

植物微原生质体的融合

吴紫云, 华玉伟, 黄华孙*

中国热带农业科学院橡胶研究所, 农业部热带作物栽培生理学重点开放实验室, 海南儋州 571737

Plant Microprotoplast Fusion

WU Zi-Yun, HUA Yu-Wei, HUANG Hua-Sun*

Key Laboratory of Physiology of Tropical Crop of Ministry of Agriculture, Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China

提要: 文章就植物微原生质体融合技术的基本原理和技术的应用作了介绍和展望。

关键词: 体细胞杂交; 微核化; 微原生质体; 微原生质体融合

自从1972年Carlson首次获得粉蓝烟草和郎氏烟草的体细胞杂种以来, 体细胞杂交已在许多植物的种内、种间、属间甚至科间成功实现。研究重点由模式植物向重要农作物和经济作物转移, 同时, 将体细胞杂交与常规选育程序相结合, 在农作物和经济植物的育种以及生产中的应用潜力已开始显现(Heath和Earle 1997; Grosser等1998; McGrath等2002; Hu等2002)。植物体细胞杂交(plant somatic hybridization)是以原生质体培养为基础, 人工诱导不同亲本的原生质体融合, 并通过异核体的培养产生体细胞杂种的技术, 包括对称融合(symmetric protoplast fusion)和非对称融合(asymmetric protoplast fusion)。前者是将供体植物原生质体的整个基因组转移到受体中, 这不仅将目的基因转移到受体中, 同时也将不利基因转移到受体中, 而且由于基因组不协调导致营养和生殖生长发生异常(Liu等2005)。后者是将供体植物的原生质体的部分基因组转移到受体原生质体。在融合前, 往往先对一方亲本的原生质体进行射线辐射、药物预处理, 钝化细胞核, 然后再和另一亲本的原生质体融合。由于辐射等处理会造成一方亲本部分核物质或全部核物质的丢失, 非对称融合在转移部分核物质或只保留一方亲本的核物质形成非对称杂种或胞质杂种方面有其独特之处, 因而备受重视。尽管如此, 但供体原生质体经辐射处理后, 其供体染色体会发生断裂或基因丢失, 从而会影响其在杂种后代中的遗传稳定性(Famelaer等1990; Wijbrandi等1990)。

植物微原生质体融合(microprotoplast fusion)(又称微细胞杂交、微核技术、微融合技术)是20世纪90年代发展起来的一项实现部分基因组转移而又避免染色体损伤的新的不对称融合技术。迄今, 采用微原生质体融合技术已在多种植物中获得微原生质体融合杂种(Verhoeven等1991; Ramulu等1993, 1994; Rutgers等1997; Matthews等1999; Binsfeld等2000; Saito和Nakano 2002a; Louzada等2002)。本文对植物微原生质体融合技术的基本原理以及这项技术的应用作介绍和展望。

1 植物微原生质体融合技术的原理

微原生质体融合技术最先是在人和其他哺乳动物的研究中进行的, 植物微原生质体融合是在此基础上发展起来的将一种植物的一条或几条染色体转移到另一种植物中的新的非对称原生质体融合的方法。其原理是采用适当浓度的微核诱导剂, 包含DNA合成抑制剂和纺锤体毒素两大类, 常用的如秋水仙素(colchicine, COL)、安磺灵(oryzalin)、草胺磷除草剂(cremart)、甲基氨草磷(amiprofos-methyl, APM)、甲氨喋呤(methotrexate, MTX)、氯苯胺灵(chlorpropham, CIPC)等。这些药剂可使正在分裂的植物细胞停留在有丝分裂中期, 数小时后, 染色体解开螺旋, 形成内含多个微原生质体的微核化细胞, 每

收稿 2007-08-08 修定 2007-11-05

资助 国家自然科技资源平台项目(2005DKA21000-5-11)。

* 通讯作者(E-mail: huayuwei667@yahoo.com.cn; Tel:

0898-23300573)。

个微原生质体内含有一条或几条染色体, 由于有丝分裂停留在中期, 每条染色体的两个姐妹染色单体仍在一起, 着丝点不分开。通过酶解去掉微核化细胞的细胞壁获得微核化原生质体, 再用离心等技术分离出带有一条或几条染色体的微原生质体, 诱导其与完整的受体原生质体融合, 从而实现部分基因组的转移(图1)。这种染色体的转移是通过微核进行的, 染色体不会受到损伤(罗立新2003; 车建美和赖钟雄2000)。微原生质体融合主要包括3个步骤: 微原生质体诱导、分离以及富集、微原生质体融合和植株再生。

