

DOI:10.11937/bfyy.201504048

蔬菜原生质体培养及融合的研究现状与展望

张金鹏, 韩玉珠, 张晓旭, 张广臣

(吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:原生质体培养与融合技术是蔬菜作物遗传改良的重要手段。该文对蔬菜原生质体的分离、培养、融合的研究现状及原生质体培养与融合技术在蔬菜作物上的应用做了综述,同时做出展望。

关键词:蔬菜;原生质体培养;融合

中图分类号:Q 942 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)04-0192-04

蔬菜作为人们生活中必不可少的一部分,其生产和优良品种的选育越来越被人们所重视。蔬菜作物具有丰富的野生和原始的种质资源,常规有性杂交难以将其充分利用,而生物技术中原生质体培养与融合恰恰可以利用这些野生资源的优良特性,以期对蔬菜的遗传改良提供有效途径与手段。

自 20 世纪 70 年代植物原生质体培养成功以来,关于植物原生质体的研究层出不穷。原生质体培养与融合技术作为一种育种手段被广泛研究,蔬菜原生质体培养与融合也随即逐渐发展,且研究与应用相对较多。早期的蔬菜原生质体培养和体细胞杂交研究主要集中于茄科植物,后来在十字花科芸薹属(*Brassica*)和伞形科胡萝卜属(*Daucus*)的作物上相继取得突破,并迅速扩展到其它作物^[1]。

1 蔬菜原生质体的分离与培养

1.1 蔬菜原生质体的分离

目前蔬菜原生质体分离普遍采用酶解法。酶制剂普遍使用 Onozuka R-10(纤维素酶)和 Macerozyme R-10(离析酶)、Pectolyase Y-23(果胶酶)等。一般纤维素酶浓度为 1%~2%,果胶酶浓度为 0.5%~1.0%;酶混合液 pH 为 5.5~5.8;酶解时间从几小时到几十小时不等,以不超过 24 h 为宜^[2],但是也有例外,如侯喜林等^[3]在提取不结球白菜 OguCMS 原生质体时便酶解 36 h,不结球白菜在酶液中游离原生质体的时间相对较长。调节酶液的渗透压稳定剂广泛使用山梨醇和甘露醇,适宜浓

度范围为 0.45~0.80 mol/L^[4]。酶混合液中有时还添加 MES、CaCl₂·2H₂O、KH₂PO₄、PVP、BSA 等物质^[5]。

酶解的材料一般选择幼嫩的蔬菜组织或器官,常用子叶、下胚轴、叶片等。武云霞等^[6]、邓红梅等^[7]、王卉等^[8]分别选取橙色大白菜子叶和下胚轴、黄瓜幼苗子叶、莴苣无菌苗幼嫩叶片作为分离原生质体的起始材料,均取得良好效果。酶解时普遍采用黑暗振荡酶解法,振速在 40~90 r/min^[9-10]左右。原生质体纯化时基本采用界面法、沉淀法或二者结合使用。

1.2 蔬菜原生质体的培养

原生质体的分离与培养从 1960 年 Cooking 使用酶解法成功分离出番茄原生质体开始,至今仍在持续发展中。原生质体培养成功与否直接关系到通过原生质体进行遗传转化和体细胞杂交育种的成败。通过原生质体分离与培养获得高质量的原生质体并且培养成功、获得再生植株的蔬菜有十字花科的甘蓝^[11-12]、甘蓝类的花椰菜^[13-14]、青花菜^[15]、小白菜^[16](不结球白菜)、大白菜^[17](结球白菜)、白菜类的菜心^[18]、芥菜^[19-20]、甘蓝型油菜^[21]、伞形花科的胡萝卜^[22]、芹菜^[23-24]、芫荽^[25]、旋花科的甘薯^[26]、豆科的蚕豆^[27]、豇豆^[28]、刀豆^[29]、茄科:马铃薯^[30]、茄子^[31]、番茄^[32]、辣椒^[33]、葫芦科的黄瓜^[34]、甜瓜^[35]、菊科的茼蒿^[36]、莴苣^[37]、百合科的石刁柏(芦笋)^[38]、藜科(姜科):生姜^[39];还有一些菌类蔬菜,如木耳^[40]、毛木耳^[41]、银耳^[42]、双孢蘑菇^[43]、鸡腿菇^[44]等。而藜科的菠菜^[45]、十字花科的萝卜^[46]、辣根^[47]、豆科的菜豆^[48]、豌豆^[49]、葫芦科的南瓜和冬瓜^[50]、西瓜^[51]、丝瓜^[52]、苦瓜^[53]、天南星科的魔芋^[54]、百合科的洋葱^[55]、大蒜^[56]等蔬菜仅仅探索出分离原生质体的适宜条件,或培养出愈伤、生出不定根、出现芽点,但未能分化出植株。马铃薯、甘蓝、茄子等蔬菜原生质体的培养研究相对比较深入。

