

The Summary of Plant Cell Fusion and Its Application*

Yukun Liu^{1,2}, Dongyu Liu^{1,2}, Anpei Zhou^{1,2}, Chengzhong He^{1,2#}

¹Key Laboratory for Forest Resource Conservation and Utilization in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming

²College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming
Email: beiming19870804@163.com, #hcz70@163.com

Received: Jun. 17th, 2013; revised: Jun. 28th, 2013; accepted: Jul. 1st, 2013

Copyright © 2013 Yukun Liu et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Plant cell fusion has become an important tool in plant improvement. Plant cell fusion allows researchers to combine somatic cells (partial or whole) from different cultivars, species or genera to generate novel genetic combinations including symmetric allotetraploid somatic hybrids, asymmetric somatic hybrids or somatic cybrids. Through bypassing problems sometimes associated with conventional sexual crossing, including sexual incompatibility, polyembryony and male or female sterility, the plant cell fusion can greatly facilitate the process of gene transfer or breeding. This short review summarizes the plant cell fusion and its application.

Keywords: Plant Cell Fusion; Application

植物细胞融合及应用概述*

刘玉鲲^{1,2}, 刘东玉^{1,2}, 周安佩^{1,2}, 何承忠^{1,2#}

¹西南林业大学西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室, 昆明

²西南林业大学林学院, 昆明

Email: beiming19870804@163.com, #hcz70@163.com

收稿日期: 2013年6月17日; 修回日期: 2013年6月28日; 录用日期: 2013年7月1日

摘要: 植物细胞融合已成为植物改良中的重要技术工具。这项技术使得研究者能部分地或全部地结合不同栽培型、不同种、甚至不同属的植物细胞, 培养出新型的遗传组合体, 包括对称的四倍体体细胞杂合体、非对称的体细胞杂合体或体细胞胞质杂合体。通过克服传统杂交育种中性的不亲合性、多倍性以及雄性不育或雌性不育等难题, 植物细胞融合能大大促进植物基因转移和育种的速度。本文简短地总结了植物细胞融合技术及其应用。

关键词: 植物细胞融合; 应用

1. 引言

细胞融合(cell fusion), 亦称体细胞杂交(somatic hybridization)、原生质体融合(protooplast fusion)、超

性杂交(parasexual hybridization)或超性融合(parasexual fusion), 是指不同种类的原生质体不经过有性阶段, 在一定条件下融合创造杂种的过程^[1]。通过克服传统杂交育种中性的不亲合性、多倍性以及雄性不育或雌性不育等难题, 植物细胞融合打破了仅仅依赖有性杂交重组基因创造新种的界限和生殖壁垒, 极大地扩大

*资助信息: 国家林业公益性行业科研专项(201104076); 云南省中青年学术与技术带头人后备人才培养基金项目(2012HB021)。

#通讯作者。

了遗传物质的重组范围^[2]。植物细胞融合又可将各种细胞器、DNA、质粒、病毒、细菌等外源遗传物质引入原生质体，从而有可能引起细胞遗传性的改变，为某些珍稀植物的快速繁殖、植物的复壮等提供了可行的方法，应用于植物育种、种质保存、无性系的快速繁殖和有用物质生产等^[3,4]。植物细胞融合技术避免了DNA的分离、提纯、剪切、拼接等操作，在技术和仪器设备上的要求不象基因工程那样复杂，投资少，有利于广泛开展研究和推广，有着重大的实践意义，正得到科学界的日益重视^[5,6]。发展至今，已从许多种内、种间、属间甚至亚科间的体细胞杂交获得杂种细胞系或杂种植株^[7]。

植物体细胞杂交技术虽然有其随机性的缺陷，但由于可转移细胞核中的染色体组、染色体片段，或者细胞质中的叶绿体DNA和线粒体DNA，因而使可利用的基因资源十分广泛。体细胞杂交在转移抗逆性状，进行作物改良，实现远缘重组，创造新型物种，以及定向转移胞质基因控制的性状和利用配子-体细胞杂交产生三倍体植物上显示出重要的应用前景。