1.1 微原生质体诱导

1.1.1 微原生质体的材料 具有快速分生能力的植物组织都可用于微核化, 目前用于微核诱导的材料主要有2种。一是通过快速生长的胚性悬浮细胞系(图1)。通常, 建立大量、稳定的胚性悬浮细胞系(embryogenic cell suspension culture)是微核的诱导和分离的基础, 胚性悬浮细胞系是指在一定条件下具有体细胞胚发生能力的细胞悬浮培养物。由于胚性悬浮细胞系分散均匀, 生长旺盛, 细胞内含物充实, 可以分离得到大量有活力的原生质体, 并易培养, 试验重复性好, 悬浮细胞系取材方便, 不受季节和环境条件的限制等优点, 所以悬浮细胞系成为原生质体培养、细胞融合、外源基因转化及细胞突变体筛选的极好材料(McCormick 1993; Nagata 和 Kumagai 1999; Sharma 1999), 也成为微原生质体诱导的重要材料。二是发育中小孢子母细胞(microsporocytes)。由于高等植物减数分裂通常是同步的, 所以只需对小孢子母细胞纺锤丝进行阻断而不需积累中期细胞, 小孢子母细胞经过纺锤体毒素(或纺锤体抑制剂、有丝分裂阻抑剂)处理, 在减数分裂形成四分体的过程中, 胞质分裂即可形成大量的微核化细胞(图2)。Saito 和 Nakano (2002b)用以上两种材料分别建立了有效的微原生质体制备方法——从萱草(*Hemerocallis hybrida*)悬浮细胞制成体细胞微原生质体和从发育中的麝香百合(*Lilium longiflorum*)小孢子制成配子微原生质体。研究表明, 通过花粉母细胞获得的微原生质体更有优势, 因为, 不需要花多长时间和大量劳力就可以建立和维持细胞悬浮系, 毋需额外对细胞周期进

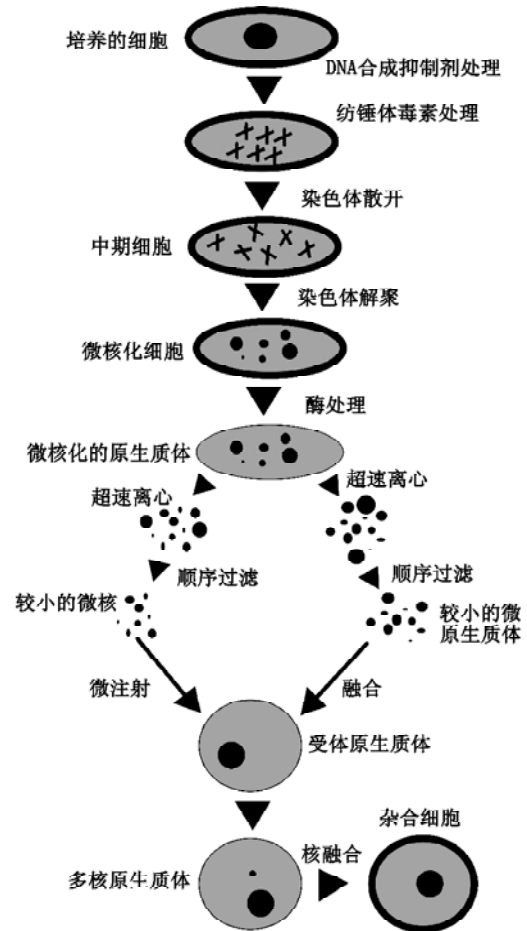


图1 微原生质体融合的一般过程(Verhoeven 等 1991)

行同步化处理, 甚至不用超速离心等。

1.1.2 微原生质体诱导的方法 植物细胞微核化研究的早期, 多用辐射和化学诱导处理, 但这两种方法都会导致植物遗传破坏, 如染色体断裂和突变等。后来采用适当浓度的有丝分裂阻抑剂处理细胞, 有人认为在细胞分裂过程中延长中期阻抑剂处理, 可以提高微核化的频率。Ramulu 等(1990)用COL(能抑制有丝分裂, 破坏纺锤体, 使染色体停滞在分裂中期)、安碇灵(微管的解聚剂, 使微管分散的药剂, 可与微管蛋白二聚体结合, 抑制微管的聚合)、APM(APM作用原理是由于内源性Ca²⁺浓度对核膜的形成有很大影响, APM扰乱线粒体对钙的摄取, 所以影响核的形成)三种纺锤体毒素处理普通烟草(*Nicotiana glauca*)悬浮细胞时发现, APM和安碇灵比COL抑制效果更强, 微核化细胞的频率更多,

