作物改良中的应用前景;对各类作物原生质体培养研究的国内外现状作了评述,并介绍了17种不同作物原生质体培养和植株再生的技术关键。

本书可供生物学、生物工程学、农学方面的科技人员,以及大专院校师生参考。

植物原生质体培养

孙勇如、安锡培 主编

责任编辑 刘 安

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100707

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1991年7月第 一 版 开本: 787×1092 1/16
1991年7月第一次印刷 印张: 13 插页: 4
印数: 0001—2 200 字数: 298 000

ISBN 7-03-002258-0/Q · 305

定价: 13.10 元

序

植物原生质体再生植株的技术是生物工程或植物遗传工程的关键环节之一。虽然有关双子叶植物原生质体的再生已有许多报道,但是人类赖以生存的谷类作物的原生质体再生,是多年来国际公认的难题。我国科学工作者自1986年起相继将水稻、玉米、小麦、谷子、高粱、大麦等重要粮食作物的原生质体培养成完整植株,取得了重大突破。为了全面总结这些成果并推动该领域的深入研究,从事原生质体再生植株研究工作的专家们决定编写《植物原生质体培养》一书,对此我是非常支持的。

本书涉及的内容既反映了植物原生质体研究领域的全面概况,也详述了我国科学工作者在该领域的重要成就。

我还要顺便指出,近几年来中国遗传学会组织和参与了七册图书的编辑工作(如《孟德尔逝世一百周年纪念文集》、《中国的遗传学研究》、《遗传学手册》等),作为一个学术团体,为推动我国遗传学的发展作了大量的工作。

我衷心希望《植物原生质体培养》一书的出版将有助于推动原生质体研究与应用的进一步发展,为促进新技术在植物育种工作中的应用做出贡献。

鲍文奎

目 录

序

第一章 概论	1
第一节 高等植物原生质体研究与作物改良	1
第二节 植物原生质体的理论研究	7
第三节 植物遗传工程的理想受体	12
第四节 植物原生质体融合与体细胞杂交	22
第五节 原生质体用于细胞器的分离与转移	29
第六节 花粉原生质体研究	35
第七节 植物原生质体的超低温保存研究	41
第二章 原生质体培养的基本技术	47
第一节 培养所需的设备与用具	47
第二节 培养所需的化学试剂	49
第三节 原生质体的分离与纯化	52
第四节 植物原生质体培养的培养基和培养方法	57
第三章 各类植物原生质体培养的国内外现状	65
第一节 禾本科	65
第二节 豆科	72
第三节 茄科	85
第四节 蔬菜	91
第五节 药用植物	107
第六节 木本植物	116
第七节 食用菌	123
第四章 各种栽培植物的原生质体培养与植株再生	129
第一节 梗稻	129
第二节 籼稻	137
第三节 玉米	139
第四节 小麦	144
第五节 小偃麦	146
第六节 谷子	150
第七节 大麦	153
第八节 高粱	156
第九节 棉花	160
第十节 大豆	163
第十一节 油菜	167
第十二节 马铃薯	172
第十三节 茄子	178

第十四节	芹菜	182
第十五节	哈密瓜	186
第十六节	猕猴桃	190
第十七节	柑桔	194

第一章 概 论

第一节 高等植物原生质体研究与作物改良

植物原生质体 (protoplast) 一词始自 Hanstein (1880), 即指“通过质壁分离, 能够与细胞壁分开的那部分细胞物质”。换言之原生质体就是除去全部细胞壁的“细胞”, 或是一个为原生质膜所包围的“裸露细胞”。植物原生质体由于失去细胞壁, 可作为基础研究和作物改良的理想材料。

在基础研究方面, 原生质体可作为一个单细胞系统来研究细胞壁再生、细胞膜的离子转运, 以及病毒侵染机理等课题。由于原生质体只由细胞膜包裹, 所以可在温和条件下破碎细胞膜, 从而获得大量完整的细胞器及大分子。原生质体的超低温保存也可用来研究细胞低温生物学领域的低温伤害、细胞内结冰等问题。

在作物改良上, 常规育种是至今还起着重要作用, 或者说今后还将不断起作用的方法, 但常规育种有一定的局限性。由于原生质体能通过酶法大量分离得到, 以及原生质体再生植株的培养成功, 使原生质体融合(或称体细胞杂交)应运而生。目前已有成功的实验证明, 通过原生质体融合后再生的杂种植株, 可能克服不亲和性或子代不育等常规远缘杂交所难以克服的障碍。也有实验说明, 通过体细胞杂交能转移作物杂交育种上十分有价值的细胞质雄性不育基因。这些都给农作物的改良带来了新的方法和希望。原生质体也是作为遗传转化研究的一个理想的受体, 它能直接摄取外源 DNA、细胞器甚至微生物。这就可能有目的地引入特定的有用基因, 来改良农作物的产量与质量。原生质体培养过程中, 与其他组织培养一样, 有可能产生体细胞无性系变异。得到的变异体将可能成为作物改良上重要的遗传资源, 并可从中选择到优良性状的变异体应用于生产。单倍体原生质体对变异体的筛选与诱发将更为有用。此外, 原生质体的超低温保存对于具有优良性状的种质资源的保存也是有价值的。

原生质体用于基础研究, 特别是用于作物改良的一个基本条件是: 首先能获得大量成活的原生质体, 并能再生成细胞, 直至再生成完整而可育的植株。自从 Takebe 等 (1971) 首次利用烟草叶片分离原生质体, 并获得再生植株以来, 原生质体的培养在近几年内取得了突飞猛进的进展。一些作物, 例如大豆 (Wei 和 Xu, 1988)、棉花 (陈志贤等, 1989)、油菜 (Spangenberg 等, 1986) 等重要经济作物已成功地从原生质体再生成植株, 特别是一直认为难以培养的禾谷类, 如水稻 (Fujimura 等, 1985; Wang 等, 1989)、玉米 (蔡起贵等, 1987; Rhodes 等, 1988; Sun 等, 1989; Zhang 等, 1990)、小麦 (Harris 等, 1988; 王海波等, 1989)、谷子 (董晋江、夏镇澳, 1989), 以及高粱的原生质体培养都已相继突破。木本植物成功的例子也逐渐增多, 如猕猴桃 (Tsai, C. K., 1988)、柑桔 (Vardi 等, 1982)、杨树 (Russell 和 McCown, 1988)、云杉 (Attree 等, 1989) 等。药用植物与真菌原生质体培养的进展也十分迅速。以上的成就, 为利用原生质体的遗传操作改良农作物打下了坚实的基础。