2. 植物细胞融合的研究进展

2.1. 研究重点的转移

植物原生质体培养的成功是体细胞杂交发展的先决条件，纵观体细胞杂交的发展过程不难看出，其研究重点随着原生质体培养的发展一次次地发生了转移^[7]。早期原生质体培养(70年代)主要在茄科植物上获得成功，而后又广泛进行了十字花科和伞形科等的体细胞杂交^[8]。目前的体细胞杂交工作已多数集中于经济植物上，所得到的体细胞杂种丰富了作物的基因库，对直接应用或者进一步开展有性杂交育种工作都提供了宝贵的材料。如今，一些研究工作者把细胞融合技术运用在林木育种上。林木常规育种的特殊性，即生长周期长、有性不亲和等现象使得林木原生质体研究越来越受到人们的重视。体细胞杂交技术可克服远缘杂交的不亲和性，创造新的育种材料，为林木抗性育种带来一条新的途径。诸葛强等^[9]在1999年应用原生质体电融合技术首次得到了美洲黑杨和胡杨、青杨和胡杨、美洲黑杨和青杨等体细胞杂种愈伤组织，其中美洲黑杨和胡杨、青杨和胡杨的体细胞杂种愈伤组织可在附加0.4%氯化钠的培养基上生长，表

现出融合亲本之一胡杨的耐盐特性。林木体细胞杂交虽然现有的报道不多，但是随着林木原生质体培养的成功及融合方法、融合方式上的不断改进，林木体细胞杂交将有着广阔的应用前景^[10]。

2.2. 杂交组合的转变

植物体细胞杂交最初是从能通过有性杂交得到杂种植株的粉蓝烟草+郎氏烟草的原生质体融合获得突破的。于是，科学家们开始展开了丰富的设想。如Melchers等(1978)将有性杂交不亲和的番茄和马铃薯进行体细胞杂交，期望得到地上结番茄，地下长土豆的杂种，但结果并非如预期的那样，仅获得了外形偏向番茄，花、叶、果实具杂种特点的植株。与此同期或随后的实验中也有一些类似的组合，甚至更远缘的科间杂交。这些组合中得到的融合物大都不能分裂生长或仅开始分裂几次后便不再增殖，有些得到了连续增殖的细胞系，但却没有进一步分化^[7]。目前人们较多选用近缘种内或种间以及较近缘属间的杂交组合；和远缘的体细胞杂交相比较，它具有更强的目的性。

2.3. 杂交方式的转变

原生质体的融合方式常见的有两种：对称融合(图1)和非对称融合(图2)。通过这两种融合方式可产生3种类型的杂种：对称杂种、非对称杂种和胞质杂种。另外还有一类杂种叫异质杂种。同时，还有配子-体细胞融合和亚原生质体-原生质体融合^[11]。作物的一些重要经济性状，如胞质雄性不育，抗除莠剂阿特拉津的抗性基因都是由胞质基因控制的，通过原生质体融合进行细胞质基因重组，是一条可直接用于育种的简便途径，到目前为止，已有不少成功的例子^[11,12]。不对称融合中，施主染色体常丢失，克隆间有较大变异，X或 γ 射线量大时，远缘间组合力强。种间融合的部分杂种植株，在低射线量时，为三倍体，高射线量为近于五倍体的非整倍体。高射线量时，再分化和植株生长迟缓，无果实。最适射线量尚未确定^[12]。有人认为，用自单倍体植物而来的单倍体细胞、花粉细胞或异常减数分裂所得到的部分染色体和基因组，应用于不对称融合中是今后的重要研究课题。

2.4. 融合方法的改进

原生质体的融合方法也经历了一个逐步改进和

完善的过程。早期原生质体融合的方法有 NaNO_3 法、高 pH- Ca^{2+} 法、PEG(聚乙二醇)法, 后来逐渐发展为 PEG 与高 pH- Ca^{2+} 、高 pH 相结合, 20 世纪 80 年代初又开始探索使用电融合法, 并发展出一些其他方法 [13]。

PEG 法的融合频率可达 10%~15%, 无种属特异性, 几乎可诱导任何原生质体间的融合。近年来一些研究建议在 PEG 溶液中加入融合促进剂(如伴刀豆球蛋白、二甲基亚砷等), 可有效提高原生质体的融合频率 [14]。最近 PEG 诱导成对原生质体融合的成功, 使得 PEG 融合技术更精确化, 并有可能免除杂种细胞的筛选 [15]。

1979 年 Senda 建立的电融合法发展迅速, 是目前最流行的融合方法 [16]。该技术融合效率高, 是 PEG 的 100 倍, 操作简便、快速, 对细胞无毒无害, 可在