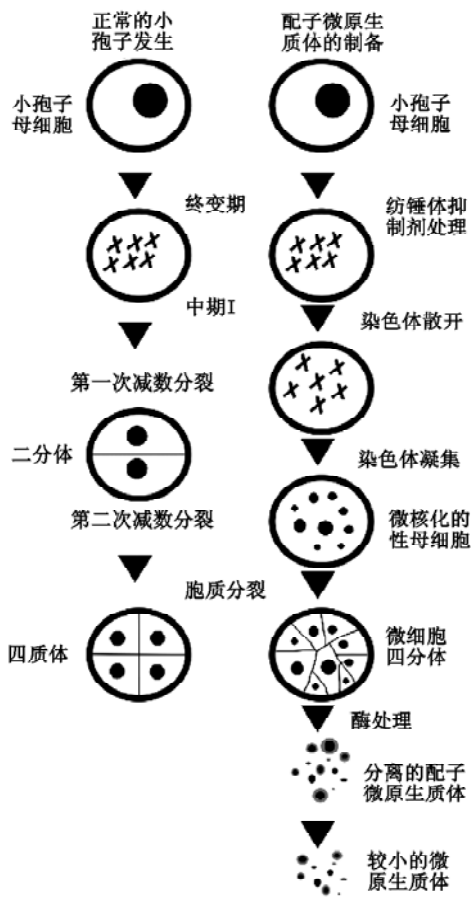


图2 高等植物发育中的小孢子制备微原生质体的流程
(Saito 和 Nakano 2002b)

产生的微核更多。随后, 他们又发现草胺磷除草剂也能有效诱导植物细胞微核化, 而且, 他们认为悬浮细胞通过草胺磷除草剂处理, 中期染色不发生着丝点分裂和染色单体分离, 可直接转变成微核。而且, 悬浮细胞和原生质体的混合物用草胺磷除草剂($3.7\sim 15.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理 48 h 后用含细胞松弛素(cytochalasin-B, CB)的细胞壁水解酶和草胺磷除草剂处理 18 h, 微核化的频率显著高于用草胺磷除草剂($3.7\sim 15.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理 18 h 的悬浮细胞(Ramulu 等 1994)。但用这些单一的试剂进行处理往往存在有丝分裂中期指数不高, 重复性不好等问题。最近发展起来的利用羟基脲(hydroxyurea, HU)和有丝分裂抑制剂(或纺锤体毒素)双阻断法诱导植物细胞有丝分裂同步化, 获得频率较高的有丝分裂中期指数(metaphase index, MI) (Saito 和 Nakano 2001)。HU 是一种 DNA 合成

的抑制剂, 可暂时阻止细胞周期进程, 使细胞停留在 DNA 加倍的 S 期, 一旦除去 HU 后, 细胞就同步进入下一个时期, 再用 APM 等有丝分裂抑制剂处理, 使大量细胞停留在中期。陈成彬和宋文芹(1999)用 HU 和 APM 同步化诱导小麦、大麦、黑麦、蚕豆、玉米、水稻等植物有丝分裂, 其有丝分裂中期指数可达 50% 以上, 中期染色体占 80%~90%, 有丝分裂正常, 未见染色体畸变现象。