总结禾本科植物与某些木本植物原生质体培养成功的经验,有以下三个方面是有共性的关键:即选择合适的基因型、利用胚性悬浮细胞或愈伤组织作为分离原生质体的材料,以及在适宜的培养条件下培养。

原生质体的培养技术,近年来也有很大改进。特别值得提出的是单个原生质体培养再生植株的成功 (Spangenberg 等,1986)。利用这一技术,可以在单细胞的水平上研究不同类型原生质体的生理特性、相互之间的作用,以及单个原生质体的遗传操作。对不同亲本单个原生质体进行融合的研究也是有利的 (Schweiger 等,1987)。饲养层培养法可大大提高水稻 (Kyoizuka 等,1987)、玉米 (Rhodes 等,1988) 等作物原生质体的植板率。已有不少报道说明,琼脂糖能促进原生质体的分裂 (Shillito 等,1983),并有利于对原生质体生长过程的观察。原生质体在琼脂糖里被固定住,便于进行微注射的操作 (De Laat 和 Blaas,1987)及克隆单个原生质体或基因转化细胞等 (Holbrook 等,1985; Potrykus 等,1985)。流式细胞分离法大大有助于分离未融合的原生质体与融合的杂种细胞 (Afonso 等,1985)。最近发展起来的电融合与电转化方法是十分有效的。利用此方法已获得了许多有价值的融合杂种与基因转化的植株。

下面将分别介绍原生质体研究在作物改良工作中的应用。

一、原生质体融合

随着原生质体培养技术的不断完善,利用原生质体融合技术改良作物也取得了可喜的进展。数年前,科间原生质体融合得到体细胞杂种愈伤组织尚属不易 (Kao, 1977; Chien 等, 1982), 得到杂种植株就更为困难了。近年来不仅在茄科和芸苔属的一些典型植物的改良中成功地应用了此技术 (孙勇如, 1989), 过去很难培养成功的禾本科作物的原生质体融合已得到亚科间的体细胞杂种植株 (Terada 等, 1987)。禾本科和豆科植物原生质体融合后获得了杂种愈伤组织并由此分化出了不完整的小植株 (Niizeki 等, 1989)。以上实验说明, 几乎各种植物的农艺性状都有可能应用于改良栽培作物。有性杂交技术由于不亲和性的障碍, 使可利用的基因资源很有限。基因工程技术固然有很强的目的性, 但目前对于控制作物的许多重要农艺性状的多基因系统还无能为力。体细胞杂交技术虽然也有其随机性的缺陷, 但是由于可转移细胞核中的染色体组、染色体、染色体片段, 或者是细胞质中的叶绿体 DNA 及线粒体 DNA, 可利用的基因资源十分广泛。体细胞杂交配合常规育种技术, 就可期望选育到优良品种。

融合杂种中来自双亲的遗传物质并非是简单地堆积到一起, 而是发生了复杂的遗传重组, 这正是作物改良工作者所期望的。栽培种马铃薯往往受马铃薯卷叶病毒 (PLRV) 和马铃薯 Y 病毒 (PVY) 的侵染而大量减产, 而野生种 *Solanum brevidens* 对这两种病毒都具有抗性。这两种植物进行有性杂交是不亲和的。可是 Austin 等 (1985) 和 Gibson 等 (1988) 都已通过体细胞杂交的途径获得杂种。杂种植株能抗 PLRV 和 PVY。体细胞杂交还能产生新的重组类型。黄花烟和普通烟草均对由 *Pronospora tabacina* 所引起的青霉病敏感。而两个亲本的体细胞杂种后代中却有抗青霉病的新类型 (Pandeya 等, 1986)。此实验通过体细胞杂交将野生种的有利农艺性状引入了栽培种, 成为这一有效的育种途径的例证。

体细胞杂交还可以转移细胞质基因组控制的农艺性状。由油菜的染色体组、野油菜 (*Brassica campestris*) 的叶绿体基因组(含抗阿特拉金基因)和来自萝卜的线粒体基因组(含雄性不育基因)组成的体细胞杂种是一种全新的油菜,它同时表现出抗阿特拉金和细胞质雄性不育(Pelletier 等, 1983)。参与融合的亲本之一的原生质体经辐射处理,细胞核失活后作为细胞质的供体,当与另一种作为受体的原生质体融合后,可有效地转移由叶绿体及线粒体控制的有利性状。这种杂种称为胞质杂种。例如用经辐射处理的水稻雄性不育系原生质体与经碘乙酰胺(IOA)处理的栽培水稻原生质体融合,有些植株表现为雄性不育。对此胞质杂种线粒体 DNA 的分析表明,该杂种含有来自雄性不育系的线粒体 DNA 和重组类型的线粒体 DNA (Yang 等, 1988; Akagi 等, 1989; Kyoizuka 等, 1989)。

二、原生质体的遗传转化

原生质体直接吸收外源 DNA,最早是在烟草上获得成功的(Krens 等, 1982)。化学的或电激的基因转移方法,已广泛地用于原生质体转化研究,并成功地得到了转基因水稻(Zhang 和 Wu, 1988; Toriyama 等, 1988)及转基因玉米(Rhodes 等, 1988)。这标志着利用原生质体作为受体,以改良重要农作物的做法是完全可行的。当然,目前所利用的质粒中还只是含有 NPT-II、GUS、荧光素基因等标记基因,转化的频率也仍然比较低。Shillito 等(1985)用 DNA 吸收的方法,以及 Meyer 等(1985)用原生质体培养同步化的方法使烟草的转化率提高到 1% 或更高一点。

外源基因直接导入原生质体的另一方法是微注射。但这种方法至今还很费时或难以掌握,已应用过的植物原生质体的种类并不多,仅局限于植板率比较高的原生质体培养体系(Lawrence 和 Davies, 1985)。

三、原生质体培养与体细胞无性系变异

1978 年, Bajaj 等已报道了颠茄原生质体培养所得到的再生植株之间有不同的遗传变异,个体的染色体数有单倍体、多倍体或非整倍体。此后,不少农作物原生质体培养也报道了再生植株间存在体细胞无性系变异。例如马铃薯(Jacobsen, 1987)、苜蓿(Johnson 等, 1984)、水稻(Ogura 等, 1987)等等。特别是在马铃薯的体细胞无性系变异中已筛选出有经济价值的变异体。由此可见,原生质体不经另外的操作,仅通过培养就可能从再生的植株中得到丰富的遗传资源。