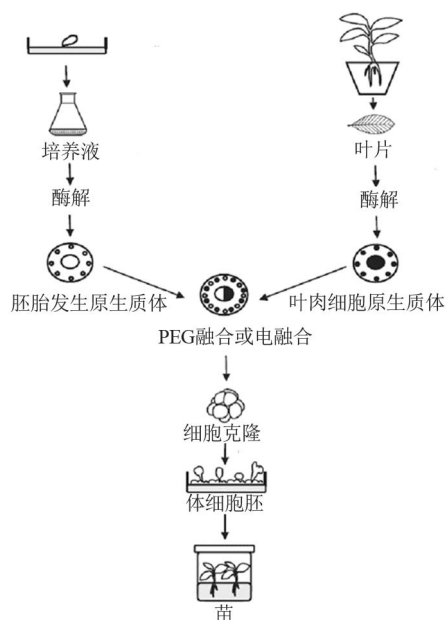


Figure 1. Illustration of symmetric protoplast fusion. Ovules of Parent 1 are introduced into culture as embryogenic calli. Embryogenic protoplasts are obtained through processes of enzymatic digestion and protoplast isolation. Mesophyll protoplasts are obtained from leaves of Parent 2 through enzymatic digestion and protoplast isolation. Protoplasts from both parents are fused using PEG or electrofusion and the main products are heterokaryons that combine cytoplasm and nuclei from both parents. Plantlets can be obtained by the formation of cell colonies, calli, somatic embryos

图 1. 原生质体对称融合图解。 父本 1 的胚珠诱导成胚胎发生的愈伤组织培养液。胚胎发生的原生质体经由酶解和原生质体分离得到。父本 2 的叶肉细胞原生质体经由叶片酶解和原生质体分离得到。两个父本的原生质体通过 PEG 或电融合得到含有两个父本细胞质和细胞核的异核体。小苗可通过细胞克隆、愈伤组织、体细胞胚的发生得到

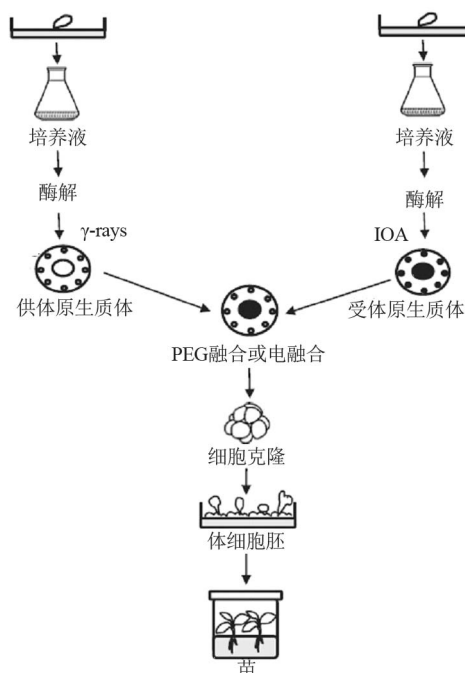


Figure 2. Illustration of asymmetric protoplast fusion using the donor-recipient method. Ovules of Parents 1 and 2 are introduced separately into culture as embryogenic calli. Embryogenic protoplasts from Parent 1 are irradiated with gamma-rays for nuclei destruction and cytoplasm donation, while embryogenic protoplasts from Parent 2 are treated with iodoacetic acid (IOA) for metabolic inhibition of organelle genomes. Treated protoplasts from both parents are fused using PEG or electrofusion and the main products are heterokaryons that combine cytoplasm from the donor parent (Parents 1) with the intact nucleus from the recipient parent (Parents 2). Plantlets can be obtained by the formation of cell colonies, calli, somatic embryos

图 2. 供体 - 受体途径的原生质体非对称融合图解
父本 1 和父本 2 的胚珠分别诱导成胚胎发生的愈伤组织培养液。胚胎发生的原生质体经由酶解和原生质体分离得到。父本 1 的胚胎发生原生质体用伽马射线照射破坏细胞核, 作为细胞质供体。父本 2 的胚胎发生原生质体用碘乙酸(IOA)处理抑制细胞器基因组。两个经过处理的父本原生质体通过 PEG 或电融合得到含有供体父本(父本 1)的原生质体和受体父本(父本 2)的细胞核的异核体。小苗可通过细胞克隆、愈伤组织、体细胞胚的发生得到

显微镜下观察融合全过程 [17], 整个过程中的参数容易控制。至今已广泛应用于动植物及微生物细胞的融合。影响电融合的效果主要是电压大小、持续的时间和原生质体的尺寸 [18]。电融合在保持原生质体的活力, 减少细胞膜的损害和原生质体的畸变、破裂及细胞器的融合等方面都要好于化学融合 [19]。Schweiger [20] 把电融合法与微培养法相结合, 建立了单对原生质体融合技术程序, 不仅改进了融合方法, 而且是两亲本间一对一融合, 有可能解决融合细胞的选择问题, 是一种有前途的技术体系。目前正在研究用电脑控制进

行自动化操作，以提高操作效率。

Li 等^[21]建立的激光融合法在融合烟草原生质体时避免了亲本原生质体中叶绿体分布的影响，是近年来比较新的一种方法。利用激光微束可以对相邻细胞的接触区细胞进行破坏，从而诱导许多细胞中所需的两个相邻细胞融合。1987 和 1989 年德国海德堡理化研究所采用准分子激光器使油菜原生质体融合，从开始照射到完成融合仅需几秒钟^[22]。该法可选择任意两个细胞进行融合，易于实现特异性细胞融合，作用于细胞的应力小，定时定位性强，损伤小，参数易于控制，操作方便，可利用监控器清晰地观察整个融合过程，实验重复性好，无菌无毒性，但它只能逐一处理细胞。目前，激光诱导细胞技术正在发展与探索之中，有待于进一步完善。

植物细胞融合过程中由于地球重力的存在，有无液泡的原生质体密度差很大，异源细胞融合率低^[23]。20 世纪 80 年代以来，在空间材料科学的启发下，试图利用空间微重力条件改进细胞融合技术。空间微重力环境没有重力沉降和热对流等影响，为因重力限制而难以发展的细胞融合技术提供了新的机遇。而电融合在空间实验中有很大的优势：1) 群体细胞的融合过程可同步进行；2) 除电场强度和处理时间的影响外，介质中没有其它影响细胞活力的因素^[24]；在微重力条件下细胞所需的能量减少，如单细胞生物——草履虫移动性减少而细胞分裂速率增加，推测是由于过剩的能量导致了移动的减弱，其它细胞活动的增加^[25]。空间微重力环境能够提高异源细胞融合得率，并且融合细胞能够顺利地再生植株，但是有关空间电融合的实验还不完全，今后在理论研究方面可以利用模拟微重力方法，继续探讨微重力对植物细胞结构和功能的影响，探究微重力环境下植物细胞电融合率提高的机理；应用方面可以利用微重力条件培育植物新品种，弥补常规育种周期长，废时废力的弊端，以期在较短时间内完成植物从单细胞融合到多细胞组培乃至长成完整植株的过程^[24]。

20 世纪 80 年代证实了离子注入生物效应和粒子沉积生物效应的存在，建立了质量、能量、电荷三因子作用机制体系，据此原理发展了该技术。离子束的可操纵性高，可用微束对细胞进行超微加工，有目的地切割染色体，通过消除部分染色体或染色体的某些

片段达到细胞非对称融合的目的^[26]。该项研究一旦成功，将改变传统的一对一细胞融合的弊端，减少供体细胞导入的染色体范围，使融合更具目的性，大大减少筛选的工作量，将是细胞融合研究的一大进步。

非对称细胞融合技术，即利用某种外界因素(如 γ 射线)辐照某一细胞原生质体，选择性地破坏其细胞核，并用碘乙酰胺碱性蕊香红 6 G，处理在细胞核中含有优良基因的第 2 种原生质体，选择性地使其细胞质失活。然后融合来自这 2 个原生质体品系的细胞，实现所需胞质和细胞核基因的优化组合(图 2)。实践表明非对称细胞融合技术通过 γ 射线 X 射线照射为实现供体亲本少数基因的转移，创造种间、属间杂种提供了可能性^[27]。