蔬菜原生质体培养时的起始密度一般调整为 10⁴~

第一作者简介:张金鹏(1989-),男,吉林敦化人,硕士研究生,研究方向为蔬菜遗传育种与生物技术。E-mail:jinpeng2155@sina.com.

责任作者:张广臣(1961-),男,吉林长春人,本科,教授,现主要从事设施栽培生理等研究工作。E-mail:gczh2005@126.com.

收稿日期:2014-09-22

10^5 个/mL^[57]。培养时一般采用 KM_{8p}、B5 液体培养基、MS 固体培养基或其相应的改良培养基。培养方式基本采用液体浅层培养和固液双层培养法^[58],也有使用微滴培养法,如张兰英等^[59]在培养菜心下胚轴原生质体时使用此法取得较好效果。第一次细胞分裂发生时间为 1~7 d 不等,分裂出细胞团与形成愈伤的时间因蔬菜种类不同而有一定差异,一般 20~40 d。如李贵等^[60]在培养结球甘蓝下胚轴原生质体时,1~2 d 即开始第一次细胞分裂,14~28 d 形成肉眼可见的愈伤组织。

2 蔬菜原生质体的融合

蔬菜原生质体的融合方法随着生物技术的发展而进步,由化学融合向电融合转变,并不断研究改进,像电气化学法、空间微重力电融合、微流控芯片法等。武恒^[61]使用微流控芯片将小白菜无菌苗子叶原生质体和烟草叶肉原生质体成功融合。但是就当前而言,PEG(聚乙二醇)-高 Ca²⁺ 高 pH 法和电融合法是原生质体融合普遍采用的方法。PEG-高 Ca²⁺ 高 pH 法应用普遍,但影响融合效果的因素较多,融合率低。电融合需要使用电融合仪,且需探索不同植物种类的适宜融合条件,但是融合率相对较高,操作简单,融合过程迅速。原生质体融合后还需通过原生质体培养进行杂种细胞的培养。培养成功再生植株后,要结合形态学、细胞学和分子生物学等技术对杂种植株进行鉴定,进而应用于蔬菜育种等领域,服务于农业。

蔬菜作物中,像马铃薯等属于无性繁殖或性不育植物,常规育种手段难以对其进行遗传改良,原生质体融合技术恰好能解决这一问题。蔡兴奎等^[62]将马铃薯栽培种与野生种的原生质体进行融合,获得多种杂种细胞,并表明体细胞杂种中叶绿体具有偏亲现象。而菜豆作为典型的闭花授粉植物,人工杂交成功率低,品种更新极为缓慢^[63]。Geerts 等^[64]对菜豆进行了化学微融合与电融合的试验,均形成大量异核体,并将杂种细胞培养出愈伤组织,未能分化出苗,同时还表示菜豆杂种细胞再生植株非常困难,但是原生质体融合技术对于菜豆育种是可行的方法。

3 蔬菜原生质体培养与融合技术的应用

3.1 原生质体再生植株的变异

原生质体再生植株发生变异的现象较为普遍,已涉及到很多作物,变异的类型较多,主要有染色体变异、形态和农艺性状变异、抗性变异等^[65]。蔬菜作物中已在马铃薯、甘蓝、番茄中观察到原生质体再生植株的变异。张延红^[66]对马铃薯叶肉原生质体再生植株的 54 个株系及其母本进行了分子水平、细胞水平和表型水平的鉴定,结果显示存在较多变异;李贵^[67]以结球甘蓝原生质体再生植株等为材料进行了分析检测,表明植株之间存在遗传变异;虽然这种变异不利于种性的保持,但是却