四、单倍体原生质体的应用

由于单倍体染色体的单倍性,以及其大部分遗传变异是隐性的,因此当代就可以直接选择。利用单倍体原生质体筛选或诱导突变体是可取的。花粉原生质体是单倍性的,是 DNA 吸收和遗传操作的理想受体,更有意义的是在于早期突变体的检测与诱导。利用单倍体原生质体融合产生双倍体杂种,是另一个有前途的研究课题(Chuong 等, 1988)。

五、原生质体的超低温保存

植物组织、细胞以至器官的超低温保存方面已做了大量的工作,但有关原生质体的冰冻保存工作仍然不多。原生质体超低温保存除了具有其他材料的全部优点之外,还有其特殊的优越性。超低温保存的原生质体可随时提供遗传操作研究的材料,可为观察细胞膜变化、细胞内结冰等低温生物学问题提供理想的研究系统。原生质体通过超低温保存和化冻之后,可以把过于液胞化的脆弱的原生质体淘汰掉,从而达得提高植板率的效果。胡萝卜、烟草、曼陀罗、颠茄 (Bajaj, 1988; Takeuchi 等, 1982), 以及玉米 (Zhang 等, 1990) 等植物原生质体,经超低温保存后都已成功地培养出再生植株。

六、原生质体的固定化

固定化原生质体起初是为了大规模生产次生代谢物,以及新产品的生物合成与生物转化。近年来,原生质体的固定化对种质资源的保存与运输方面也证明是有用的。胡萝卜和长春花原生质体与 3% 琼脂糖混合后,在 35℃ 条件下仍能存活,并避免了渗透压与机械胁迫 (Brodellius, 1984)。Potrykus 等 (1985) 曾利用这一方法筛选转化的原生质体。念珠状琼脂糖小块转移到含卡那霉素的培养基上后,可有效地选择个别转化的原生质体。这种选择方法也可用于突变体和融合杂种细胞的选择。

七、结 束 语

迄今,原生质体研究在农作物改良上的应用还仅处于初级阶段。对于一些重要的农作物,特别是禾本科农作物,可应用于实际生产的报道还为数甚少。这一领域今后的发展将会更加突出地表现在与其他学科的共同协作上。随着分子生物学的发展,将会有越来越多的与农艺性状有关的有用基因可供选择,以进行用原生质体作为受体的遗传转化。同时,利用原生质体可进行外源基因瞬时表达的便利条件,对嵌合基因,特别是组织特异性表达的启动子可进行快速准确的检测。因而大大提高了旨在进行农作物改良的基因重组研究的效率。原生质体作为突变体筛选的初始材料,结合不断发展的突变及筛选手段,也会明显提高育种的效率。正如同在体细胞杂交研究中业已取得的在细胞器行为、染色体丢失及核质关系等方面的成果那样,原生质体作为植物细胞生物学研究的一种实验体系,将会为作物改良的应用研究提供许多理论基础。目前及未来的一段时间内,利用根癌农杆菌或其他手段进行单子叶农作物的遗传转化还存在着许多障碍,原生质体研究将始终起到一种不可替代的作用。

(钱迎倩)

参 考 文 献

- 卫志明、许智宏, 1989, 高粱原生质体培养再生植株, 植物生理学通讯 6: 45—46。
王海波、李向辉、孙勇如、陈炬、朱慎、方仁、王培, 1989, 小麦原生质体培养——高频率细胞团形成与植株再生, 中国

科学(B 辑)8: 828—835。

孙勇如, 1989, 植物体细胞杂交的进展, 生物工程学报 5: 191—194。

陈志贤、李淑君、岳建雄、焦改丽、刘少翔、余建明、吴敬音、王海波, 1989, 从棉花胚性细胞原生质体培养获得植株再生, 植物学报 31: 966—969。

董晋江、夏镇澳, 1989, 小米原生质体再生小植株, 植物生理学通讯 2: 56—57。

蔡起贵、郭仲琛、钱迎倩、姜荣锡、周云罗, 1987, 玉米原生质体植株再生, 植物学报 29: 453—458。

Afonso C. L., Harkins K. R., Thomas-Compton M. A., Krejci A. E. and Galbraith D. W., 1985, Selection of somatic hybrid plants in *Nicotiana* through fluorescence-activated sorting of protoplasts, *Bio/technology* 3: 811—816。

Akagi H., Sakamoto M., Negishi T. and Fujimura T., 1989 Construction of rice cybrid plants, *Mol. Gen. Genet.* 215: 501—506。

Attree S. M., Dunstan D. I. and Fowke L. C., 1989, Plantlet regeneration from embryogenic protoplasts of white spruce (*Picea glauca*), *Bio/technology* 7: 1060—1062。

Austin S., Baer M. A. and Helgeson J. P., 1985, Transfer of resistance of potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion, *Plant Sci.* 39: 75。

Bajaj Y. P. S., Gosch G., Ottma M., Weber A. and Grobler A., 1978, Production of polyploid and aneuploid plants from anthers and mesophyll protoplasts of *Atropa belladonna* and *Nicotiana tabacum*, *Indian J. Exp. Biol.* 16: 947—953。

Bajaj Y. P. S., 1988, Regeneration of plants from frozen (-196°C) protoplasts of *Atropa belladonna* L., *Dasura mnoxia* Mill and *Nicotiana tabacum* L., *Indian J. Exp. Biol.* 26: 289—292。

Brodelius P., 1984, Immobilization of cultured plant cells and protoplasts, In: Vasil IK (ed.) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of plants vol. 1, Academic Press, Orlando, pp. 535—546。

Chien Y. C., Kao K. N. and Wetter L. R., 1982, Chromosomal and isozyme studies of *Nicotiana tabacum*-*Glycine max* hybrid cell lines, *Theor. Appl. Genet.* 62: 301—304。

Chuong P. V., Bevetrsdorf W. D., Powell A. D. and Pauls R. P., 1988, Somatic transfer of cytoplasmic traits in *Brassica napus* L. by haploid protoplast fusion, *Mol. Gen. Genet.* 211: 197—201。