植物微原生质体融合技术可在较少的融合杂种中获得具有目标性状的融合杂种，从而大大提高育种效率。植物微原生质体融合技术对非对称原生质体融合进行了改进，它是经微核来转移染色体，避免染色体操作所带来的染色体损伤，杂种遗传稳定。而且，它是在细胞水平上进行一条或几条染色体的转移，在一定程度上可克服杂交不亲合或杂交不孕等造成的生殖隔离。在作物种质创新和育种中有一定的潜在应用价值^[28]。

这些方法各有特点，但目前广泛使用的是 PEG 法和电融合法^[19]。但是电融合需要昂贵的电融仪，因此目前仍不如 PEG 法使用普遍。

现在新的细胞融合方法一般采用将化学法和物理法结合起来进行，如将磁、超声、机械等和激光、电相结合，同时添加化学剂以便进一步提高融合率，细胞融合的方法和手段始终朝操作方便、简单，便于量化研究，同时融合率又能得到不断提高的方向发展^[29]。

2.5. 杂种细胞选择体系的改进

在原生质体融合后的群体中，有融合体、未融合体、多元融合体和嵌合体，杂种细胞的筛选就是从中区分出预期的融合重组类型。没有杂种选择技术常不能获得有效的体细胞杂种，而缺乏有效的具普遍意义的选择系统，正是一直制约体细胞杂交发展的瓶颈之一^[7]。

杂种选择技术通常以遗传标记、细胞对营养反应

差异以及生化特性表现差异为基础建立。多数方法建立在双亲细胞互补的原则上,包括遗传互补、营养缺陷互补、白化突变体间互补以及生长激素的自主互补等。然而这些方法的局限性在于突变体不易获得,而且有些突变体不易再生。也有人采用机械分离杂种细胞的方法,早年利用显微镜操作分离,挑出融合杂种细胞,近年发展到利用流式细胞计来分离杂种细胞,尽管这种技术效率高,但是由于仪器价格昂贵,用的人还很少^[7]。

近年来,兴起的不对称融合也是一种筛选杂种细胞的方法。不对称融合指一方亲本的全部原生质与另一方亲本的部分核物质及胞质物质重组,产生不对称杂种^[7]。一般用碘乙酰胺(IOA)或碘乙酸(IA)处理受体,使其细胞失活,单独培养不能生长和分裂;而供体由于受到射线辐射,大部分染色体受到损伤,细胞不能生长;只有融合体发生互补作用才能生长,从而挑出杂种,用此法筛选已有很多成功的例子^[30,31]。据统计,现在90%以上的体细胞杂交为不对称融合。

2.6. 杂种鉴定方法的发展

获得再生植株后,必须进一步证实杂种的真实性并了解它与亲本的联系与区别。除了传统的形态学、细胞学及生化方法得到了继续发展外,近年来基因组DNA的RAPD和AELP分析以及细胞器DNA的Southern杂交分析广泛应用于对称或不对称杂种细胞鉴定^[31]。

3. 植物细胞融合的应用

植物细胞融合技术目前主要是作为扩大变异的手段,同时也正朝着将抗药性和胞质雄性不育等细胞质基因导入另一个体细胞的方向发展,有可能形成新的核质杂种。如果获得了有用性状的细胞系,在还不能形成植株时,就可以通过快速大量繁殖细胞加以利用^[4]。

3.1. 用于基础理论研究

Yamagishi等设计了一种新的高效原生质体培养体系,增加了不对称杂交属内种间细胞融合率^[32]。可以设想,细胞融合技术改善后,可把人参和冬虫夏草的细胞融合产生新的品种,并具备它们各自特有的药效。

3.2. 转移抗逆性状,改善作物品质

病虫害和不良环境条件是农林业生产的大敌,大量施用农药带来日益严重的环境污染。培育和推广应用高抗逆性的优良品种,是实现农林业高产优质高效节能生产、保护环境的必由之路^[33]。Shelley用马铃薯二倍体作亲本经过体细胞杂交得到抗科罗拉多马铃薯甲虫的四倍体体细胞杂种;Bastia等对耐霜冻的野生种和栽培种进行体细胞杂交,获得的所有体细胞杂种都比栽培种亲本耐霜冻,其中有3株比野生种亲本的耐性还高^[34]。体细胞杂交为栽培植物的抗性育种提供了一条优越的新途径。