为选择新的、优良的材料提供了可能,为新品种的选育提供了更多的材料。

3.2 创造新种质资源,培育抗性品种

有性杂交具有不亲和性,这便将物种的遗传改良限制了在种内的品种之间。原生质体融合技术打破了这一常规,为育种工作提供了广阔的发展空间,在蔬菜育种中更被广为应用。为拓宽白菜育种的基因资源,改良白菜品质,Lian 等^[68-69]成功将白菜和青花菜、白菜和甘蓝体细胞融合并再生杂种植株,结合传统杂交、回交获得多种稳定可育的新种质。在蔬菜抗病育种方面,获得大量抗病体细胞杂种资源,如:马铃薯抗青枯病^[70-71]、抗软腐病^[72]、抗晚疫病^[73]植株;茄子抗青枯病^[74-75]、抗细菌^[76]和真菌^[77]植株;花椰菜-黑芥体细胞杂交获得抗黑腐病新材料^[78]等。

3.3 创造、转移雄性不育性状(CMS)

CMS 性状在高等植物中普遍存在,是改良作物品质、提高产量与增强抗逆性的一条有效途径。胡琼等^[79]表明常规有性杂交结合回交创造甘蓝型油菜雄性不育材料需要 3~5 年,而应用原生质体融合结合细胞核基因除去技术,当代即可获得期望的核质杂种,一般只需 6~10 个月,并且可以同时转移细胞质雄性不育的恢复基因,这样能够快速获得遗传稳定的恢复系。谭芳等^[80]将芹菜与 CMS 胡萝卜原生质体融合、司家钢等^[81]进行胡萝卜种内细胞融合,对再生杂种植株进行鉴定,均成功转入了胡萝卜瓣化型雄性不育基因。Cappelle 等^[82]将苦苣与菊苣原生质体融合,首次获得菊苣属性亲和品种间的雄性不育杂种。

4 展望

原生质体的培养与融合技术在蔬菜作物的遗传改良中毋庸置疑拥有者巨大的应用前景。原生质体融合能够实现细胞核或细胞器水平上的基因组合,从而实现基因重组,这是转基因技术与传统杂交技术所无法比拟的;再加上原生质体培养技术与植物细胞全能性,结合现代生物技术,对育种工作者而言,无疑非常值得学习与探索。伴随着科学技术的进步,原生质体培养与融合向着更精密的方向发展,像微流控芯片技术,其具有微环境模拟等特性,并可以多元化应用,在蔬菜原生质体培养与融合方面同样有可观的应用前景^[83]。

在原生质体培养与融合展示巨大的应用潜力的同时,一些问题也逐渐突显出来。首先是原生质体培养能否成功的问题,植株的再生与否直接关系着以原生质体培养为基础的研究试验的成败;在蔬菜作物中,有许多有应用价值的蔬菜进行了原生质体培养与融合的研究,但是可惜没有获得再生植株,像菜豆、萝卜等;其次是再生植株的可育性、遗传稳定性以及生理特性等。蔬菜育种的最终目的是应用于蔬菜生产,服务农业,造福农业,

需要优质、丰产、抗不利环境条件的品种。蔬菜原生质体培养与融合培育出的新种质符合农业生产要求,成功应用于蔬菜生产的例子还很少,这便需要科研工作者继续探索与努力。

总而言之,原生质培养与融合在蔬菜遗传改良、创新种质、提高抗性等方面具有独特的优势,但是也要认识到原生质培养与融合也只是蔬菜等作物的一种育种手段,同时也是品种变异的来源之一,要想真正发挥其优势并应用于蔬菜生产还需结合常规育种方法,进而推进蔬菜作物的育种工作发展。