De Laat AMM and Blaas J., 1987, An improved method for protoplast micro injection suitable for transfer of entire plant chromosomes, *Plant Sci.* 50: 161—169。

Fujimura T., Sakurai M. and Akagi H., 1985, Regeneration of rice plants from protoplasts, *Plant Tissue Cult. Lett.* 2: 74—75。

Gibson R. W., Jones M. G. K. and Fish N., 1988, Resistance to potato leaf roll virus and potato virus Y in somatic hybrids between dihaploid *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*, *Theor. Appl. Genet.* 76: 113—117。

Harris R., Wright M., Byrne M., Varnum J., Brightwell B. and Schubert K., 1988, Callus formation and plantlet regeneration from protoplasts derived from suspension cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Cell Rep.* 7: 337—340。

Holbrook L. A., Reich J. J., Lyer V. N., Haffner M. and Miki B. L., 1985, Induction of efficient cell division in alfalfa protoplast, *Plant Cell Rep.* 4: 229—232。

Jacobsen, E., 1987, Genetic diversity in protoplast- and cell-derived plants of potato, In: Bajaj YPS (ed.) *Bio-technology in agriculture and forestry 3*. Polato, Springer, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo. pp. 358—374。

Johnson L. B., Stuteville D. L., Schlarbaum S. E. and Skinner D. Z., 1984, Variation in phenotype and chromosome number in alfalfa protoclonal regenerants from nonmutagenized calli, *Crop Sci.* 24: 948—957。

Kao K. N., 1977, Chromosomal behavior in somatic hybrids of soybean-*Nicotiana glauca*. *Mol. Gen. Genet.* 150: 225—230。

Klimaszewska K., 1989, Recovery of somatic embryos and plantlets from protoplasts cultures of *Larix* $\times$ *Eurolepis*. *Plant Cell Rep.* 8: 440—444。

Krens F. A., Molendijk L., Wullems G. T. and Schiperoort R. A., 1982, *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA, *Nature* 296: 72—74。

Kyozuka J., Hayashi Y. and Shimamoto K., 1987, High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods, *Mol. Gen. Genet.* 206: 408—413。

Kyozuka J., Hayashi Y. and Shimamoto K., 1989, Plant regeneration from protoplasts of indica rice: genotypic differences in culture response, *Theor. Appl. Genet.* 76: 887—890。

Kyozuka J., Kaneda T. and Shimamoto K., 1989, Production of cytoplasmic male sterile rice (*Oryza sativa* L.) by cell fusion, *Bio/technology* 7: 1171—1174。

Lawrence W. A. and Davios D. R., 1985, A method for the microinjection and culture of protoplasts at very low densities, *Plant Cell Rep.* 4: 33—35。

Lee L., Schroll R. E., Grimes H. D. and Hodges T. K., 1989, Plant regeneration from indica rice (*Oryza sativa* L.)

protoplasts, *Planta* 178: 325—333.

- Meyer P., Walgenbach E., Bussmann K., Hombrecner G. and Saedler H., 1985, Synchronized tobacco protoplasts are efficiently transformed by DNA, *Mol. Gen. Genet.* 201: 513—518.
- Niizeki M., Kihara M., Cai K., Ishikawa R. and Saito K., 1989, Somatic cell hybridization among *Gramineae* and *Legumineae* species, Proc. of the 6th Internatl. Congr. of SABRAO, pp. 501—504.
- Ogura H., Kyozuka J., Hayashi Y., Koba T. and Shimamoto K., 1987, Field performance and cytology of protoplast derived rice (*Oryza sativa*): high yield and low degree of variation of four japonica cultivars.
- Pandeya R. S., Douglas G. C., Keller W. A., Setterfield G. and Patrick Z. A., 1986, Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*: development of tobacco breeding strains with disease resistance and deviated nicotine content, *Z. Pflanzenzuchtg* 96: 346—352.
- Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chetrit P., Remy R., Rousselle P. and Renard M., 1983, Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion, *Mol. Gen. Genet.* 191: 244—250.
- Potrykus I., Shillito R. D., Saul M. W. and Paszkowski J., 1985, Direct gene transfer: state of the art and future potential, *Plant Mol. Biol. Rep.* 3: 117—128.
- Prioli L. M. and Sondahl M. R., 1989, Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize, *Bio/technology* 7: 589—594.
- Rhodes C. A., Lowe K. S. and Ruby K. L., 1988, Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures, *Bio/technology* 6: 56—60.
- Rhodes C. A., Pierce D. A., Mettler I. J., Mascarenhas D. and Detmer J. J., 1988, Genetically transformed maize plants from protoplasts, *Science* 240: 204—207.
- Russell J. A. and McCown B. H., 1988, Recovery of plants from leaf protoplasts of hybrid-poplar and aspen clones, *Plant Cell Rep.* 7: 59—62.
- Schweiger H. G., Dirk J., Koop H. U., Kranz E., Neuhaus G., Spangenberg G. and Wolff D., 1987, Individual selection, culture and manipulation of higher plant cells, *Theor. Appl. Genet.* 73: 769—784.
- Shillito R. D., Paszkowski J. and Potrykus I., 1983, Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species, *Plant Cell Rep.* 2: 244—247.
- Shillito R. D., Saul M. W., Paszkowski J., Muller M. and Potrykus I., 1985, High efficiency direct gene transfer to plants, *Bio/technology* 3: 1099—1103.
- Shillito R. D., Carswell G. K., Johnson C. M., DiMaio J. and Harms C. T., 1989, Regeneration of fertile plants from protoplasts of elite inbred maize, *Bio/technology* 7: 581—587.
- Spangenberg G., Koop H. U., Lichter R. and Schweiger H. G., 1986, Microculture of single protoplasts of *Brassica napus*, *Physiol.* 66: 1—8.
- Sun C. S., Prioli L. M. and Sondahl M. R., 1989, Regeneration of haploid and dihaploid plants from protoplasts of supersweet (sh2sh2) corn, *Plant Cell Rep.* 8: 313—316.
- Takebe I., Labib G. and Melchers G., 1971, Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco, *Naturwissenschaften* 58: 318—320.
- Takeuchi M., Matsushima H. and Sugawara Y., 1982, Totipotency and viability of protoplasts after long-term freeze preservation. In: Plant Tissue Culture 1982. Published by the Japanese Association of Plant Tissue Culture, Japan, pp. 197—198.
- Terada R., Kyozuka J., Nishibayashi S. and Shimamoto K., 1987, Plantlet regeneration from somatic hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) and barnyard grass (*Echinochloa oryzicola* Vasing), *Mol. Gen. Genet.* 210: 39—43.
- Toriyama K., Hinata K. and Sasaki T., 1986, Haploid and dihaploid plant regeneration from protoplasts of anther callus in rice, *Theor. Appl. Genet.* 73: 16—19.
- Toriyama K., Arimoto Y., Uchimiya H. and Hinata K., 1988, Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts, *Bio/technology* 6: 1072—1074.
- Tsai Q. G., 1988, Plant regeneration from leaf callus protoplasts of *Actinidia chinensis* Planch var *chinensis*, *Plant Sci.* 54: 231—235.
- Vardi A., Spiegel-Roy P. and Galun E., 1982, Plant regeneration from citrus protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species, *Theor. Appl. Genet.* 62: 171—176.
- Wang D. Y., Miller P. D. and Sondahl M. R., 1989, Plant regeneration from protoplasts of indica type rice and CMS rice, *Plant Cell Rep.* 8: 329—332.
- Webb J. B., 1988, Recent developments in the regeneration of agronomically important crops from protoplasts, In: Progress in Plant Protoplasts Research, Kluwer Academic Publishers, pp. 27—31.
- Wei Z. M. and Xu Z. H., 1988, Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max* L.), *Plant Cell Rep.* 7: 348—351.
- Yamada Y., Yang Z. Q. and Tang D. T., 1986, Plant regeneration from protoplast-derived callus of rice (*Oryza*