3.3. 进行远缘重组,创造新的遗传变异

利用体细胞杂交已在许多有性杂交不亲合的种间、属间、甚至科间产生了可育的体细胞杂种。大量的研究表明,异源原生质体融合,不仅能在近缘种间,也可以在远缘种间产生体细胞杂种。供受体融合技术的建立和发展,更加扩大了远缘种间遗传重组的亲缘范围,增加了遗传变异的幅度^[33]。通过体细胞杂交产生体细胞杂种,为植物育种提供了一条克服生殖隔离,提高变异的新途径。体细胞杂交可以在亲缘关系比较远的物种间或者在栽培种与野生种之间进行,并且细胞质基因和细胞核基因同时参与杂交,经过进一步选择、回交,甚至继续进行体细胞杂交。植物细胞融合配合常规育种技术,可望选出优良材料,加之体细胞杂交来自双亲的遗传物质并非简单的堆积,而是发生了复杂的遗传重组,这正是改良作物所期望的。此外,植物的许多栽培性状,如产量、抗性、花色、不育性以及光合作用有关的特性等,都受多基因控制,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,则可实现多基因甚至整个基因组的转移和重组,从而创造新的植物类型^[33]。

3.4. 应用于种质保存和有用物质生产

目前可将各种细胞器、DNA、质粒、病毒、细菌等外源遗传物质引入原生质体,从而有可能引起细胞遗传性的改变,为某些珍稀植物的快速繁殖、植物的复壮提供可行的方法,还可应用于种质保存、无性系的快速繁殖和有用物质生产^[35]。

3.5. 定向转移胞质基因控制的性状

杂种优势现象在生物界普遍存在, 利用这一现象是提高农作物品质和产量的有效途径之一, 即可以利用雄性不育系进行杂交一代种子生产。核基因控制的雄性不育的保持系很难解决, 而细胞质雄性不育的不育系、恢复系和保持系较易通过体细胞杂交短期内得到^[36]。胞质杂交作为体细胞杂交的一个重要方面, 由于避免了胞质供体细胞核基因的参与而带来的一些不良性状, 遗传性更加稳定, 因而在转移胞质遗传性状方面具有明显的优点, 同时又克服了有性杂种中只具有母本胞质基因的不足, 增加了胞质变异。利用胞质杂交定向转移胞质基因, 是目前体细胞杂交育种研究中最活跃的领域, 已取得了很大的成功, 具有极大的潜力^[33]。

3.6. 可改变生理类型

体细胞杂交消除回交转育 CMS 性状时出现的异常现象, 可通过改变杂种的生理特性来实现。Kirti^[37]用具有 *Moricandia arvensis* 细胞质和芥菜(*Brassica-juncea*)细胞核的严重黄花的 CMS 植株和绿色可育的芥菜作亲本进行体细胞杂交, 得到具有 *M. arvensis* 的线粒体和芥菜叶绿体、细胞核的正常 CMS 胞质杂种。通过体细胞杂交改变蔬菜生理类型的研究虽然比较少, 但可能会越来越受重视。

4. 展望

植物细胞融合技术正日趋完善, 无论在实践上还是在理论上, 它都具有独到的用途和诱人的前景。通过体细胞融合产生新的有价值的农作物品种已有良好的开端。可以充分肯定, 该项技术不仅可以打破种间杂交障碍, 还可以扩大物种杂交范围, 提高物种变异频率, 缩短育种周期, 拓宽育种领域, 提高育种水平^[38]。通过体细胞杂交转移抗性性状及进行作物间优良农艺性状组合的可能性已在许多作物中变成现实, 而通过配子-体细胞杂交获得三倍体的优越性也已被证实。

有性杂交不亲和的种间可以通过原生质体融合得到体细胞杂种植株, 亲缘关系较近的亲本间可以得到可育的后代。通过栽培品种和野生近缘种间的体细胞杂交可以有效地将野生种的优良性状转至栽培品种以扩大栽培品种的基因库。它们可以用作育种资