1.2 微原生质体的分离和富集 微原生质体分离的具体过程包括微核化原生质体的分离与纯化、微核和微原生质体分离以及微原生质体的富集。在微核形成过程中, 着丝粒未分开, 每个微核含有一对或多对两个完全相同的姐妹染色单体。细胞微核化后的溶液中加入细胞壁降解酶, 以除去细胞壁, 其高速离心和反复洗涤后, 可以得到纯化后的原生质体。含较大基因组的亚原生质体和含有较多数量染色体的微原生质体的密度大, 这可用密度梯度高速离心加以分开, Ramulu 等(1993)用渗虑(percoll)密度梯度-超速离心法将微原生质体和原生质体分离出来, 完整的原生质体位于高糖浓度的等渗溶液表层。分离过程中会产生不同类型的核, 如 G_1 和 G_2 核、中期染色体、分离的姐妹染色单体、微核等。在微核化缓冲液中, 这些微核分散在微原生质体中, 再将得到的微原生质体通过不同孔径的过滤器进行纯化成小的微原生质体。含一条或少数几条染色体的微原生质体即可分离出来, 较大的亚二倍体微原生质体和微核则过滤掉。分离出来的微原生质体可用显微密度计和流式细胞仪检测(Ramulu 等 1984; Binsfeld 等 2000; Louzada 等 2002)。Louzada 等(2002)将柑橘(*Citrus spp.*)的悬浮细胞用 APM 处理后, 用 Percoll 密度梯度离心, 再用孔径为 $20\ \mu\text{m}$ 的滤网过滤, 在得到的微原生质体中, 75.2% 的含有 1 条染色体, 17.1% 含有 2 条, 4.6% 含有 3 条, 2.0% 含有 5 条和 5 条以上的染色体。

1.3 微原生质体融合 在人类和其他哺乳动物中, 微原生质体融合已是一门很成熟的技术。但在植物中, 这种技术还有很多需要优化。在哺乳动物中, 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)诱导和微注射是最广泛使用的两种微融合方法。在植物

中,目前主要还是采用类似动物的PEG诱导并结合高Ca²⁺和高pH的处理方法(Keller和Melchers 1973;Kao和Michayluc 1974)。

PEG由于含有醚键而具负极性,与水、蛋白质和碳水化合物等一些正极化基团能形成氢键,当PEG分子量足够大时,可作为邻近原生质体表面之间的分子桥而使之粘连(Benbadis和de vir ville 1982)。PEG也能连接Ca²⁺等阳离子, Ca²⁺可在一些负极化基团(如磷酸根离子)和PEG之间形成“钙桥”,而促进原生质体间的连接。高Ca²⁺和高pH可增加质膜的流动性,因而也大大提高融合频率,洗涤时的渗透压冲击对融合也可能起作用。

PEG既是促融剂又是渗透压稳定剂,一般PEG浓度控制在40%时的诱导效率比较高。低浓度低分子量的PEG促融效果不好,也容易导致原生质体破裂。但高浓度PEG会导致原生质体收缩,降低融合频率,而且过高浓度的PEG对原生质体有毒害作用。Ca²⁺的作用主要是它是原生质体间的联系者,不仅可促进原生质体之间的粘合,而且可使这种粘合作用更为稳定,从而更好地促进原生质体间的融合,另外,它还起着维持原生质体与融合体之间稳定性的作用,防止他们破裂,这种作用在许多物种的原生质体融合研究中均得到证实(Keller和Melchers 1973;Kao和Michayluc 1974; Benbadis和de vir ville 1982)。

Ramulu等(1995, 1996a)将马铃薯(*Solanum tuberosum*)微原生质体与二倍体番茄(*Lycopersicon peruvianum*)原生质体按1:1、2:1或3:1的比例混合于培养皿中后,加入PEG4000 [终浓度为8%~10% (W/V)]和W5培养液,融合7 min后,吸去PEG和培养液,加入高pH缓冲液(240 mmol·L⁻¹ KCl、100 mmol·L⁻¹ CaCl₂、3 mmol·L⁻¹ MES, pH 7.0)处理20 min,微原生质体和原生质体混合物静置后,加入诱导愈伤组织的固体培养基后进行培养,得到了预期效果。Binsfeld等(2000)则采用8% (W/V)的PEG6000,另加90 mmol·L⁻¹甘露醇、60 mmol·L⁻¹ CaCl₂、25 mmol·L⁻¹甘氨酸和6% DMSO的混合溶液,没有用W5等培养液,融合产物有18%~20%的恢复生长。

1.4 植株再生和杂种鉴定 杂种后代基因组或染色

体组的组成主要取决于:转入受体原生质体中的供体基因组片段;供体染色体在受体中的遗传稳定性。后代染色体的组成有可能会出现以下三种情况:一是G₂期的供体(一条染色体含两条完整姐妹染色单体)与G₂期的受体融合后,经过有丝分裂,形成的杂种后代含有一条供体染色体。二是G₂期的供体(一条染色体含两条完整姐妹染色单体)与G₁期的受体融合后,受体细胞经S期-G₂期-M期后,形成的杂种后代含有两条完全相同的供体染色体。三是S期供体细胞与位于S期以后的受体细胞融合,由于供体细胞周期比受体细胞周期早,供体细胞的染色质会提早组装成染色体,这种现象称为染色体未成熟的凝集(premature chromosome condensation, PCC),从而导致DNA或染色体断裂,形成的杂种后代染色体可能会含有完整的供体染色体或者供体DNA染色体片段,也可能没有。