参考文献

- [1] 邓秀新,胡春根. 园艺植物生物技术[M]. 北京:高等教育出版社,2005:162-164.
- [2] 盛小光,顾宏辉,赵振卿,等. 植物原生质体全能性表达及其在甘蓝类蔬菜育种上的应用[J]. 中国蔬菜,2011(16):1-8.
- [3] 侯喜林,曹寿椿,余建明,等. 不结球白菜 OguCMS 下胚轴原生质体培养再生植株[J]. 园艺学报,2000,27(6):449-451.
- [4] 李浚明,朱登云. 植物组织培养教程[M]. 3版. 北京:中国农业大学出版社,2005:178-186.
- [5] 张金鹏,杨晶,韩玉珠,等. 植物体细胞杂交的研究进展[J]. 北方园艺,2014(1):192-195.
- [6] 武云霞,张鲁刚,张华敏,等. 橙色大白菜原生质体的游离和纯化[J]. 北方园艺,2009(10):16-12.
- [7] 邓红梅,马超,王颖. 黄瓜幼苗子叶原生质体的分离纯化及融合条件优化研究[J]. 北方园艺,2013(11):6-9.
- [8] 王卉,宁慧霞,刘敏,等. 莴苣原生质体的分离方法[J]. 北方园艺,2012(11):109-112.
- [9] Huang H Y, Wang Z Y, Cheng J T, et al. An efficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) protoplast isolation and transient expression system[J]. Scientia Horticulturae, 2013, 150: 206-212.
- [10] 杨茹,刘世琦,张自坤,等. 大蒜原生质体游离和纯化的研究[J]. 中国农学通报,2010,26(4):195-199.
- [11] 黄玲. 结球甘蓝原生质体培养及植株再生[D]. 金华:浙江师范大学,2011.
- [12] Yamashita H, Araki H, Yakuwa T. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Brussels sprouts* (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* Z.) [J]. J Fac Agr Hokkaido University, 1991, 65(1):119-125.
- [13] 卫志明,许智宏. 花椰菜叶肉原生质体培养再生植株[J]. 园艺学报,1992,19(1):47-51.
- [14] Veera R N C, Gregory D N, Philip J D, et al. Regeneration from leaf explants and protoplasts of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower) [J]. Scientia Horticulturae, 2009, 119: 330-334.
- [15] 戴永娟,和兆荣,胡靖峰,等. 青花菜非对称体细胞杂交研究[J]. 湖南农业科学,2012(5):9-12,16.
- [16] 侯喜林,曹寿椿,余建明,等. 不结球白菜子叶原生质体培养再生植株[J]. 南京农业大学学报,2000,23(4):17-20.
- [17] 赵军良,逯保德,梁爱华,等. 大白菜原生质体培养再生体系的优化[J]. 西北植物学报,2005,25(3):546-551.
- [18] 叶志彪,李汉霞. 红菜薹原生质体培养植株再生[J]. 园艺学报,1993,20(4):405-406.
- [19] Chen L P, Zhang M F, Hirata Y, et al. Efficient plant regeneration from cotyledon-derived protoplasts of cytoplasmic male-sterile tuber mustard (*Brassica juncea* Coss. var. *tumida* Tsen et Lee) [J]. Acta Phytophysiologica Sinica, 2001, 27(5):437-440.
- [20] 雷建军,陈世儒,郭余龙. 叶用芥菜叶片原生质体再生植株[J]. 园艺学报,1992,19(1):52-56.
- [21] 程振东,卫志明,许智宏. 甘蓝型油菜下胚轴原生质体培养的研究[J]. 生物工程学报,1994,10(1):30-33.
- [22] Grzebelus E, Szklarczyk M, Baranski R. An improved protocol for plant regeneration from leaf and hypocotyl-derived protoplasts of carrot [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2012, 109: 101-109.