- tiva L.), *Plant Cell Rep.* 5: 85—88.
- Yang S. Q., Shikanai T. and Yamada Y., 1988, Asymmetric hybridization between cytoplasmic male-sterile (CMS) and fertile rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts, *Theor. Appl. Genet.* 76: 801—808.
- Zhang, S. B., Kuo C. S., Qian Y. Q., Qu G. P., Cai Q. G. and Zhou Y. L., 1990, Factors influencing isolation, division and plant regeneration in maize (*Zea mays* L.) protoplast culture, *Chinese J. Bot.* 2: 18—25.
- Zhang S. B., Jian L. C., Kuo C. S., Qu G. P. and Qian Y. Q., 1991, Plant regeneration from cryopreserved maize (*Zea mays* L.) protoplasts, *Plant Cell Rep.* (submitted).
- Zhang W., Wu. R. 1988, Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants, *Theor Appl. Genet.* 76: 835—840.

第二节 植物原生质体的理论研究

植物原生质体即去除细胞壁的裸露植物细胞，是进行基础理论研究的理想材料。从上一世纪末到本世纪初期，有关植物原生质体研究领域的先驱者 (Klercker, 1892; Kuster, 1909; Plowe, 1931; Michel, 1937) 曾采用机械法制备原生质体以进行研究，但这种方法速度慢、得率小，而且取材也有所局限。1960 年 Cocking 试用酶法制备番茄根原生质体首次获得成功。技术上的突破为深入一步的研究铺平了道路，现在已经能从许多植物的各种材料制备出大量有活力的原生质体，在此基础上原生质体研究进入了一个新时期。近 30 年来，植物原生质体研究不仅已成为细胞生物学、生物工程等学科中发展较快的一个分支，而且通过多方面的探索，学者们已普遍承认原生质体作为生物试验系统的巨大潜力。原生质体技术在生理学、遗传学、病理学、病毒学和育种学等研究中都得到了应用。此外它的衍生系统如亚原生质体、微小原生质体、胞质体等技术也在不同程度上得到发展。图 1-1 归纳了植物原生质体研究中的部分问题，可见涉及的面十分广泛。从图

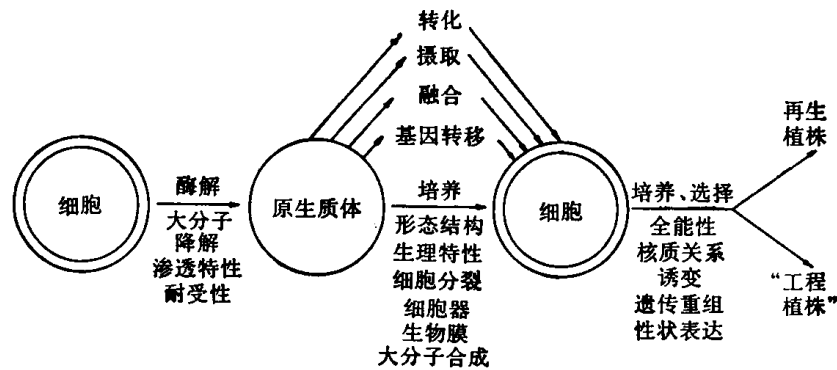


图1-1 植物原生质体的生物学意义

1-1 还可以看出一条主线，这就是离体的植物原生质体和其起源细胞一样仍然具有全能性，即在适合的离体培养条件下具有繁殖、分化、再生成完整植株的能力。这一点是人们最感兴趣的，也是进行细胞工程和基因工程研究的基础。近几年来，植物原生质体研究中进展较快的是重要农作物原生质体培养取得成功，而且用此系统得到了一些转基因植株和一些新组合的细胞杂种。相对来说，有关植物原生质体的基础性和理论性研究工作较欠缺，必须引起足够的重视。不同来源的组织或离体培养的组织与细胞都能用以制备原生质体。原生质体和其起始细胞在形态结构上最明显的不同就是原生质体处于质壁分离状态而没有细胞壁，质膜裸露直接与介质相接触。由于表面张力的作用，它们一般呈球形；其大小因起始细胞的不同而异，直径约 15—60 μm 。叶肉原生质体是常用的材料，特

别是双子叶植物,它们的大小较均一,中央有一个大液泡,叶绿体分布在薄层细胞质中,紧贴着质膜。另一类重要的材料是培养细胞或一些适于制备原生质体的愈伤组织,后者需要先解离成单细胞才能脱壁,当然在酶解方法上除二步法外也可用一步法酶解。从培养细胞制备的原生质体大小常不均一,没有中央液泡,液泡分散,带有白色体、原质体或少量的片层。一般情况下原生质体和起始细胞一样,只有一个细胞核。如果起始细胞是多核的,则分离的原生质体也是多核的,当然也有一些多核原生质体是由于在制备时经细胞自发融合而产生的。下面对某些有关问题作一简要介绍。

