



棉花原生质体培养与体细胞杂交研究进展

汪静儿, 孙玉强, 祝水金*

(浙江大学农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310029)

摘要:棉花原生质体培养已在多个棉种上取得成功,体细胞杂交也取得了较大的进展,创造出多个种间体细胞杂种,为棉花遗传改良提供了丰富的种质资源。结合本实验室的研究进展,综述了棉花原生质体培养和体细胞杂交的基本技术、研究现状、存在问题和应用前景,为棉花基因工程和细胞工程研究提供有益的借鉴。

关键词:棉花;原生质体培养;融合;体细胞杂交

中图分类号:S562 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2007)02-0139-06

Advances in Cotton Protoplast Culture and Somatic Hybridization

WANG Jing-er, SUN Yu-qiang, ZHU Shui-jin*

(College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China)

Abstract: Plant regeneration from protoplasts has proved a very useful technique for crop genetic improvement programs, genetic transformation, and somatic hybridization etc. Now reliable procedures are available for protoplast isolation and culture from a range of high plants including cotton. There were many successful reports on plant regeneration from protoplast. Great progresses was also made for cotton somatic hybridization via protoplast fusion, several inter-specific hybrids were created. As is known, there were 47 wild species, which have advantageous properties such as disease and herbicide resistance that the genetic improvements need. Somatic hybridization is a unique useful way to transfer both nuclear and cytoplasmic genes of different wild species simultaneously in comparison to chromosomal and gene engineering. The success of protoplast fusion in cotton was based on the effective system of cotton protoplast culture, and plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts was a key step to somatic hybridization. So it is necessary to establish a highly reproducible system for efficient plant regeneration from protoplasts or fused protoplasts in cotton. Advances on fundamental techniques, research status, problems, and promising development of cotton protoplast culture, as well as the somatic hybridization were reviewed, in order to offer beneficial references for cotton gene and chromosome engineering.

Key words: cotton; protoplast culture; protoplast fusion; somatic hybridization

植物原生质体培养及其体细胞杂交是创造新物种、克服不亲和性和进行遗传转化的有效手段^[1]。自从 Beasley 等^[2]首次从陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 的纤维分离出原生质体并经过

培养得到小细胞团,至今棉花原生质体培养再生已在多个实验室获得成功^[3-7]。国内外有关棉花原生质体培养和体细胞杂交研究取得多方面进展,结合本实验室对棉花原生质体培养和体细胞

收稿日期:2006-05-31 作者简介:汪静儿(1976-),女,博士研究生;*,联系作者,shjzhu@zju.edu.cn

基金项目:国家“973”计划(2004CB117305)、国家自然科学基金(30471108)

杂交的基本技术及存在的问题作了持续研究。

1 棉花原生质培养和体细胞杂交研究与进展

棉花原生质体培养始于 1973 年^[2]。1986 年, El-Shihy 等^[8]首次报道了从海岛棉子叶原生质体培养得到再生植株。陈志贤^[9]和余建民^[10]等分别以胚性细胞悬浮系为材料进行原生质体的分离和培养得到再生植株,提出了以具有再生能力的胚性愈伤组织分离原生质体的观点,并且进一步完善了原生质体培养体系,详细研究了氮源和激素对陆地棉原生质体培养、胚胎发生和发育的影响。之后, Peeters 等^[11]、李仁敬等^[12]、孟庆玉等^[13]、王喆之等^[14]、吕复兵^[15]以不同棉花品种

的材料培养得到再生植株。Sun 等^[3-4]将野生棉克劳茨基棉(*G. klotzschianum*)和陆地棉珂字棉 201 不同外植体分离得到的原生质体进行液体浅层培养时,获得大量的再生植株。本实验室建立了棉花原生质体培养体系,并且已经从陆地棉珂字棉 201、珂字棉 312 和 ZDM-3 等材料的原生质体培养得到再生植株,并从多个野生棉种的原生质体得到了胚性愈伤组织及其再生植株。

在棉花原生质体再生植株已获得成功的基础上,最近, Sun 等^[5-7]连续报道了用陆地棉珂字棉 201 的胚性悬浮系原生质体与二倍体野生棉克劳茨基棉的胚性愈伤组织原生质体、斯笃克氏棉(*G. stockii*)的不成熟体细胞胚原生质体、比克氏

表 1 棉花原生质体培养与融合研究进展

Table 1 A list of the protoplast culture and somatic hybridization cotton

年份	材料	原生质体来源	结果
1973	陆地棉	纤维	原生质体培养:小细胞团 ^[2]
1977	陆地棉	下胚轴诱导的愈伤组织	原生质体培养:小细胞团 ^[16]
1979	陆地棉	子叶	原生质体培养:小细胞团 ^[17]
1982	克劳茨基棉	下胚轴诱导的愈伤组织	原生质体培养:小细胞团 ^[18]
1984	陆地棉	花药愈伤组织	原生质体培养:小细胞团 ^[19]
1986	海岛棉	子叶	原生质体培养:小细胞团 ^[8]
1986	陆地棉,海岛棉	叶肉	原生质体培养:2~3 个细胞的克隆 ^[20]
1986	哈克尼西棉	愈伤组织	原生质体培养:小细胞团 ^[21]
1987	陆地棉	茎的愈伤组织	原生质体培养:愈伤组织 ^[22]
1988	亚洲棉	花药愈伤组织及其细胞悬浮培养物	原生质体培养:小细胞团 ^[23]
1989	陆地棉	胚性细胞悬浮系	原生质体培养:再生植株 ^[9]
1989	陆地棉	胚性细胞悬浮系	原生质体培养:再生植株 ^[10]
1991	陆地棉	胚性细胞悬浮系	原生质体培养:再生植株 ^[24]
1991	陆地棉	胚性细胞悬浮系	原生质体培养:再生植株 ^[25]
1991	戴维逊氏棉	愈伤组织和细胞悬浮系	原生质体培养:细胞团 ^[26]
1991	草棉	子叶下胚轴愈伤组织	原生质体培养:细胞克隆 ^[27]
1994	陆地棉	愈伤组织	原生质体培养:再生植株 ^[11]
1995	新疆长绒棉	胚性细胞悬浮系	原生质体培养:胚性愈伤组织 ^[12]
1996	新疆长绒棉	胚性细胞悬浮系	原生质体培养:胚性愈伤组织 ^[13]
1998	陆地棉	胚性愈伤组织	原生质体培养:再生植株 ^[14]
1999	陆地棉	胚性细胞悬浮系	原生质体培养:再生植株 ^[28]
2005	陆地棉	胚性愈伤组织、胚性细胞悬浮系	原生质体培养:再生植株 ^[3]
2005	克劳茨基棉	胚性细胞悬浮系	原生质体培养:再生植株 ^[4]
2006	陆地棉 ZDM-3,珂 201,312	胚性愈伤组织、胚性细胞悬浮系	原生质体培养:再生植株(本实验室)
2004	陆地棉、克劳茨基棉	胚性细胞悬浮系、胚性愈伤组织	体细胞融合:对称杂种植株 ^[5]
2005	陆地棉、斯笃克氏棉	胚性细胞悬浮系、胚性愈伤组织、子叶	体细胞融合:对称杂种植株 ^[6]
2005	陆地棉、比克棉	胚性细胞悬浮系、胚性愈伤组织、子叶	体细胞融合:对称杂种植株 ^[6]
2006	陆地棉、戴维逊氏棉	胚性细胞悬浮系、胚性愈伤组织	体细胞融合:对称杂种植株 ^[7]
2006	陆地棉、澳洲棉	胚性细胞悬浮系、体细胞幼胚	体细胞融合:对称杂种小植株(本实验室)

棉(*G. bickii*)的叶片原生质体和戴维逊氏棉(*G. davidsonii*)叶片原生质体分别进行电融合,用 KM_8P 培养基进行液体浅层培养,快速获得再生植株。再生植株经形态学观察、细胞流式仪分析和染色体检查等方法鉴定为体细胞杂种植株。这些杂种植株的成功再生为棉花体细胞杂交技术的建立奠定了坚实的基础。此外,本实验室也已成功获得了陆地棉与克劳茨基棉和澳洲棉等几个体细胞杂种植株,目前正在进行杂种遗传特性的鉴定(表1)。

2 棉花原生质体培养和体细胞杂交技术

2.1 棉花原生质体的分离与纯化

2.1.1 原生质体分离材料的选择。外植体的基因型、材料的类型及生理状态、发育时期等均能显著地影响棉花原生质体分裂、增殖和再生。不同基因型分离的原生质体,其原生质体得率和活力差别很大。植物的各个器官,如根、茎、叶、子叶、下胚轴、果实、种子、愈伤组织和悬浮细胞都可作为分离原生质体的材料^[29],棉花主要用愈伤组织、胚性悬浮细胞系和叶片组织等^[8,16-23]。不同组织分离得到的原生质体再生能力差异明显。Khasanoy等^[17]分离棉花叶肉细胞和表皮细胞原生质体培养,发现表皮细胞分离的原生质体易分裂产生细胞团。胚性愈伤组织分离的原生质体呈圆形,体积小细胞质浓厚,比活体器官组织分离的原生质体容易再生细胞壁,能持续分裂形成细胞团或愈伤组织,并具有较强的胚胎发生能力^[9,24]。孙玉强等^[3]将棉花活体组织和愈伤组织分离的原生质体进行培养,发现其分裂能力不强,易褐化死亡等,仅仅能形成少量小细胞团,而胚性细胞悬浮系和体细胞幼胚分离的原生质体,容易得到再生植株。本实验室的研究结果也表明胚性细胞悬浮系分离的原生质体再生能力较强,而且分离获得的原生质体分裂能力强、增殖快,可以得到大量的同步发育的均一胚性细胞,有效地避免细胞间的生理状态的差异对原生质体培养的影响。

2.1.2 原生质体分离方法。目前,主要用酶解法分离原生质体,即利用纤维素酶、果胶酶、半纤维素酶的CPW溶液消化细胞壁。酶解效果受多个因素如酶液种类和浓度,酶解时间、温度和处理方式以及酶液渗透压等的影响^[30]。另外,加入适量的PVP(Poly Vinyl Pyrrolidone)或MES[Disodium Laureth(3) Sulfosuccinate]可稳定酶解过

程中的pH值,对于分离原生质体较为有利。Sun等^[3]用3.0%(W/V,下同)纤维素酶(Onozuka R-10, Yakult Honsha, Tokyo),1.5%果胶酶(Serva, Heidelberg, Germany),0.5%半纤维素酶(Sigma)混合酶液,黑暗轻摇酶解20h获得高质量的原生质体,其有活力的原生质体达到90%。本实验室分离棉花原生质体所用酶液组合为3.0% Cellulase Onzuka RS (Yakult, Japan),1.0% Mecerozyme Onozuka R-10 (Yakult, Japan),酶解20~24h可得到高质量的原生质体。

2.2 棉花原生质体培养和植株再生

2.2.1 培养基组成成分。常用 KM_8P 和K3培养基。余建民等^[28]用K3培养基培养3个材料的棉花原生质体都得到再生愈伤组织且重复性好,认为K3培养基适合于棉花原生质体培养;Saka等^[22]认为棉花原生质体只有在K3培养基上培养才能持续分裂形成细胞团并发育成愈伤组织。这些结果说明K3培养基比较适宜用作棉花原生质体培养。同时,陈志贤等^[9]、吕复兵等^[15]和Sun等^[3]用改良的 KM_8P 进行棉花原生质体培养得到再生植株,在K3培养基中添加 KM_8P 有机物比较适合棉花的原生质体培养。

2,4-D是原生质体启动分裂和诱导出愈所必需的,平衡培养基中生长素和细胞分裂素的含量和及时更换新鲜培养基有利于细胞分裂^[8],而且用葡萄糖和甘露醇配合作碳源和渗透压稳定剂能促使棉花原生质体细胞壁的再生、细胞分裂和细胞团的增殖^[4]。棉花原生质体培养对氨态氮和硝态氮的用量及其比例较敏感^[9-10],添加谷氨酰胺、天冬酰胺等有机物能不同程度地提高原生质体分裂的频率,促进细胞团形成。培养基中附加 NH_4NO_3 和 $CaCl_2$ 可增加原生质体的存活率^[16]。棉花原生质体培养的pH值应控制在5.6~5.8。

2.2.2 原生质体培养方法。冬酰胺等有机物能不同程度地提高原生质体分裂的频率,促进细胞团丝常采用液体浅层培养法,因操作方便,通气性好,代谢的废物易扩散,便于添加新鲜培养基和转移培养物,而获得了较好的效果,如Sun等^[3-4]通过该方法成功培养了多种棉花原生质体。琼脂糖包埋培养也被采用,它可以避免细胞间有害代谢产物的影响,便于定点观察,而且琼脂糖对许多植物的原生质体生长有促进作用。另外,液固双层培养、悬滴培养和看护培养等方法也适合于棉花原生质体培养,如Peerters^[11]等通过看护培养获

得 Coker312 原生质体再生植株。上述 3 种培养方法均能顺利地获得再生愈伤组织和植株,但愈伤组织形成时间有明显的差异,以琼脂糖包埋培养方法速度最快。

2.3 棉花体细胞杂交

植物体细胞杂交,也称原生质体融合,是现代生物技术的重要组成部分,它能克服传统有性杂交育种常见的不亲和性、雌雄配子不育等杂交障碍,转移细胞核中的染色体组、染色体片段或细胞质中的叶绿体 DNA 和线粒体 DNA,突破作物品种改良过程中基因资源重组的局限性。

棉花体细胞杂交最重要的技术就是融合方法。目前,主要有以聚乙二醇(PEG)为融合剂诱导原生质体融合的方法。但 PEG 法的融合效果受 PEG 种类与浓度等多种因素的影响^[31],故其融合频率较低,一般只有 1%~5%。虽然用聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、藻酸钠和葡聚糖(Dextran)作融合剂融合频率可达 10%,二甲基亚砷、链霉菌蛋白酶等作融合促进剂,能显著地提高融合频率,但操作过程繁琐,且 PEG 对植物原生质体有较大的毒性,甚至导致线粒体严重破坏^[32]。相对来说,电融合法具有对原生质体损伤小、易操作、融合率高(15%以上)等优点,自 Senda 等^[33]首先报道了电场诱导细胞融合成功后,该技术已得到广泛的应用,并表现出比 PEG 法更多的优越性。目前,棉花原生质体电融合取得了较大的成功,孙玉强等报道通过电融合得到陆地棉和多个野生棉的体细胞杂种^[5-7]。本实验室也得到了陆地棉、野生棉克劳次基棉、澳洲棉的体细胞杂种。

3 棉花原生质体培养和体细胞杂交存在的问题及应用前景

尽管棉花原生质体培养和体细胞融合已取得了长足的进展,但目前还存在一些技术问题需要解决,主要包括:(1)原生质体培养受基因型限制。目前原生质体培养成功的例子主要还集中于少量几个易于培养和植株再生的种质系,对于大多陆地棉品种来讲,原生质培养植株再生难度还很大。而且作为另一个融合的亲本野生棉也仅限于可以得到胚性愈伤组织或体细胞幼胚的几个棉种,而使用野生棉植株上的活体组织器官进行融合还有一定的困难。因此,需继续加强对多个陆地棉和野生棉进行组织培养研究,寻找方便快捷的组培

体系和胚性愈伤组织保存等体系,扩大陆地棉和野生棉的再生基因型范围,为原生质体培养和融合提供材料。另外,虽然野生棉有 40 多个棉种,但是国内保存的野生棉种并不完全,主要由中国农科院棉花研究所海南野生棉种植园保存。所以,收集保存这些野生种很有必要。(2)原生质体培养率低、培养周期长、畸形率高。针对这些问题,可从材料选择、培养密度和方法,以及激素配比等优化原生质体培养体系^[34-35],提高棉花原生质体培养效果。利用胚性愈伤组织或胚性细胞悬浮系分离棉花原生质体,可以除去已经衰老生活力差的细胞,使再生细胞在培养过程中持续分裂,并可消除培养过程中的酚类物质的毒害作用,减少原生质体培养再生细胞团和愈伤组织的褐化现象,提高愈伤组织的分化和植株再生^[17]。在培养过程中,及时更换培养基和适时调节渗透压,可以促进细胞分裂和愈伤组织形成^[29]。培养密度是影响棉花原生质体持续分裂的重要因素之一,棉花原生质体培养比较适宜的密度是 5×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 左右,不同的棉花品种原生质体培养密度有所不同,不同的培养方式所需原生质体密度也不相同。看护培养法的密度应为 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ ^[11],液体浅层法则要求 10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ ^[9-10]。对难于再生的材料,适当增加原生质密度可提高原生质培养的再生效果。(3)体细胞杂交、植株再生难度较大。棉花体细胞杂交过程中,电融合为简洁、方便、融合效率高的原生质体融合方法,但是它会对原生质体产生一定的伤害。因此,应尽量减少电击次数和融合时间,或者试着通过添加血红蛋白、DMSO 等来保护原生质体,提高融合再生率。原生质体融合以后,融合细胞倍性增加,导致分裂分化能力降低,造成大量的畸形胚和畸形苗,需在再生过程中调节激素和微环境等来促进正常植株再生。此外,体细胞杂种拥有双亲的细胞质和细胞核物质,可能会因遗传或生理的不协调而造成不育。延长杂种生育时间、控制光照、连续回交是克服体细胞杂种不育的主要方法。

棉花原生质体培养及体细胞杂交技术的建立在棉花育种上潜在很大的应用价值和发展前景。首先由于原生质体融合不仅可以创造新植物种,而且在遗传操作研究中有其独到之处,棉花许多农艺性状和纤维品质性状是受多基因控制的,用基因工程方法目前还很难进行多基因控制性状的转移,通过原生质体融合则可能实现多基因或整

个基因组的转移重新组合,从而创造崭新的遗传型。其次,棉属野生种中存在着许多有益的抗逆性状,如耐干旱、耐盐和抗病虫性等,可以通过体细胞杂交将野生棉种的有益性状转移到栽培棉中,提高棉花的抗逆性和改良品质。此外,胞质杂交还可以转移和改良细胞质基因控制的性状如胞质雄性不育特性 CMS 等,对于棉花遗传改良具有十分重要的作用。

参考文献:

- [1] TAKEBE I, Labib G, Melchers G. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco[J]. *Naturwissenschaften*, 1971, 5: 318-320.
- [2] BEASLEY C A, Ting I P. The effects of plant growth substances on *in vitro* fiber development from fertilized cotton ovules[J]. *Amer J Bot*, 1973, 60: 130-139.
- [3] SUN Y Q, Zhang X L, Huang C, et al. Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of six explants in Coker 201 (*Gossypium hirsutum*) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 82: 309-315.
- [4] SUN Y Q, Zhang X L, Huang C, et al. Factors influencing *in vitro* regeneration from protoplasts of wild cotton (*G. klotzschianum* A.) and RAPD analysis of regenerated plantlets [J]. *Plant Growth Regulation*, 2005, 46: 79-86.
- [5] SUN Y Q, Zhang X L, Nie Y C, et al. Production and characterization of somatic hybrids between upland cotton (*Gossypium hirsutum*) and wild cotton (*Gossypium klotzschianum* Anderss) via electrofusion [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 472-479.
- [6] SUN Y Q, Zhang X L, Nie Y C, et al. Production of fertile somatic hybrids of *Gossypium hirsutum* + *G. bickii* and *G. hirsutum* + *G. stockii* via protoplast fusion [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 83: 303-310.
- [7] SUN Y Q, Nie Y C, Guo X P, et al. Somatic hybrids between *Gossypium hirsutum* L. (4x) and *G. davidsonii* Kellog (2x) produced by protoplast fusion [J]. *Euphytica*, 2006, 151(3): 393-400.
- [8] EL-SHIHY O M, Evans P K. Protoplast isolation, culture and plant regeneration of cotton (*Gossypium barbadense* L.) [C]. 6th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Abstract Proc, Minnesota, 1986, 52.
- [9] 陈志贤, 李淑君, 岳建雄, 等. 从棉花胚性细胞原生质体培养获得植株再生 [J]. *植物学报*, 1989, 31: 966-969.
- [10] 余建民, 吴敬音, 王海波, 等. 棉花 (*Gossypium hirsutum* L.) 原生质体培养的体细胞胚胎发生及植株再生 [J]. *江苏农业学报*, 1989, 5: 54-60.
- [11] PEETERS M C, Willems K, Swennen R. Protoplast-to-plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker312) using feeder layers [J]. *Plant Cell Rep*, 1994, 13: 208-211.
- [12] 李仁敬, 孟庆玉, 李淑君, 等. 新疆长绒棉胚性悬浮细胞原生质体再生 [J]. *细胞生物学杂志*, 1995(增): 1-27.
- [13] 孟庆玉, 孙 严, 李仁敬. 新疆长绒棉胚性悬浮细胞原生质体的培养及再生 [J]. *新疆农业科学*, 1996: 249-251.
- [14] 王喆之, 张苏锋, 胡正海. 陆地棉胚性愈伤组织原生质体的制备、培养及植株再生 [J]. *植物学报*, 1998, 40(3): 234-240.
- [15] 吕复兵, 张献龙, 刘金兰. 陆地棉原生质体培养与植株再生 [J]. *华北农学报*, 1999, 14(1): 73-78.
- [16] BHOJWANI S S, Power J B, Cocking E C. Isolation, culture and division of cotton callus protoplasts [J]. *Plant Sci Lett*, 1977, 8: 85-89.
- [17] KHASANOV M M, Butenko R G. Cultivation of isolated protoplasts from cotyledons of cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. *Fiziol Rass*, 1979, 26: 103-108.
- [18] FINER J J, Smith R H. Isolation and culture of protoplasts from cotton (*Gossypium Klotzschianum* Anderss) callus cultures [J]. *Plant Sci Lett*, 1982, 26: 147-151.
- [19] THOMAS J C, Katterman F R. The control of spontaneous lysis of protoplasts from *Gossypium hirsutum* anther callus [J]. *Plant Sci Lett*, 1984, 36: 149-154.
- [20] FIRROZABADY F, DeBoer D L. Isolation, culture, and cell division in cotyledon protoplasts of cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*) [J]. *Plant Cell Rep*, 1986, 5: 127-131.
- [21] RENFROE M H, Hatwig R C, Smith R H. Isolation and culture of cotton protoplasts [C]. Proceedings Beltwide Cotton Production Research Conferences, 1986, 79-80.
- [22] SAKA K, Katterman F R, Thomas J C. Cell regeneration and sustained division of protoplasts from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 1987, 6: 470-472.
- [23] 余建民, 吴敬音, 王海波, 等. 亚洲棉细胞悬浮培养物

- 原生质体的分离和培养[J]. 江苏农业科学, 1988, 4 (增刊): 52-55.
- [24] WANG Z Z, Zhang D L, Zhang S F, et al. Plant regeneration from protoplasts of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Physiol Plant*, 1991, 82: 17.
- [25] SHE J M, Wu J Y, Zhou H Y. High frequency of plating efficiency and plant regeneration from protoplasts of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Acta Agriculturae Sinica*, 1991, 2: 109-113.
- [26] 陆振鑫, 夏镇澳. 戴维逊氏棉的组织培养与原生质体培养研究[J]. 植物学报, 1991, 33(2): 98-103.
- [27] JAYASHANKER R, Dani R G, Diatullina D L. The use of cotton protoplasts in cell fusion studies [J]. *Physiol plant*, 1991, 82: 25.
- [28] LÜ F B, Zhang X L, Liu J L. Protoplast culture and plant regeneration in upland cotton [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 1999, 14(1): 73-78.
- [29] 夏镇澳. 植物原生质体培养理论、技术研究进展 [J]. 农业科学集刊, 1995, 2: 1-6.
- [30] 孙勇如, 安锡培. 植物原生质体培养 [M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [31] 迟吉娜, 马峙英, 韩改英, 等. 陆地棉组织培养体细胞胚胎发生技术改进 [J]. 棉花学报, 2005, 17(4): 195-200.
- [32] BENBADIS A, Virville J D. Effects of polyethylene glycol treatment used for protoplast fusion and organelle transplantation on the functional and structural integrity of mitochondria isolated from spinach leaves [J]. *Plant Sci Lett*, 1982, 26: 257-264.
- [33] SENDA M T, Akeda J, Abe S, et al. Induction of cell fusion protoplasts by electrical stimulation [J]. *Plant and Cell Physiol*, 1979, 27(7): 1441-1443.
- [34] 夏启中, 张献龙, 袁以春, 等. 棉花胚性细胞悬浮系的建立及其影响因素分析 [J]. 棉花学报, 2005, 17(1): 12-17.
- [35] 冷春旭, 李付广, 刘传亮. 亚洲棉再生体系研究进展 [J]. 棉花学报, 2005, 17(3): 178-181. ●