- [23] 宛新杉,王辅德,夏镇澳. 芹菜原生质体培养条件与再生植株的研究[J]. 植物生理学通讯,1988(5):41-44.
- [24] 韩清霞,沈火林,张振贤. 芹菜胚性细胞悬浮系原生质体分离及再生植株[J]. 园艺学报,2007,34(3):665-670.
- [25] 李宝平,张江涛,陈柔如,等. 茼蒿原生质体再生植株[J]. 植物学报,1991,33(12):932-937.
- [26] 张冰玉,刘庆昌,翟红,等. 甘薯及其近缘野生种间体细胞杂种植株的有效再生[J]. 中国农业科学,1999,32(6):23-27.
- [27] 卫志明,许智宏. 蚕豆未成熟子叶原生质体再生植株[J]. 植物生理学通讯,1993,29(1):17-19.
- [28] 李学宝,许智宏,卫志明,等. 豇豆原生质体培养中体细胞胚胎发生和植株再生[J]. 植物学报,1993,35(8):632-636.
- [29] 严成其,边自雄,张冬生,等. 刀豆 (*Canavalia ensiformis*) 叶肉原生质体培养与植株再生[J]. 复旦学报(自然科学版),1991,30(4):381-387.
- [30] 祁新,赵颖君,王艳秋,等. 马铃薯悬浮细胞原生质体培养及植株再生[J]. 吉林农业大学学报,2000,22(1):52-55.
- [31] Iwamoto Y, Ezura H. Efficient plant regeneration from protoplasts of eggplant rootstock cultivar and its wild relatives [J]. Plant Biotechnology, 2006 (23): 525-529.
- [32] 张长远,吴定华. 番茄及其近缘野生种茎段原生质体培养的研究[J]. 园艺学报,2000,27(3):216-217.
- [33] 何晓明,王鸣,王之. 辣椒子叶原生质体培养和植株再生[J]. 园艺学报,1997,24(3):298-300.
- [34] 郭德章,鄢铮,赖钟雄,等. ‘翠秀’黄瓜子叶原生质体的高效培养及植株再生[J]. 园艺学报,2003,30(2):227-228.
- [35] 孙勇如,李向辉,孙宝林,等. 新疆甜瓜子叶原生质体的培养和植株再生[J]. 植物学报,1989,32(12):916-922.
- [36] 李贤,夏镇澳. 茼蒿叶肉原生质体培养再生植株[J]. 植物生理学通讯,1990(1):27-20.
- [37] Chaipakdee W. Isolation and culture of protoplast from leaves of *Lactuca sativa* [J]. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 2007, 29(4): 929-935.
- [38] Chen G Y, Conner A J, Christey M C, et al. Culture and regeneration of protoplasts from shoots of *Asparagus* cultures [J]. International Journal of Plant Sciences, 1997, 158(5):543-551.
- [39] 郭英华. 生姜原生质体培养与体细胞变异[D]. 北京:中国农业大学,2005.
- [40] 许修宏,孟琦,刘华晶,等. 黑木耳菌丝原生质体的制备、再生及单核鉴定研究[J]. 东北农业大学学报,2011,42(8):96-100.
- [41] 孙露,姚方杰,方明. 毛木耳原生质体制备与再生条件的研究[J]. 中国食用菌,2012,31(3):35-37.
- [42] 谢宝贵,朱虎. 银耳原生质体分离与再生条件优化研究[J]. 菌物系统,2003,22(4):574-578.
- [43] 王波,唐利民,熊鹰,等. 双孢蘑菇原生质体分离与再生初探[J]. 西南农业学报,2004,17(2):215-216.
- [44] Li L H, Yin Q Y, Liu X H, et al. An efficient protoplast isolation and regeneration system in *Coprinus comatus* [J]. African Journal of Microbiology Research, 2010, 4(6):459-465.
- [45] 焦轶男,朱宏. 菠菜原生质体游离与纯化的研究[J]. 生物技术世界,2012(12):1-3.