源, 甚至直接应用, 因而这样的体细胞杂交可以作为某些作物重要的育种途径^[7]。

但是我们必须清醒地认识到, 体细胞杂交中仍存在一些函待解决的难题: 1) 原生质体再生困难直接阻碍了体细胞杂交在作物育种上的应用; 2) 体细胞杂种或胞质杂种本身染色体数目不定, 染色体结构发生变异, 及异常的减数分裂等都会造成培养过程中表现不稳定^[39]; 3) 用射线照射非对称杂交的供体亲本, 从悬浮培养细胞中提取原生质体, 或通过芽再生途径获得植株等都会加重杂种染色体的丢失^[40], 而且染色体丢失是一个非常复杂的过程, 还受双亲的遗传关系、倍性水平等因素影响^[41]; 4) 体细胞杂交育种同样面临着杂种不育或育性差的问题。面对以上实际问题, 将细胞工程与分子生物学手段相结合, 降低杂种基因来源的随机性, 采取对杂种进行早期鉴定的措施; 进一步扩大原生质体培养材料的种类及基因型; 加强对原生质体再生植株无性系变异的细胞遗传学研究, 比如核质关系、不亲和性、细胞分裂的调控及细胞全能性的机理、遗传物质的重组等生物学基础理论的研究; 选择应用先进的融合方法进行多种方式的融合, 除对称融合外, 还要注意不对称融合的研究。能够促进体细胞杂交在植物育种中取得突破性进展。

为打破杂交不亲和性, 结合非对称融合与适宜的选择法, 将支配近缘野生种和远缘种核的有用抗病性基因导入栽培种; 花药培养所获得的有用性状的单倍体和二倍体的单倍体植物与同种或异种的单倍体及二倍体植物对称融合, 重建核基因, 尽早培育出实用的二、三、四倍体杂种; 以期获得胞质杂种的 CMS、抗病性、除草剂耐性、光合机能等有关的细胞质基因在短期内导入的优良系统。而且, 在胞质杂种形成过程中以期 mtDNA 重组和胞质细胞器重建, 使细胞质的遗传组成多样化; 利用远缘间的融合易获得雄性不育植物, 在至今未得到 CMS 的作物中, 获得其新的 CMS 基因; 以有性生殖困难、不能杂交育种的作物和营养繁殖性作物作为育种的突破口, 使远缘杂交育种的研究有一新进展^[17]。这些也将都是很有意义的课题。

参考文献 (References)

- [1] 张献龙, 唐克轩. 植物生物技术[M]. 北京: 科学出版社,

- 2005: 124.
- [2] 李春艳, 李妮亚, 陈少良. 植物原生质体培养与融合的研究进展[J]. 海南师范学院学报(自然科学版), 2005, 18(3): 264-268.
- [3] 孙慧慧, 王力军, 闫晓红等. 植物原生质体融合培养技术及其应用[J]. 河南农业科学, 2010, 7(3): 118-122.
- [4] 戴雪梅, 黄天带, 孙爱花等. 植物原生质体融合研究进展及其在育种中的应用[J]. 热带作物学报, 2012, 33(8): 1516-1521
- [5] 李志勇. 细胞工程[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 1-7.
- [6] B. P. Jena. Insights on membrane fusion. *Cell Biology International*, 2000, 24(11): 769-771.
- [7] 崔彬彬, 朱维红, 冯大领. 细胞融合技术研究进展[J]. 保定师范专科学校学报, 2007, 2: 48-50.
- [8] 李保华. 细胞融合技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 15: 6187-6188.
- [9] 聂福, 张美萍, 孙春玉等. 五加科植物细胞工程研究进展[J]. 北方园艺, 2010, 7: 206-209.
- [10] 谢华永. 杨树胚性悬浮细胞系建立与原生质体融合研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2004.
- [11] 张献龙, 唐克轩. 植物生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 132.
- [12] 汪勋清, 刘录祥. 聚乙二醇诱导细胞融合最适条件的筛选[J]. 核农学报, 2008, 5: 635-639.
- [13] 徐文锦, 刘湘, 宁勇. 植物原生质体融合技术的研究进展[J]. 湖北中医学院学报, 2008, 10(1): 46-47.
- [14] 郭学民, 徐兴友, 王同坤等. 植物细胞融合的研究进展[J]. 河北科技师范学院学报, 2005, 19(1): 65-68.
- [15] 华小黎, 廖婧, 胡丽玲等. 聚乙二醇诱导细胞融合最适条件的筛选[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 5: 206-209.
- [16] Q. H. Zhang, J. H. Liu and X. X. Deng. Isolation of microprotoplasts from a partially synchronized suspension culture of *Citrus unshiu*. *Journal of Plant Physiology*, 163(11): 1185-1192.
- [17] C. Ramos, D. Bonenfant and J. Teissie. Cell hybridization by electrofusion on filters. *Analytical Biochemistry*, 2002, 302(2): 213-219.
- [18] M. R. Davey, P. Anthony, J. B. Power, et al. 2004 Sivb Congress symposium proceedings "thinking outside the cell": Plant protoplast technology: Status and applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant*, 2005, 41(3): 202-212.
- [19] L. F. De Filippis, R. Hampp and H. Zieglerh. Membrane permeability changes and ultrastructural abnormalities during protoplast fusion. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 156(5-6): 628-634.
- [20] W. Jude, G. Fred. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2011, 104(11): 343-357.
- [21] Y. M. Li, L. J. Guan, L. R. Lou, et al. Laser-induced tobacco protoplast fusion. *Science in China, Series C: Life Science*, 1999, 42(2): 122-127.
- [22] R. Muralidhar, T. Panda. Fungal protoplast fusion—A revisit. *Bioprocess Engineering*, 2000, 22(5): 429-431.
- [23] A. Alexander, E. Richard. Somatic hybridization and applications in plant breeding. *Plant Breeding Reviews*, 2010 20(1): 167-225.
- [24] J. Bravo, D. Evans. Protoplast fusion for crop improvement. *Plant Breeding Reviews*, 2011, 3(1): 193-218.
- [25] J. Janick. Somatic embryogenesis in woody species. *Horticultural Reviews*, 2011, 10(1): 153-181.
- [26] F. Liu, Y. G. Wang, J. M. Xue, et al. Transmission measurement based on stmobervation to detect the penetration depth of low energy heavyions in botanic samples. *Radiation Measurements*, 2003, 37(1): 9-14.
- [27] H. Rehm, G. Reed. Cell fusion. *Biotechnology Set*, 2008, 2(1): 93-139.
- [28] 吴紫云, 华玉伟, 黄华孙. 植物微原生质体的融合[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(6): 1182-1187.
- [29] 罗立新. 细胞融合技术与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [30] 戴永娟, 和兆荣, 胡靖锋等. 青花菜非对称体细胞杂交研究[J]. 湖南农业科学, 2012, 5: 9-12.
- [31] 廉玉姬, 林光哲, 赵小梅. 大白菜、青花菜和叶用芥菜体细胞杂交种形态学与细胞学特性鉴定[J]. 园艺学报, 2011, 11: 2099-2110.
- [32] H. Yamagishi, M. Landgren, J. Forsberg, et al. Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104(6-7): 959-964.
- [33] 周玲艳, 杨加伟, 梁红. 植物体细胞杂交技术及其在猕猴桃育种中的应用[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2009, 22(3): 59-64.
- [34] T. Bastia, N. Carotenuto, B. Basile, et al. Induction of novel organelle DNA variation and transfer of resistance to frost and verticillium wilt in *Solanum tuberosum* through somatic hybridization with iEBN *S. commersoni*. *Euphytica*, 2000, 116(1): 1-10.
- [35] F. Gil, E. Reytor, D. M. Perez-Filgueira, et al. Multimerization of peptide antigens for production of stable immunogens in transgenic plants. *Journal of Biotechnology*, 2007, 128(3): 512-518.
- [36] 闰静, 张明方, 陈利萍. 体细胞杂交技术在蔬菜育种中的研究与应用[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(1): 51-55.
- [37] P. B. Kirtipb, S. Prakasbs, K. Gaikwadk, et al. Chloroplast substitution overcomes leaf chlorosis in a *Moricandia arvensis*-based cytoplasmic male sterile *Brassica juncea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97(7): 1179-1182.
- [38] 李培夫. 体细胞杂交技术在作物育种上的开发利用[J]. 种子科技, 2005, 4: 215-216.
- [39] J. H. Liuclarkej, A. M. Chevrean, M. Landgrenm, et al. Characterization of sexual progenies of male-sterile somatic cybrids between *Brassica napus* and *Brassica tournefortii*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99(3-4): 605-610.
- [40] M. Wang, Z. Peng, L. Wang, et al. Different rates of chromosome elimination in symmetric and asymmetric somatic hybridization between *Festuca arundinacea* and *Bupleurum scorzonrifolium*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2011, 58(1): 133-141.
- [41] D. Evans, W. Sharp and C. Flick. Plant regeneration from cell cultures. *Horticultural Reviews*, 2011, 3: 214-314.