一、原生质膜

原生质体是研究植物细胞表面膜——原生质膜的好材料。既可以在原位研究它的性质,也便于分离提纯,或将质膜进行表面标记开展有关的试验。质膜厚度一般是 25—100 Å,它对脂溶物质的透性是有选择性的,具有高电阻和低表面张力。质膜的特性也是由遗传因子、起源细胞的生理状况,以及它所生存的环境条件(如培养基的稳压剂、pH、离子组分等)所决定的。对于质膜的结构可采用生物膜研究中常用的方法,如超薄切片等来研究。而应用生理学方法可以探讨质膜的各种功能:代谢物质的穿膜运输,离子运转,激素、药剂和抑制剂等作用于膜的反应。从同一种细胞制备的原生质体,其质膜的性质也存在着差异。叶肉原生质体相互之间的差异较小;而来自培养细胞的原生质体之间的异质性就较大,例如质膜的折叠程度就是这样。质膜表面常可观察到有球状突起,对于这些突起的起源仍有不同的看法,有的认为是质膜弱区外折叠而形成的小泡,有的认为可能是质膜体等。质膜有弹性可以伸展,最大伸展度可达原来的 4 倍左右。用对糖类专一性的染料(PTA-CrO₄、STA-CrO₃)或改良的 PAS 程序证明,原生质膜上存在糖类。原生质膜表面的电荷特性反映了质膜上离子化基团的状况,它与质膜的组分有关而且也影响质膜的融合。多数的试验确定了质膜的表面电势值为负值,但也有些工作表明这种电势先是负值后来可转变成正值。不同植物的质膜表面电荷的变化有可能与细胞壁的形成,以及能否进行持续的细胞分裂有关。已有一些资料证明分离的原生质体与细胞相比,溶质通过质膜运输的基本过程相似。质膜电位差的变化,以及膜极性的改变无疑会对溶质的运输产生影响。但至今深入的研究甚少。如果进一步发展从原生质体纯化质膜的程序,将有利于研究质膜的结构与分析在制备原生质体时引起的质膜变化。原生质体也可以用于纯化完整的液泡,制备液泡形成体小泡(tonoplast vesicle),但首先要解决与其他细胞膜的混杂问题。对外源植物凝集素及生长素等与质膜的关系也有不少值得深入研究的问题。

二、细胞壁的再生

细胞壁是植物特有的结构之一,具有各种功能。细胞壁对细胞不仅起保护作用,而且还参与细胞的生长、分化等生命活动。原生质体必须再生出细胞壁才能继续发育。如不再生壁,则细胞分裂不能发生或只能不正常地分裂,当然更无法进一步形成愈伤组织。用原生质体为材料对研究质膜和初生壁的关系,特别是对研究纤维素微纤丝的沉积机理

十分有用。它可用以深入探讨再生壁的生物化学特性,以及培养条件对于再生壁原材料的合成、运输与装配的影响。大多数分离的原生质体在适宜的培养条件下,24小时内就能开始再生细胞壁。细胞壁的再生显然因植物的种类、起源细胞的分化程度与生理状态而异;有的须经3—4天,有的甚至难以再生细胞壁。烟草植株叶肉细胞壁含有50—60%纤维素,组织培养细胞的壁含有35—50%纤维素,所含纤维素的量因培养条件和外植体来源的不同而异;但原生质体再生的细胞壁只含有4—7%纤维素,况且与来源组织相比,其分子量的大小也有所不同。用来源不同的原生质体进行试验的结果都表明有相似的趋势。原生质体在培养时再生细胞壁后可进行正常的细胞分裂,此时纤维素合成开始恢复到常态。微纤丝的沉积是随机的,但亦有例外的报道。原生质体再生细胞壁的早期不仅只产生少量纤维素,而且纤维素多聚化程度(DP)也较起始组织低。如起源组织的纤维素DP在200弱到4000之间,其中30—50%大于1000,而原生质体再生壁纤维素的DP有65—85%小于500。大豆、胡萝卜培养细胞的原生质体和烟草叶肉原生质体的再生壁中,非纤维素组分多糖常以葡聚糖为主,含量大于起源组织的细胞壁。多糖也会丢失到培养基中,数量不一;富含果胶的阿拉伯糖和半乳糖常常出现,也可有酸性多糖醛酸苷。材料来源及培养基中的不同激素组合对再生壁的组分有影响,用同位素示踪表明大多数的再生壁中,主要成分葡聚糖会有不同来源。但是用番茄果实原生质体进行的试验表明,在原生质体外所形成的覆盖物中含有聚合的类脂物、软木脂和损伤反应产物。可以用对纤维素合成的专一抑制剂如乙氧苯基氰(DCB)、香豆素或对纤维素合成的间接抑制剂如放线菌素D、放线菌酮(它们抑制葡聚糖合成酶I)进行处理,以研究纤维素及微纤丝形成与酶活性等的关系。由于从原生质体再生的细胞壁中纤维素含量较低,用以探讨多聚化与结晶过程、微纤丝的形成、细胞核的转录活性、多核糖体、线粒体、内质网与再生壁的关系都是十分有利的。

三、细胞分裂与细胞分化

如果用氘-胸腺嘧啶标记分离的原生质体及其起始细胞,可以对二者的细胞周期的各个时期的长度进行分析,也可用流式细胞光度计研究各细胞周期细胞的分布。这些工作正在进行之中。一个有意思的现象是1970年Zohnson和Rao在哺乳动物培养细胞中所观察到的,有丝分裂细胞的中期核和间期核融合后,有丝分裂核会导致间期核的“期前染色体凝聚”(premature chromosome condensation, PCC),在10年后为Szabados和Dudits用植物原生质体得到证实。花粉母细胞原生质体还提供了研究细胞同步化的好材料。原生质体经培养仍然保持细胞全能性,拓宽了研究细胞分化的领域。用培养的原生质体除了研究细胞壁形成的机理外,可用以探讨如何从静止期细胞(G_0)转入细胞周期的 G_1 、S和 G_2 期再到M期。在此基础上,可研究细胞分化和形态发生过程及这些过程的调控。已经知道,有不经细胞分裂的细胞分化现象如管胞的分化;更重要的是经过细胞分裂,在细胞团或愈伤组织形成后的器官原基分化或体细胞胚分化。培养基中激素的种类与浓度及它们的配比,对原生质体及其再生细胞的生长与分化关系密切。如烟草悬浮细胞原生质体其直径约为30—40 μm ;当在含有NAA 0.1mg/L、6-BA 1mg/L的培养基中可长成长度为300—400 μm 的细胞,如果将NAA的含量增加到5mg/L,则细胞的延长生

长趋势下降而分裂的细胞数增加。天仙子和烟草叶肉原生质体培养形成小细胞团后,如果从高激素浓度($5-20\mu\text{mol/L}$ 4CPA 或 NAA 及 $1-5\mu\text{mol/L}$ 6-BA 或 ZT)培养基转到低生长素浓度的培养基中芽原基就很快分化出来。油菜叶肉原生质体培养得到的愈伤组织皆易长根;如果采用几步激素调节,则可以经体细胞胚途径得到再生植株[改良的 Niksch 培养基(0.5mg/L 2, 4-D、 0.5mg/L NAA、 0.5mg/L 6-BA)诱导细胞分裂;MS 培养基(0.2mg/L 2, 4-D、 3.0mg/L KT、 500mg/L 谷氨酰胺)诱导形成原胚;MS 培养基(0.01mg/L 2, 4-D、 1.0mg/L 6-BA、 500mg/L 谷氨酰胺)使体细胞胚发育,再转到无激素的 MS 培养基上生根,得到再生植株]。近几年来,过去称为“困难植物”的禾本科原生质体培养已取得可喜进展。水稻、小麦、玉米、谷子等采用胚性细胞系制备原生质体并在合适的培养条件下,通过体细胞胚形成途径而得到了再生植株。但仍须进一步掌握其规律,研究不同遗传型、培养条件与形态发生之间的关系,研究如何稳定地提高分化率和植株再生率,研究白化苗的成因与控制等。

四、原生质体摄入细胞器

植物细胞是一个复杂的生物学系统,它是一个独立的功能单位,其中又有各种细胞器执行着不同的功能。对于高等植物来说,除了通过有性杂交或细胞杂交重组遗传信息以外,细胞器或大分子等的引入也是目前正在探索的遗传重组的途径之一。由于高等植物的有性杂交受了很多因素的限制,事实上大多数父本只有细胞核基因参与子代的遗传重组;至于通过原生质体融合的细胞杂交则涉及了双亲的全套遗传组分。因此有人企图利用原生质体脱去了细胞壁质膜外露的有利条件,进行各种细胞器的引入、大分子的引入、基因的引入,以及胞质摄取低等植物或微生物等操作。如果能成功地将细胞器引入原生质体,则可用于染色体外基因的定位,研究有关基因的重组和调节;也可进行诱变,探讨核质之间的相互关系和胞质雄性不育问题。对于植物原生质体摄入 DNA、RNA、噬菌体等,通常称之为转化;而通过质粒使目的基因转入到植物细胞则属基因工程,可参阅有关文献。这里只介绍植物原生质体摄入细胞器、微生物和藻类的简单情况。将细菌或蓝绿藻引入原生质体有可能将其固氮能力转入高等植物细胞。但这些方面的进展一直较慢,主要是技术上还存在不少困难。例如要进行细胞器引入,除了要有良好的原生质体作受体外,首先要分离出完整而有功能的细胞器,引入率要高,而且引入后“外来的遗传组分”能在受体细胞中存活、整合及表达。关于分离植物细胞核的报道较多,大多通过质壁分离复原及加入去垢剂 Triton-100 (三硝基甲苯)以溶解细胞膜及除去其他细胞质组分,从而释出细胞核并经过滤离心加以纯化而来。Saxena 等(1985)用黑芥 (*Brassica nigra*) 原生质体作材料可在 30 分钟内完成分离细胞核的操作,得率为 95%,没有杂质,有完整的核膜和清晰的核孔。分离细胞核的质量主要在于完整度、纯度、高得率和生物活力。如果得到的是纯的细胞核,则可从中提取核酸,得到单一的 DNA 带;也可以通过测定 RNA 和 DNA 聚合酶等的活性加以证明(Saxena 等,1989)。Lorg 和 Potrykus (1975)用荧光染料染几种禾本科植物的细胞核,并使之被玉米原生质体摄入,摄入率可达 5%。用两个对光敏感的烟草突变体经摄入试验及核融合,得到 50 个绿色愈伤组织,但未能得到再生植株。其他还有将矮牵牛细胞核引入烟草、玉米或矮牵牛白化苗原生质体,将番茄细胞核

引入矮牵牛或烟草原生质体等试验。相对来说,叶绿体的分离制备比较容易,问题就在于原生质体摄入叶绿体之前或以后都要证明它们有生物活性。已有人使矮牵牛白化苗细胞原生质体摄入矮牵牛叶绿体,胡萝卜悬浮细胞原生质体摄入藻类的叶绿体,链孢霉素原生质体摄入了菠菜叶绿体等的报道。但这些只是初步结果,今后还须作进一步观察,以研究叶绿体的功能、叶绿体与细胞核的关系,以及叶绿体的遗传特性等。

引入个别染色体到原生质体中即引入了外源基因组的特定部分,也就可能形成附加系,提供研究染色体结构图谱的新方法。分离染色体的技术相对来说难一些, Malmberg 等(1980)从烟草、番茄悬浮细胞原生质体和百合及萱草小孢子母细胞原生质体分离出正在进行有丝分裂或减数分裂的染色体,不仅在显微镜下观察到它们有准确的形态、大小,而且通过使用对 DNA 特异性的 Feulgen 反应、提取染色体特有的 DNA 和放射自显影等技术证明了它们的确是染色体。Sgabados 等(1981)、Griesbach 等(1982)改进了分离、纯化植物染色体的技术,并进行了将蚕豆、百合、萱草等染色体引入烟草叶肉原生质体等试验,摄取率可达 10^{-4} — 10^{-5} 。固定后用吉姆萨染色表明,原生质体摄入的染色体保持其形态与结构的完整可达 3 小时。近年来正在尝试先提高细胞和原生质体的细胞周期同步化程度,再结合流式细胞自动分离仪分离植物染色体,以期得到高纯度的制备。目前人们正在研究染色体的分离情况及其完整度、结构和倍性有无变化等问题,同时对染色体经引入原生质体后的表现和作用也正在进行观察。如果染色体的完整度好,有丝分裂特性稳定,则有可能进入受体核,并发展成转化体(De Laat 等, 1989)。Giles 等(1975, 1978)用 PEG 法使棕色固氮菌(*Azotobacter vinlandii*)进入真菌毛霉属(*Rhizopogon*)原生质体后,这种诱导的原生质体与裸子植物辐射松的根形成了菌根的联合。Davey 和 Power(1975)将酿酒酵母原生质体引入到爬山虎冠瘿瘤悬浮细胞原生质体中,摄入率可达 20%。Fowke 等(1979)成功地进行了胡萝卜原生质体与衣藻无壁突变体细胞的诱导融合,并进行了培养。经显微镜检查,融合率可达 10—20%。大多数胡萝卜原生质体中有 1—3 个衣藻细胞。在融合时,衣藻的细胞器释入胡萝卜原生质体的胞质中。含有衣藻细胞器的胡萝卜原生质体再生了细胞壁,培养 3—5 天出现细胞分裂,培养 10 天时仍可辨认出叶绿体,但未观察到线粒体与高尔基体,推测可能是被降解了。Lynch 等(1989)用聚乙二醇(分子量 8 000)和 0.6mol/L 甘露醇诱导,使真菌(*Fusarium oxysporum*, 或 *Aspergillus nidulans*)菌丝原生质体进入芹菜原生质体。根据光学显微镜及 DAPI 染色荧光显微镜检查,从细胞核、细胞器及细胞质的情况证明芹菜原生质体已摄入了真菌,其途径是通过胞饮作用。通过超微结构观察也同样得到证明。由于溶酶体的作用,真菌原生质体破裂了,而芹菜原生质体因摄入的真菌不同,其活力也有差异,推想是由于真菌的进入影响了芹菜原生质体或细胞的次生物质的代谢。

上面简要介绍的只是植物原生质体理论研究中的部分问题,其他问题还有很多。例如利用保卫细胞的原生质体以研究气孔开关的机理;利用原生质体制备膜包小泡以研究物质运输;利用原生质体制备液泡以研究物质的贮存;利用不同类型的叶肉细胞以研究光合作用与呼吸代谢;利用花粉母细胞原生质体和卵细胞进行诱导融合以模拟受精作用;利用体细胞原生质体融合以研究体细胞遗传,并与常规性细胞遗传相比较等等,都是重要而值得注意的。

(夏锦澳)

参 考 文 献

- 夏镇澳, 1983, 植物原生质体研究中的几个问题, 细胞生物学杂志 5(3): 1—7。
 夏镇澳, 1987, 植物原生质体培养和细胞杂交研究的进展, 植物生理生化进展 5: 36—53。
 «植物生理学通讯»编辑部主编, 1987, 植物生理学专题讲座——纪念罗宗洛教授, 科学出版社, 第 127—210 页。
 Bajaj Y. P. S. (ed). 1989, Plant protoplasts and genetic engineering II *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 9: 1—25, 328—359, 406—446.
 Fowke and Constabel, F. (eds), 1985, Plant protoplasts, CRC Press Inc. pp. 39—52, 67—118.
 Giles K. L. (eds), 1983, Plant protoplasts, *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 16: 33—78, 219—299.
 Pilet P. E. (ed), 1985, The physiological protoplasts of plant protoplasts, Springer-Verlag, pp. 1—11, 45—67, 143—151.
 Puite K. J., Dons J. J. M., Huizing H. J., Kool A. J., Koornneef M. and Krens F. A. (eds), 1988, Progress in Plant Protoplast Research, pp. 1—32.
 Quial P. H., 1979, Plant cell tractionation, *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 30: 425—498.
 Whitaker R. J. and Evans D. A. (eds), 1986, Organelle transter for genetic transformation of plant protoplasts, Handbook of Plant Cell Culture vol. 4 Technique and Application, pp. 172—196.

第三节 植物遗传工程的理想受体

控制植物遗传性状的理想正在实现。早年,曾有人系统地研究了以远缘种黑麦的全 DNA 注射到小麦的幼胚中,其种子后代出现大量变异的株系。虽然努力选择稳定的株系,但是,没有能获得有目的性状的遗传变异。然而说明裸露的 DNA 能够进入细胞核基因组。稍后,德国人用白花矮牵牛幼茎浸泡在含有紫花矮牵牛 DNA 的液体中,种子后代也发生了花色的变异。虽经多方验证,未能使人信服地证明异源品种 DNA 是导至花色

表 1-1 重要农作物原生质体再生植株

作物名称	原生质体来源	基因型数	作 者	年 代
粳稻	幼穗愈伤悬浮系	1	雷鸣、李向辉	1986
粳稻	种胚愈伤	1	王光远、夏镇澳	1986
籼稻	幼穗愈伤悬浮系	1	孙宝林、李向辉	1988
糯稻	幼胚愈伤	1	陈秀芝、夏镇澳	1989
籼稻	幼穗愈伤悬浮系	1	李向辉等	1989
小麦	种胚愈伤悬浮系	1	王海波、李向辉	1988
小麦	种胚愈伤悬浮系	1	孙宝林、孙勇如	1988
小麦	种胚愈伤悬浮系	1	贾敬芬等	1988
小麦	种胚愈伤悬浮系	2	陈惠民等	1989
玉米	花药愈伤悬浮系	1	蔡起贵、郭仲琛	1987
玉米	花药愈伤悬浮系	1	孙勇如、张丽明	1988
玉米	花药愈伤悬浮系	1	张士波、郭仲琛	1989
大豆	幼嫩子叶	6	卫志明、许智宏	1988
野生大豆	幼嫩子叶	1	卫志明、许智宏	1988
高粱	幼穗愈伤组织	2	卫志明、许智宏	1988
谷子	种子愈伤组织	1	董晋江、夏镇澳	1989
谷子	种子愈伤悬浮系	1	任正国、贾敬芬	1989
大麦	种子愈伤悬浮系	1	颜秋生等	1990
棉花(陆地棉)	下胚轴愈伤悬浮系	1	陈志贤、余建明	1989
马铃薯	无菌苗子叶	1	李世君、李向辉	1988
油菜	根	2	许智宏等	1982
油菜(芥菜型)	子叶, 下胚轴	2	李文彬等	1986