- [46] Hegazi, Hegazi H, Sachiko M. Callus formation and plant regeneration from protoplast derived from Cotyledons and Hypocotyls of radish (*Raphanus sativus* L.) and other Cruciferous plants [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1992, 61(1): 63-68.
- [47] 杨光梅, 杜春蕾, 黄晓华, 等. 辣根叶片原生质体分离条件的研究[J]. 种子, 2010, 29(2): 48-51.
- [48] 陈劲枫, 刘佩瑛, 聂志平. 菜豆叶肉原生质体培养[J]. 西南农业学报, 1989(2): 63-66.
- [49] 吴耀武, 马彩萍. 豌豆叶肉原生质体的分离和培养及其愈伤组织的形成[J]. 西北植物学报, 1990, 20(4): 269-274.
- [50] 张兴国, 刘佩瑛. 冬瓜南瓜和西瓜原生质体培养(简报)[J]. 西南农业大学学报, 1992, 14(1): 81-82.
- [51] 李敬仁, 孙勇如. 西瓜子叶原生质体再生愈伤组织的获得[J]. 新疆农业科学, 1992(5): 218-219.
- [52] 张兴国, 刘佩瑛. 丝瓜子叶原生质体培养研究[J]. 西南农业大学学报, 1992, 14(3): 257-259.
- [53] 苟小平, 唐琳, 赵军, 等. 苦瓜叶肉原生质体的培养[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1997, 34(6): 857-859.
- [54] 张兴国, 陈劲枫, 张盛林, 等. 魔芋原生质体游离和培养条件研究[J]. 西南农业大学学报, 1992, 14(1): 42-44.
- [55] 陈丽, 梁毅, 汪李平, 等. 洋葱愈伤原生质体分离和纯化研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(31): 147-151.
- [56] 杨茹. 大蒜原生质体融合与培养技术研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010.
- [57] 郭振. 细胞生物学实验[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2012: 94-96.
- [58] Liu F, Ryschka U, Marthe F, et al. Culture and fusion of pollen protoplasts of *Brassica oleracea* L. var. *italic* with haploid mesophyll protoplasts of *B. rapa* L. ssp. *pekinensis*[J]. Protoplasma, 2007, 23: 89-97.
- [59] 张兰英, 李耿光, 陈如珠, 等. 菜心下胚轴原生质体培养和植株再生[J]. 植物学报, 1994, 36(2): 105-110.
- [60] 李贵, 李必元, 王五宏, 等. 结球甘蓝下胚轴原生质体培养再生植株体系的优化研究[J]. 西北植物学报, 2012, 32(12): 2438-2443.
- [61] 武恒. 微流控芯片内植物原生质体的培养及其化学融合[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [62] 蔡兴奎, 柳俊, 谢从华. 马铃薯栽培种与野生种叶肉细胞融合及体细胞杂种鉴定[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 623-626.
- [63] 韩启厚, 古瑜, 于海龙. 菜豆组织培养及遗传转化研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(10): 97-101.
- [64] Geerts P, Druart P, Ochatt S, et al. Protoplast fusion technology for somatic hybridisation in *Phaseolus*[J]. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 2008, 12(1): 41-46.
- [65] 刘继红, 徐小勇, 邓秀新. 原生质体再生植株变异及其在植物育种上的应用[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(3): 301-306.
- [66] 张延红. 马铃薯原生质体再生植株遗传变异鉴定及 RAPD 稳定性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2003.
- [67] 李贵. 结球甘蓝的离体再生以及体细胞无性系变异的 RAPD 分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [68] Lian Y J, Lin G Z, Zhao X M. Morphological, cytological, and molecular characterization of hybrids and their progenies derived from the somatic hybridization of *Brassica campestris* and *Brassica oleracea* [J]. Chin J Biotech, 2011, 27(11): 1586-1597.
- [69] Lian Y J. Production and characterization of a somatic hybrid of Chinese cabbage and cabbage[J]. Chin J Biotech, 2012, 28(9): 1080-1092.
- [70] Fock I, Collonnier C, Purwito A, et al. Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja* [J]. Plant Science, 2000, 160: 165-176.
- [71] Fock I, Collonnier C, Jacques Luisetti, et al. Use of *Solanum stenotomum* for introduction of resistance to bacterial wilt in somatic hybrids of potato[J]. Plant Physiol Biochem, 2001, 39: 899-908.
- [72] 司怀军, 张宁, 王蒂, 等. 利用体细胞杂交获取马铃薯软腐病的抗性[J]. 中国马铃薯, 2006, 20(4): 193-197.
- [73] Tarwacka J, Polkowska-Kowalczyk L, Kolano B, et al. Interspecific somatic hybrids *Solanum villosum* (+) *S. tuberosum*, resistant to *Phytophthora infestans* [J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170: 1541-1548.
- [74] Collonnier C, Mulya K, Fock I, et al. Source of resistance against *Ralstonia solanacearum* in fertile somatic hybrids of eggplant (*Solanum melongena* L.) with *Solanum aethiopicum* L. [J]. