

‘富士’苹果花粉原生质体分离初探

张 宁, 李 威, 顾钊宇, 陈秋菊, 段续伟, 杨 清, 李天忠*

(中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193)

摘 要: 以‘富士’苹果 (*Malus × domestica* Borkh. ‘Fuji’) 成熟花粉为试材, 采用“萌发—酶解二步法”, 初步探讨了影响原生质体分离的关键因子, 获得了花粉原生质体分离的最佳条件: 用萌发后 45 min 的花粉, 转入含 1%纤维素酶和 1%离析酶的混合酶液中, 以 18%甘露醇调节渗透压, 静置酶解 6 h, 花粉原生质体分离效率可达 6.83%, 用 0.1%荧光增白剂检测表明脱壁完全, 用 0.01% FDA 检测表明其具有生活力, 可以作为后续细胞融合等的材料。

关键词: 苹果; 花粉; 原生质体; 分离

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 06-1167-08

Preliminary Study on the Isolation of Mature Pollen Protoplasts in ‘Fuji’ Apple

ZHANG Ning, LI Wei, GU Zhao-yu, CHEN Qiu-ju, DUAN Xu-wei, YANG Qing, and LI Tian-zhong*
(College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Little information is available about the research on plant pollen protoplasts, especially the isolation of apple pollen protoplasts. In this study, the protoplasts from mature pollen of *Malus × domestica* Borkh. ‘Fuji’ by the method of ‘germination-enzymatic treatment’ were isolated. To screen the most effective condition of isolation, some key factors were analyzed. The results indicated that: The isolation percentage was up to 6.83% when the pollens germinating for 45 min and then treated with mixed enzyme solution including 1% Cellulase Onozuka R-10, 1% Macerozyme R-10 and 18% Mannitol for 6 h. The cell walls of isolated protoplasts were degraded entirely according to the examination of 0.1% calcoflower white staining. 0.01% fluorescein diacetate (FDA) staining indicated the protoplasts were viable. Therefore, the proroplasts can be used for further research.

Key words: apple; pollen; protoplast; isolation

植物花粉原生质体兼具单倍体与原生质体的双重优点, 为细胞融合、基因操作和突变研究提供了极大的方便, 也为花粉生理学和个体发育的研究开辟了新的途径 (Bajaj & Davey, 1974)。花粉原生质体分离研究始于 20 世纪 70 年代, 起步相对较晚, 进展也比较缓慢。目前花粉原生质体分离体系较为成熟的植物材料多为草本植物, 如烟草、马铃薯、部分芸薹属作物, 也有一些单子叶花卉植物 (Bhojwani & Cocking, 1972; Power, 1973; 周嫦, 1988; 李仕琼 等, 1992; 李昌功 等, 1994;

收稿日期: 2015 - 03 - 17; **修回日期:** 2015 - 05 - 20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171941, 31372035)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: litianzhong1535@163.com)

汪泳和周嫦, 1995; 王蒂等, 1999; 张峰等, 2004)。1980年, Redenbaugh等(1980)首次从美洲榆的四分体和小孢子中分离出了原生质体。同年, Duhoux(1980)从绿干柏的花粉中分离出了少量原生质体。

果树花粉原生质体的研究比较有限。早期 Niizeki等(1983)和 Patat-Ochatt等(1993)分别用苹果花药愈伤组织和单倍体试管苗分离原生质体。此过程不仅步骤繁琐、耗时长, 影响因素较多, 而且花药在培养过程中会发生多倍化、核融合等现象, 难以保证其形成的愈伤组织或植株的单倍性。1990年, 邓秀新和章文才(1990)从枳和柠檬的花粉中成功分离出原生质体。随后, 在酸枣(牛瑜菲, 2010)和葡萄(廖芬等, 2011)的花粉中也得到了原生质体。

目前苹果原生质体分离所用材料多为叶片(肖建会, 2002; 何道一和孙山, 2004; 魏国芹等, 2009), 至今未见苹果花粉原生质体分离的相关报道。

本研究中以‘富士’苹果成熟花粉为材料, 对影响其原生质体分离的诸因素进行探索, 旨在确定适合苹果花粉原生质体的分离条件, 以为苹果花粉基因的研究、遗传改良和新品种的培育提供材料基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