两种方法可以筛选出含有供体部分基因组的杂种,一是在受体细胞中出现隐形互补基因的条件致死突变;另一是供体基因中携带显性的药物抗性。目前杂种后代分析的方法主要有卡那霉素抗性分析(kanamycin resistance)、GUS基因活性检测(GUS activity)、Dot印迹分析(dot-blot analysis)、Southern印迹杂交分析(southern-blot analysis)、核中DNA含量的流式细胞分析(flow cytometric analysis of nuclear DNA content)和基因组原位杂交分析(genomic in situ hybridization)等(Ramulu等1996a, b)。

获得微原生质体融合的杂种植株还与以下几种情况有关:在微原生质体和原生质体的混合样本中,微原生质体占相当大的一部分比例;微原生质体与原生质体发生多重融合;供体和受体细胞好的亲和性(能发生有效融合,供体基因在受体中能稳定遗传);不可避免的体细胞变异(如供体基因组双链重复,融合产物发生多态化);受体具备诱导原生质体快速高效的再生植株的成熟技术(Ramulu等1992)。特别是在愈伤组织时期和杂种再生这两个阶段最为重要,直接决定着实验的成功与否。

2 影响微原生质体融合效率的因素

2.1 影响微原生质体诱导的因素 影响植物细胞微

核化的因素很多, 其中, 以不同的微核诱导剂最为重要。所用的微核诱导剂主要包括 APM、HU、安磺灵、cypermethrin、CIPC、COL、alphanaphthalene (ABN)、colcemid、8-hydroxyquinoline (8HQ)、cycloheximide 等(Matthews 等 1999)。这些诱导剂对不同植物、不同组织以及不同材料的最佳浓度不同, 应该做多次实验摸索, 不可盲目套用他人的实验结果。除了用不同的微核诱导剂处理以外, 还有其它几个必须考虑的因素, 如微核化细胞的分裂活性、供体物种或基因型、植物的不同组织、细胞同步化水平、诱导处理顺序、供体细胞生长速率等都是决定微核化率大小的因素, Ramulu 等(1988a, b)认为悬浮细胞有丝分裂频率与微核化水平有很大关系。他们(1988b)通过大量的比较实验发现, 在相同处理条件下, 不同物种或基因型所得到的细胞微核化水平不一样。一般来说, 植物组织需更长的处理时间, 采用的纺锤体毒素浓度更高。这些植物组织并不需要十分完整, 相反, 切成小块的组织可能更有效。此外, 药剂(如 APM 和 CB)处理的顺序不同, 对微核化频率的影响也很大(Ramulu 等 1991)。对于发育中的小孢子来说, 还应该注意小孢子的发育时间, 一般来说, 小孢子母细胞处于终变期到减数分裂中期 I 为最佳时间。

2.2 影响微原生质体分离的因素 对于配子微原生质体分离来说, 微原生质体分离过程主要涉及的是细胞壁的降解和顺序过滤。悬浮细胞等一类材料, 还要用到连续密度梯度超速离心。细胞壁降解得到的微核化的原生质体, 其产率直接影响到后面微原生体的产量。细胞壁能否彻底降解, 主要与细胞壁降解相关的酶有关系, 目前常用的酶有: 纤维素酶(cellulase onozuka R-10、cellulase onozuka RS、meicelase P)、果胶酶(pectolyase Y-23、macerozyme R-10、macerozyme)、半纤维素酶(hemicellulase H-2125、rhozyme HP-150)、崩渍酶(driselase)。这些酶都没有固定的使用浓度, 一般以几种酶混合使用的效果为佳。对于悬浮细胞来说, 为了分离微原生质体, Ramulu 等(1993)分离马铃薯微原生质体时, 用了连续密度梯度超速离心方法, 离心后的离心管从上到底部会出现一条大带和三条小带, 需仔细的吸出这几条包含

有原生质体和微原生质体的带, 然后从中富集微原生质体。富集微原生质体时, 他们采用了不连续密度梯度超速离心和顺序过滤两种方法。通过比较发现, 顺序过滤比不连续密度梯度超速离心更加有效。过滤时需选择合适孔径的尼龙网, 孔径过大, 收集到的原生质体含有较多的染色体或完整的原生质体; 孔径过小, 微原生体产率小甚至得不到微原生质体。他们用的尼龙网其孔径分别是 48、20、15、10、5 μm , 大约有 80% 的微原生质体 DNA 在 1 至 4 条染色体上, 有近 90% 微原生质直径在 2.5~10 μm 之间。

2.3 影响微原生质体融合的因素 供体微原生质体和受体原生质体能否高效和高质融合, 关键在融合方法。目前有化学方法[NaNO_3 法、高 Ca^{2+} 和高 pH 法、PEG 法、聚乙酸乙烯酯(PVA)及聚乙烯吡咯烷酮(PVP)法]和电场诱导融合法。在植物中, 主要采用 PEG 诱导并结合高 Ca^{2+} 和高 pH 方法。PEG 诱导融合成功的关键是: PEG 的种类、纯度、浓度、处理时间、原生质体的生理状况和密度。PEG 的分子量一般选用 1540、4000 或 6000, 用 PEG6000 的多一些。高 Ca^{2+} 和高 pH 溶液处理时间的长短也十分重要, 时间过长, 原生质体损害严重, 融合率降低; 过短则不融合。此外, 供体微原生质体和受体原生质体的比例对微融合也有一定的影响。

3 微原生质体融合技术在植物学研究中的应用

微原生质体融合技术已在百合属(*Lilium*) (Saito 和 Nakano 2002a)、萱草属(*Hemerocallis*) (Binsfeld 等 2000)、茄属(*Solanum*) (Ramulu 等 1994; Rutgers 等 1997; Matthews 等 1999)、烟草属(*Nicotiana*) (Verhoeven 和 Ramulu 1991; Ramulu 等 1993)、番茄属(*Lycopersicon*) (Ramulu 等 1991)、甜菜属(*Beta*)和菲律宾木橘属(*Swinglea*) (Louzada 等 2002)等植物中成功获得了微原生质体融合的杂种, 在柑属(*Citrus*) (Zhang 等 2006)中也成功分离了微原生质体。Ramulu 等(1996a, b)以制备出的马铃薯(*S. tuberosum*)微原生质体与二倍体番茄(*L. peruvianum*)正常原生质体融合后, 获得单体附加系, 这一附加系只含有马铃薯的一条染色体。

Ramulu 等(1995; 1996a, b)用 PEG 诱导出

含有一条或几条染色体(具有卡那霉素抗性和GUS特性)的供体马铃薯(*S. tuberosum*), 其微原生质体与正常的番茄(*L. peruvianum*)原生质体融合后得到大量的再生植株, 再生植株具有卡那霉素抗性和GUS特性。Ramulu等(1995)分析111株烟草微融合再生植株形态的结果表明, 其中有19株通过微融合直接所获得的单体附加系中有3株可以检测到标记基因的表达(Kan^R或GUS)。Rutgers等(1997)用含有npt II和Uid A基因的供体马铃薯微原生质体与番茄原生质体融合, 再生植株同时具有npt II和Uid A基因。基因原位杂交表明, 这些植株含有2个npt II和1个Uid A基因的马铃薯供体染色体和受体的全部染色体。Binsfeld等(2000)采用两种多年生的供体向日葵(*Helianthus giganteus*和*H. maximiliani*)的微原生质体与受体向日葵(*H. annuus*)的胚轴原生质体融合后, 得到的有16个杂种后代中期细胞中含有2~8个附加染色体。这些都显示微原生质体融合技术可以高效地将供体的目标性状转移给受体。

4 结语

植物微原生质体融合技术已在多种植物中获得成功应用。通过有性杂交将种群中优良性状如高产和抗性基因集中于一体, 需要较多群体和多次杂交, 而微原生质体融合可以避免有性杂交带来的基因重组和交换, 因此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。同时, 作物的许多农艺性状、抗病虫以及抗胁迫性状多为数量性状, 由多基因编码, 它们集中成串或散布在染色体上, 部分染色体转移将有利于这些性状导入受体中。植物微融合技术也兼有细胞核融合和细胞质融合的过程, 杂种不仅含受体的全部细胞核和细胞质, 而且有部分的供体细胞核和细胞质, 基因组及胞质互作致使杂种在营养生长方面可能超过受体植株, 这对利用营养器官的植物来讲是有意义的。因而, 微原生质体融合技术在作