2014年4月在中国农业大学上庄实验站取‘富士’苹果(*Malus × domestica* Borkh. ‘Fuji’)蕾期花药, 于20℃室温条件下阴干散粉后, 将花粉置于-20℃冰箱中干燥保存备用。

1.2 不同浓度酶解液处理

参考王玉萍(2000)和张峰等(2004)的方法, 取直径约3cm的平板培养皿, 加入适量花粉液体培养基(10%蔗糖、0.01%硼酸); 称取100mg花粉, 轻轻散于培养基表面, 在(25±1)℃、黑暗条件下萌发1h后, 2000r·min⁻¹离心2min收集花粉, CPW溶液(成分见表1)洗涤两次后, 加入10mL不同浓度酶解液(以CPW溶液为溶剂, 加入0.1% MES、0.5% PVP和0.01% BSA, 调节pH至5.6, 用0.22μm滤膜过滤灭菌), 用18%甘露醇调节渗透压, 于(25±1)℃、黑暗条件下静置酶解5h。用Olympus CX31显微镜观察原生质体并拍照, 统计分离效率(视野内的原生质体数/视野内的花粉数)。每次取10个视野, 3次重复。

表1 CPW溶液组成
Table 1 Composition of CPW

组成 Composition	浓度/(mg·L ⁻¹) Concentration
KNO ₃	101.0
KH ₂ PO ₄	27.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1480.0
KI	0.16
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025

1.3 不同渗透压调节剂处理

用浓度最适宜的酶解液, 以葡萄糖、蔗糖、甘露醇和山梨醇4种多糖调节渗透压, 均设5个浓度梯度, 10%、14%、18%、22%和26%, 统计花粉原生质体分离效率, 确定最适宜的渗透压调节剂种类及其浓度。

1.4 不同萌发时间试验

取萌发后 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2 和 2.5 h 的花粉, 在最适宜的酶解液浓度和渗透压下, 于 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 、黑暗条件下静置酶解 5 h, 统计原生质体的分离效率, 确定最佳的萌发时间。

1.5 不同酶解时间及方式试验

取最适萌发时间下萌发的花粉, 置于最佳酶解液中, 分别用静置和 $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡两种酶解方式, 酶解 1、2、3、4、5、6、7 和 8 h, 统计原生质体的分离效率, 确定最佳的酶解方式及时间。

1.6 脱壁效果与活力鉴定

采用荧光增白剂 (calcoflower white 0.1%) 鉴定花粉原生质体的脱壁效果, 置于 Olympus BX61 下观察是否有荧光。

用伊文思蓝 (Evans blue 0.025%) 和荧光素二醋酸酯 (FDA 0.01%) 两种染色方法染花粉原生质体, 分别用 Olympus CX31 和 Olympus BX61 观察, 鉴定原生质体活力的有无。伊文思蓝染色法: 被染成蓝色的为死原生质体, 未被染色的为活原生质体。荧光素二醋酸酯 (FDA) 法: 发荧光的为活原生质体, 不发荧光的为死原生质体。

1.7 数据统计分析

试验数据用 SPSS17.0 软件, 比较均值—单因素方差 *LSD* 法进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度酶解液对花粉原生质体分离的影响

在原生质体分离过程中, 酶的浓度对比对原生质体的分离效率有很大影响。对于苹果花粉, 当纤维素酶与离析酶的浓度均为 1% 时, 原生质体的分离效率最大, 为 5.89% (表 2); 当两种酶的浓度均为 1.5% 时, 原生质体的分离效率偏低, 仅为 1.41%。

两种酶的浓度均为 1.5% 时, 显微镜视野下会看到较多原生质体碎片 (图 1, A), 伊文思蓝染色后发现许多花粉被染色, 表示花粉已死亡 (图 1, B)。

表 2 不同浓度酶解液对分离原生质体效果的影响
Table 2 Effects of different enzyme composition on protoplasts isolation

纤维素酶/% Cellulase Onozuka R-10	离析酶/% Macerozyme R-10	花粉数 Number of observed pollen	花粉原生质体数 Number of pollen protoplasts	分离效率/% Isolation percentage
0.5	0.5	615	11	$1.79 \pm 0.04 \text{ e}$
0.5	1.0	574	22	$3.83 \pm 0.72 \text{ c}$
0.5	1.5	587	26	$4.43 \pm 0.13 \text{ b}$
1.0	0.5	535	14	$2.62 \pm 0.03 \text{ d}$
1.0	1.0	526	31	$5.89 \pm 0.11 \text{ a}$
1.0	1.5	527	10	$1.90 \pm 0.09 \text{ e}$
1.5	0.5	581	11	$1.89 \pm 0.17 \text{ e}$
1.5	1.0	562	26	$4.63 \pm 0.21 \text{ b}$
1.5	1.5	567	8	$1.41 \pm 0.45 \text{ e}$

注: 同列数据后不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。下同。

Note: Values followed by the different letters in a column are significantly different ($P < 0.05$). The same below.

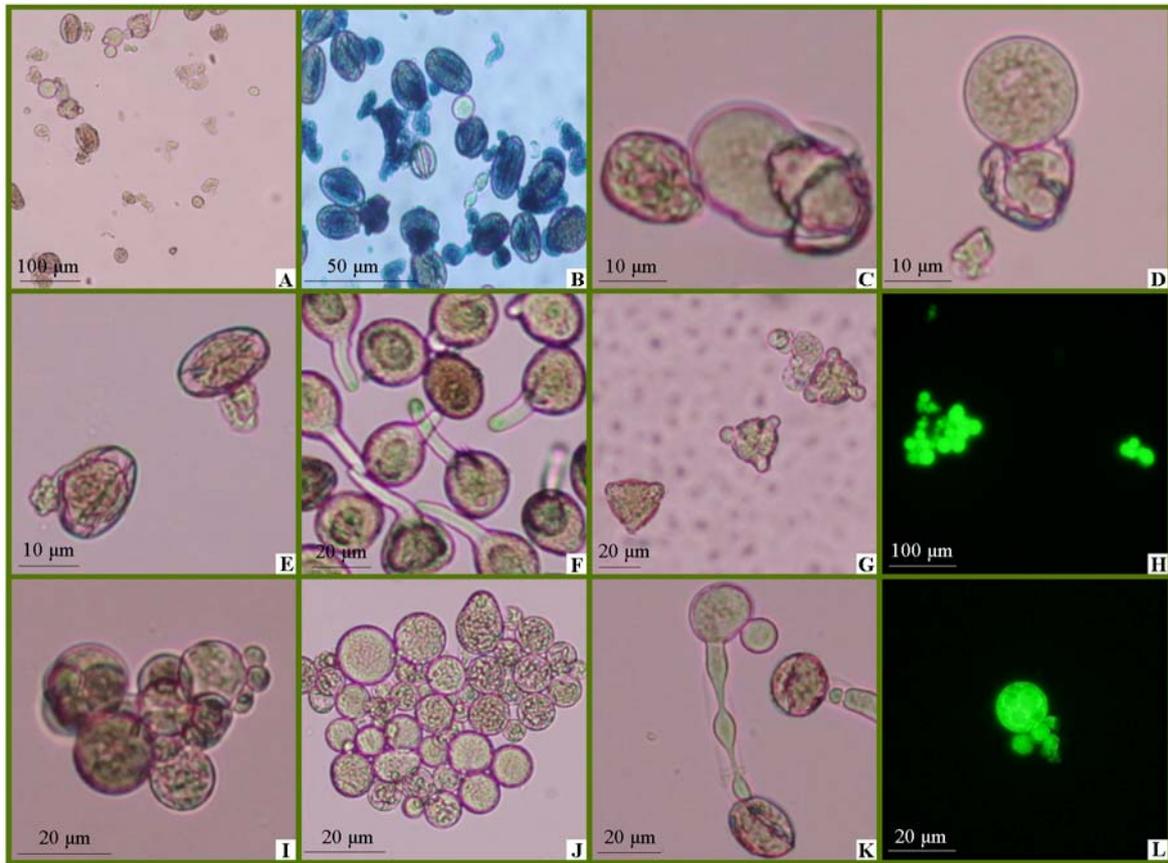


图 1 花粉原生质体分离

- A: 原生质体碎片; B: 被染色的花粉; C: 正在释放的原生质体; D: 完全释放出的原生质体; E: 严重质壁分离的花粉;
 F: 萌发 0.75 h 后的花粉; G: 酶解后呈三角形的花粉; H: FDA 检测有活力的亚原生质体 (暗场);
 I: 静置酶解 8 h 后的亚原生质团; J: 振荡酶解 5 h 后的亚原生质团;
 K: 正在释放的亚原生质体; L: FDA 检测有活力的原生质体 (暗场)。

Fig. 1 The Isolation of Pollen Protoplasts

- A: Protoplast fragments; B: Stained pollen; C: Releasing protoplast; D: Completely released protoplast; E: Serious plasmolysis pollen;
 F: Pollen germinated 0.75 h; G: Triangular pollen after enzymolysis; H: Viable sub-protoplasts tested by FDA (dark field);
 I: Sub-protoplasts after 8 h static isolation; J: Sub-protoplasts after 5 h oscillating isolation; K: Releasing sub-protoplast;
 L: Viable protoplast tested by FDA (dark field) .

2.2 不同种类和浓度的渗透压调节剂对花粉原生质体分离的影响

从图 2 中可以看出, 以 18% 的甘露醇作渗透压调节剂最佳, 原生质体的分离效率达 5.94%; 14% 的甘露醇次之, 分离效率为 5.73%, 二者差异不显著。山梨醇最不适合作苹果花粉原生质体的渗透压调节剂, 最佳分离效率仅为 4.15%。

在显微镜下观察到, 18% 甘露醇中的有部分花粉会从花粉管断裂处溢出原生质体来 (图 1, C、D), 而在 26% 甘露醇中的多数花粉则发生了严重的质壁分离, 少部分花粉从缺口处溢出了内含物 (图 1, E)。

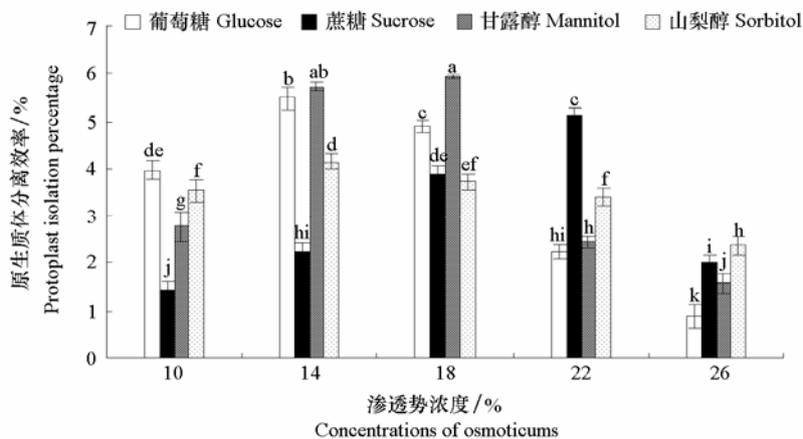


图 2 不同种类和浓度渗透压调节剂对原生质体分离效率的影响

Fig. 2 Effect of different osmoticums and its concentrations on pollen protoplast isolation

2.3 不同萌发时间对花粉原生质体分离的影响

花粉酶解前萌发时间的长短是影响其原生质体分离的一个重要因素。经过不同萌发时间的花粉在最适混合酶解液（1%纤维素酶和 1%离析酶）和最适渗透压（18%甘露醇）下原生质体的分离效率见表 3。花粉萌发 0.75 h 后（花粉管长度约与花粉粒直径相等，图 1，F）转入酶解液中可以得到较多的花粉原生质体，分离效率最高，为 6.69%。

当萌发时间过短时，大部分花粉未萌发，酶解后原生质体会分别从花粉粒易被酶解的 3 个萌发孔处挤出，形成三角形（图 1，G）；当萌发时间过长时，花粉管过长，原生质体产量下降，而花粉管亚原生质体产量增加。从表 3 中可见，萌发 2.5 h 以上的花粉分离出的亚原生质体最多（分离效率 > 26.00%），萌发 2.5 h 的花粉管长度约为花粉直径的 4 倍，FDA 染色表明这些亚原生质体具有活性（图 1，H）。

表 3 萌发时间对原生质体分离效率的影响

Table 3 Effect of germination duration on isolation of pollen protoplasts

萌发时间/h Duration of germination	观察花粉数 Number of observed pollen	花粉原生质体 Pollen protoplast		亚原生质体 Sub-protoplast	
		数量 Number	分离效率/% Isolation percentage	数量 Number	分离效率/% Isolation percentage
0.25	527	15	2.84 ± 0.14 f	25	4.74 ± 0.18 c
0.50	556	25	4.50 ± 0.09 d	93	16.73 ± 1.24 b
0.75	583	40	6.69 ± 0.23 a	110	18.87 ± 1.03 b
1.00	574	34	5.92 ± 0.26 b	122	21.25 ± 0.52 ab
1.50	558	30	5.38 ± 0.24 c	146	26.16 ± 1.25 a
2.00	580	21	3.62 ± 0.19 e	151	26.03 ± 2.27 a
2.50	573	16	2.79 ± 0.25 f	151	26.35 ± 0.99 a

2.4 不同酶解方式及时间对花粉原生质体分离的影响

利用萌发 0.75 h 的花粉，在 1%纤维素酶和 1%离析酶混合酶解液下，用 18%甘露醇调节渗透压，静置酶解 6 h 时花粉原生质体产量最大，分离效率为 6.83%；超过 6 h，花粉原生质体的分离效率显

著下降，而亚原生质体的分离效率则显著上升，在酶解 8 h 时达到 40.59% (表 4)，显微镜视野下可看到较多亚原生质团 (图 1, I)。

将花粉转入酶解液后置于黑暗条件下 $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡酶解，结果发现振荡酶解并不能促进苹果花粉原生质体的释放，其最佳酶解时间仍为 6 h，最高分离效率仅为 4.65%。但振荡酶解条件下亚原生质体的分离效率显著提高，仅 1 h 后就有大量亚原生质体释放出来 (表 4)，且各酶解时间之间均无显著差异。显微镜下可以看到聚集成簇的亚原生质体团，体积和数量明显大于静置酶解 (图 1, J)。然而随着时间的延长，亚原生质体的分离效率并无显著增加，且镜下观察视野中的碎片明显增多。

表 4 酶解方式及时间对原生质体分离效率的影响
 Table 4 Effects of different methods and time of enzyme dissolve on protoplasts isolation

酶解方式 Methods of enzyme dissolve	酶解时间/h Time of enzyme dissolve	原生质体分离效率/% Isolation percentage of protoplasts	亚原生质体分离效率/% Isolation percentage of sub-protoplasts
静置 Static	1	0.70 ± 0.08 h	9.98 ± 1.45 d
	2	2.18 ± 0.20 g	19.42 ± 1.76 c
	3	2.63 ± 0.27 f	23.12 ± 1.98 c
	4	4.73 ± 0.41 d	23.29 ± 1.84 c
	5	5.92 ± 0.15 b	25.00 ± 1.21 c
	6	6.83 ± 0.91 a	31.33 ± 1.59 b
	7	5.28 ± 0.33 c	32.75 ± 0.12 b
	8	4.24 ± 0.17 e	40.59 ± 2.03 a
振荡 Shake	1	0.96 ± 0.08 c	29.36 ± 1.06 a
	2	2.10 ± 0.16 bc	30.49 ± 0.23 a
	3	2.66 ± 0.98 abc	28.90 ± 2.76 a
	4	3.23 ± 1.22 ab	29.96 ± 1.79 a
	5	3.79 ± 1.89 ab	28.57 ± 2.83 a
	6	4.65 ± 0.92 a	29.46 ± 2.43 a
	7	3.95 ± 1.81 ab	30.31 ± 2.44 a
	8	3.40 ± 0.18 ab	30.62 ± 2.82 a

3 讨论

苹果花粉外壁较厚且萌发孔较小，常用的“一步酶解法”和“水合一酶解二步法”难以从萌发沟处将外壁撑破。本试验借鉴汪泳和周嫦 (1995)、张峰等 (2004) 的方法，采用“萌发一酶解二步法”，待花粉管长到适宜长度时转入酶解液，通过对花粉管壁的降解从而打开缺口，释放出花粉原生质体。

酶解液的组成与所要分离的材料成分有很大关系。王蒂等 (1999) 和牛瑜菲 (2010) 分别以马铃薯和酸枣四分体时期的花蕾为试材，发现蜗牛酶是分离小孢子花粉原生质体的关键酶，它可以有效的分解去除四分体壁上的胼胝质；而张峰等 (2004) 以马铃薯成熟花粉为材料，发现用 1% 纤维素酶、1% 果胶酶和 0.5% 半纤维素酶的酶解液即可获得较多的花粉原生质体。此外，酶的适宜浓度也受酶解材料的影响。汪泳等 (1995) 用 1% 纤维素酶和 1% 果胶酶处理得到了烟草花粉的原生质体；廖芬等 (2011) 则用 2% 纤维素酶和 1% 果胶酶较好地分离出了葡萄花粉的原生质体，这可能与葡萄花粉内壁所含纤维素成分较多有关。牛瑜菲 (2010) 研究发现 1% 蜗牛酶和 1% 纤维素酶的混合酶液会对酸枣花粉造成毒害；王蒂等 (1999) 在对马铃薯花粉原生质体的分离中发现高浓度的酶解液中破碎的原生质体数增加。本试验以‘富士’苹果成熟花粉为材料，发现 1% 纤维素酶和 1% 离析酶的混合酶液可有效分离出花粉原生质体；而高浓度的酶解液会损害花粉及其原生质体。

由于失去了细胞壁的保护, 原生质体对外界渗透压的要求较高。已报道的花粉原生质体分离试验中, 适宜的渗透压调节剂多为甘露醇, 浓度从 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不等。酸枣四分体花粉原生质体以 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇为宜 (牛瑜菲, 2010), 马铃薯小孢子花粉原生质体的最佳渗透剂则为 16% 的蔗糖 (王蒂 等, 1999)。本试验中发现苹果花粉原生质体的最佳渗透剂为 18% 的甘露醇。可见渗透压也与材料有较大关系, 针对不同的材料需分别进行摸索。

在“萌发—酶解二步法”中, 萌发时间是影响花粉原生质体分离的又一重要因素。时间过短, 花粉只萌动而未萌发, 不能酶解出原生质体; 时间过长, 则易从花粉管中分离出亚原生质体。本研究中花粉最适的萌发时间为 0.75 h, 花粉管长度约等于花粉直径。这与吴旺泽(2004)和张峰等(2004)报道的马铃薯花粉的研究结果 (花粉萌发 0.5 h, 花粉管长度约为花粉粒直径的 1/2) 有所不同。可能的原因一是两种植物遗传背景相差较大, 花粉本身的生物学特性存在差异; 二是所用的苹果花粉采后贮存于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 其萌发活力和萌发同步性稍有下降。

亚原生质体是指花粉管中的原生质体发生质壁分离后, 会从几个不同的区域收缩, 经酶解后从花粉管释放出几个大小不等的原生质球 (Cocking, 1983), 如图 1, K 所示。朱澂等 (1984) 发现, 不论有核的还是无核的花粉管亚原生质体都具有再生壁和生长管状结构的能力, 使得亚原生质体有望成为遗传研究的新材料。本研究中首次从苹果花粉中分离得到了大量亚原生质体, 其花粉萌发的最佳时长为 2.5 h, 花粉管长度约为花粉直径的 4 倍。