物种质创新和育种中有一定的潜在应用价值。

微原生质体融合技术是一种非常有效的获得附加系的方法。这些附加系可以作为遗传学、分子生物学的基础材料, 如获得代换系或重组系、推动物质渗入育种(introgressive breeding)、建立特异染色体-DNA文库(chromosome-specific DNA libraries)、辐射杂种基因定位(radiation hybrid mapping)等。附加系的获得也将有助于作物农艺性状的遗传分析、基因表达调控、基因克隆等研究如基因定位、研究染色体的三维结构和供体染色体的空间排列以及它们与基因表达和转化的关系。部分附加系甚至可能直接应用于育种实践。

参考文献

- 车建美, 赖钟雄(2000). 植物微核技术的原理与应用. 福建农林大学学报(自然科学版), 31 (1): 73~75
- 陈成彬, 宋文芹(1999). 利用HU和APM双阻断法诱导高频率植物根尖细胞有丝分裂同步化的研究. 南开大学学报(自然科学版), 3 (1): 28~30
- 罗立新(2003). 细胞融合技术与应用. 北京: 化学工业出版社, 98~100
- Benbadis A, de Virville JD (1982). Effect of polyethylene glycol treatment used for protoplast fusion and organelle teansplantation on the functional and structural integrity of mitochondria isolated from spinach leaves. *Plant Sci Lett*, 26: 257~264
- Binsfeld PC, Wingender R, Schnabl H (2000). Characterization and molecular analysis of transgenic plants obtained by microprotoplast fusion in sunflower. *Theor Appl Genet*, 101: 1250~1258
- Famelaer I, Negrutiu I, Mouras A, Vaucheret H, Jacobs M (1990). Asymmetric hybridization in *Nicotiana* by "gamma fusion" and progeny analysis of self-fertile hybrids. *Theor Appl Genet*, 79: 513~520
- Grosser JW, Jr Gmitter FG, Castle WS, Chandler JL (1998). Production and evaluation of citrus somatic rootstocks: progress report. *Proc Fla State Hort Soc*, 108: 140~143
- Heath DW, Earle ED (1997). Synthesis of low linolenic acid rapeseed (*Brassica napus* L.) through protoplast fusion. *Euphytica*, 93: 339~343
- Hu Q, Hansen L, Laursen J, Dixelius C, Andersen SB (2002). Intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* containing traits of agronomic importance for oilseed rape breeding. *Theor Appl Genet*, 105 (6~7): 834~840
- Kao KN, Michayluc MR (1974). A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, 115: 355~367
- Keller WA, Melchers G (1973). The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Z Naturforsch*, 28c: 737~741

- Liu JH, Xu XY, Deng XX (2005). Intergenic somatic hybridization and its application to crop genetic improvement. *Plant Cell Tiss Organ Cul*, 82: 19~44
- Louzada ES, del Rio HS, Xia D, Moran-Mirabal JM (2002). Preparation and fusion of *Citrus* spp. microprotoplasts. *Am Soc Hortic Sci*, 127: 484~488
- Matthews D, Millam S, Wilkinson MJ (1999). Factors influencing the utility of gametic microprotoplasts for partial genome transfer in potato. *Plant Cell Rep*, 18: 786~790
- McCormick S (1993). Male gametophyte development. *Plant Cell*, 5: 1265~1275
- McGrath JM, Williams CE, Haberlach GT, Wielgus SM, Uchytel TF, Helgeson JP (2002). Introgression and stabilization of *Erwinia* tuber soft rot resistance into potato after somatic hybridization of *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. *Amer J Potato Res*, 79 (1): 19~24
- Nagata T, Kumagai F (1999). Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. *Methods Cell Sci*, 21: 123~127
- Ramulu KS, Dijkhuis P, Famelaer I, Cardi T, Verhoeven HA (1993). Isolation of sub-diploid microprotoplasts for partial genome transfer in plants: enhancement of micronucleation and enrichment of microprotoplast with one or a few chromosomes. *Planta*, 190: 190~198
- Ramulu KS, Dijkhuis P, Famelaer I, Cardi T, Verhoeven HA (1994). Cremart: a new chemical for efficient induction of micronuclei in cells and protoplasts for partial genome transfer. *Plant Cell Rep*, 13: 687~691
- Ramulu KS, Dijkhuis P, Rutgers E, Blaas J, Krens FA, Dons JJM, Colijn-Hooymans CM, Verhoeven HA (1996a). Microprotoplast-mediated transfer of single specific chromosomes between sexually incompatible plants. *Genome*, 39: 921~933
- Ramulu KS, Dijkhuis P, Rutgers E, Blaas J, Krens FA, Verbeek WHJ, Colijn-Hooymans CM, Verhoeven HA (1996b). Intergenic transfer of a partial genome and direct production of monosomic addition plants by microprotoplast fusion. *Theor Appl Genet*, 92: 316~325
- Ramulu KS, Dijkhuis P, Rutgers E, Blaas J, Verbeek WHJ, Verhoeven HA, Colijn-Hooymans CM (1995). Microprotoplast fusion technique: a new tool gene transfer between sexually incongruent plant species. *Euphytica*, 85: 255~268
- Ramulu KS, Dijkhuis P, Verhoeven HA, Famelaer I, Blaas J (1992). Microprotoplast isolation enrichment and fusion for partial genome transfer in plants. *Physiol Plant*, 85: 315~318
- Verhoeven HA, Ramulu KS, Dijkhuis P (1991). Mitotic blocking, micronucleation and chromosome doubling by oryzalin, amiprophos-methyl and colchicine in potato. *Protoplasma*, 160: 65~71
- Ramulu KS, Verhoeven HA, Dijkhuis P, Gilissen LJW (1988a). Chromosome behaviour and formation of micronuclei after treatment of cell suspension cultures with amiprophosmethyl in various plant species. *Plant Sci*, 56: 227~237
- Ramulu KS, Verhoeven HA, Dijkhuis P, Gilissen LJW, Van der Valk HCPM (1988b). Induction of micronuclei by amiprophosmethyl and their application for transfer of single specific chromosomes in plant cells. In: Puite KJ, Huizing HJ, Kool AJ, Koornneef M, Krens FA (eds). *Progress in Plant Protoplast Research*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Pub, 293~296
- Ramulu KS, Dijkhuis P, Rosest S, Bpkelmann GS, Groot DB (1984). Early occurrence of genetic instability in protoplast culture of potato. *Plant Sci Lett*, 36: 79~86
- Rutgers E, Ramulu KS, Dijkhuis P, Blaas J, Krens FA, Verhoeven HA (1997). Identification and molecular analysis of transgenic potato chromosome transferred to tomato through microprotoplast fusion. *Theor Appl Genet*, 94: 1053~1059
- Saito H, Nakano M (2001). Partial synchronization of cell division and micronucleation in suspension-cultured cells of *Hemerocallis hybrida*: the effects of hydroxyurea and various spindle toxins. *Breed Sci*, 51: 285~291
- Saito H, Nakano M (2002a). Isolation and characterization of gametic microprotoplast from developing microspores of *Lilium longiflorum* for partial genome transfer in the *Liliaceous ornamentals*. *Sexual Plant Rep*, 15: 179~185
- Saito H, Nakano M (2002b). Preparation of microprotoplasts for partial genome transfer via microprotoplast fusion in liliaceous ornamental plants. *JARQ*, 36 (3): 129~135
- Sharma AK (1999). Synchronization in plant cells-an introduction. *Methods. Cell Sci*, 21: 73~78
- Verhoeven HA, Ramulu KS, Dijkhuis P (1990). A comparison of the effects of various spindle toxins on metaphase arrest and formation of micronuclei in cell-suspension cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta*, 182: 408~414
- Verhoeven HA, Ramulu KS, Gilissen LJW, Famelaer I, Dijkhuis P, Blaas J (1991). Partial genome transfer through micronuclei in plants. *Acta Bot Neerl*, 40 (2): 97~113
- Wijbrandi J, Zabel P, Koornneef M (1990). Restriction fragment length polymorphism analysis of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and irradiated *L. peruvianum*: evidence for limited genome elimination and extensive chromosome rearrangements. *Mol Gen Genet*, 222: 270~277
- Zhang QH, Liu JH, Deng XX (2006). Isolation of microprotoplasts from a partially synchronized suspension culture of *Citrus unshiu*. *J Plant Physiol*, 163 (11): 1185~1192