对于‘富士’苹果花粉而言, 适宜的酶解时间为 6 h, 振荡酶解的方法不能有效提高原生质体的分离效率, 但可以提高亚原生质体的得率。这可能因为振荡的环境不利于原生质体的完整溢出, 但使其易从不同区域收缩, 进而释放出亚原生质体。

综上所述, 采用“萌发—酶解二步法”分离‘富士’苹果成熟花粉原生质体的最适分离条件为: 花粉萌发 0.75 h 后 (花粉管长度约等于花粉粒直径), 置于 1% 纤维素酶 (Cellulase Onozuka R-10) 和 1% 离析酶 (Macerozyme R-10) 混合酶解液中, 以 18% 甘露醇调节渗透压, 静置酶解 6 h。所得花粉原生质体经 0.1% 荧光增白剂检测脱壁完全, 0.01% FDA 鉴定具有较好的生活力 (图 1, L)。

References

- Bajaj Y P S, Davey M R. 1974. The isolation and ultrastructure of pollen protoplasts. Proceedings International Symposium on Fertilization in Higher Plants. Oxford: Oxford University Press.
- Bhojwani S S, Cocking E C. 1972. Isolation of protoplasts from pollen tetrads. Nature New Biol, 239: 29 - 30.
- Cocking E C. 1983. Plant biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press: 241 - 250.
- Deng Xiu-xin, Zhang Wen-cai. 1990. The isolation of *Citrus* tetrad microspore protoplast. Chinese Citrus, 19 (1): 7 - 8. (in Chinese)
- 邓秀新, 章文才. 1990. 柑桔四分体小孢子原生质体的分离. 中国柑桔, 19 (1): 7 - 8.
- Duhoux E. 1980. Protoplast isolation of gymnosperm pollen. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 99 (3): 207 - 214.
- He Dao-yi, Sun Shan. 2004. Plant regeneration from protoplasts of haploid induced by irradiation in apple. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 18 (6): 411 - 415. (in Chinese)
- 何道一, 孙 山. 2004. 苹果单倍体原生质体培养再生植株. 核农学报, 18 (6): 411 - 415.
- Li Chang-gong, Zhou Chang, Yang Hong-yuan. 1994. Isolation, culture and pollen cell protoplast fusion of *Brassica* young pollen protoplasts. Chinese Bulletin of Botany, (S1): 47. (in Chinese)
- 李昌功, 周 嫦, 杨弘远. 1994. 芸苔属植物幼嫩花粉原生质体分离、培养及花粉—体细胞原生质体的融合. 植物学通报, (S1): 47.
- Li Shi-qiong, Yang Hong-yuan, Zhou Chang. 1992. Release of pollen protoplast in large quantities in *Brassica napus* and *B. campestris* var. *purpurea*. Journal of Integrative Plant Biology, 31 (5): 339 - 345, 406. (in Chinese)
- 李仕琼, 杨弘远, 周 嫦. 1992. 甘蓝型油菜和紫菜苔花粉原生质体的大量分离. 植物学报, 31 (5): 339 - 345, 406.

- Liao Fen, Tang Wen-zhong, Huang Mao-kang, Zhou Zhu-gui. 2011. Isolation of protoplast from pollens of wine grape variety Guipu 1. Journal of Southern Agriculture, 42 (10): 1181 - 1184. (in Chinese)
- 廖芬, 唐文忠, 黄茂康, 周主贵. 2011. 酿酒葡萄桂葡一号花粉原生质体分离条件初探. 南方农业学报, 42 (10): 1181 - 1184.
- Niizeki M, Hidano Y, Saito K. 1983. Callus foremation from isolated protoplasts of apple. Jpn J Breed, 33: 369 - 374.
- Niu Yu-fei. 2010. Isolation of protoplasts and anther culture in Chinese jujube and wild jujube[M. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)
- 牛瑜菲. 2010. 枣及酸枣原生质体分离与花药培养的研究[硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Patat-Ochatt E M, Boccon-Gibod J, Duron M, Ochatt S J. 1993. Organogenesis of stem and leaf protoplasts of a haploid golden delicious apple clone (*Malus × domestica* Borkh.). Plant Cell Reports, 12: 118 - 120.
- Power J B. 1973. Plant tissue and cell culture. Berkeley: Univ Calif Press: 118 - 119.
- Redenbaugh M K, Westfall R D, Karnosky D F. 1980. Protoplast isolation from *Ulmus americana* L. pollen mother cells, tetrads, and microspores. Canadian Journal of Forest Research, 10 (3): 284 - 289.
- Wang Di, Si Huai-jun, Wang Qing. 1999. Isolation of pollen protoplasts in *Solanum tuberosum* L. Acta Horticulturae Sinica, 26 (5): 323 - 326. (in Chinese)
- 王蒂, 司怀军, 王清. 1999. 马铃薯花粉原生质体分离的研究. 园艺学报, 26 (5): 323 - 326.
- Wang Yong, Zhou Chang. 1995. Isolation of pollen protoplasts in *Nicotiana tabacum*. Journal of Integrative Plant Biology, 37 (5): 413 - 416. (in Chinese)
- 汪泳, 周嫦. 1995. 烟草花粉原生质体的分离. 植物学报, 37 (5): 413 - 416.
- Wang Yu-ping. 2000. Studies on isolation and culture of microspore protoplasts of *Solanum tuberosum* L. [M. D. Dissertation]. Lanzhou: Gansu Agricultural University. (in Chinese)
- 王玉萍. 2000. 马铃薯小孢子原生质体游离与培养的研究[硕士论文]. 兰州: 甘肃农业大学.
- Wei Guo-qin, Li Ding-li, Liang Mei-xia, Dai Hong-yi. 2009. Callus formation from cultured protoplasts in apple. Chinese Agricultural Science Bulletin, 25 (20): 179 - 186. (in Chinese)
- 魏国芹, 李鼎立, 梁美霞, 戴洪义. 2009. 苹果原生质体培养再生愈伤组织. 中国农学通报, 25 (20): 179 - 186.
- Wu Wang-ze. 2004. Isolation and culture of pollen protoplasts in *Solanum tuberosum* L. [M. D. Dissertation]. Lanzhou: Gansu Agricultural University. (in Chinese)
- 吴旺泽. 2004. 马铃薯花粉原生质体分离与培养[硕士论文]. 兰州: 甘肃农业大学.
- Xiao Jian-hui. 2002. Studies on the technique of the isolation, purification and culture of protoplast in apple[M. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)
- 肖建会. 2002. 苹果原生质体分离、纯化及培养技术研究[硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Zhang Feng, Wang Di, Wang Yu-ping. 2004. Isolation of mature pollen protoplasts in *Solanum tuberosum* L. Scientia Agricultura Sinica, 37 (9): 1358 - 1362. (in Chinese)
- 张峰, 王蒂, 王玉萍. 2004. 马铃薯成熟花粉原生质体分离. 中国农业科学, 37 (9): 1358 - 1362.
- Zhou Chang. 1988. Isolation and preliminary culture of pollen protoplasts from three kinds of plants. Journal of Integrative Plant Biology, 30 (4): 362 - 367. (in Chinese)
- 周嫦. 1988. 三种植物花粉原生质体的大量分离与初步培养. 植物学报, 30 (4): 362 - 367.
- Zhu Cheng, Xie Yi-ming, Hu Shi-yi. 1984. Isolation of sub-protoplasts from *Antirrhinum majus* L. pollen tubes and the behavior in the culture. Acta Botanica Sinica, 26 (5): 459 - 465, 561 - 562. (in Chinese)
- 朱澈, 谢一鸣, 胡适宜. 1984. 金鱼草花粉管亚原生质体的分离及在培养中的行为. 植物学报, 26 (5): 459 - 465, 561 - 562.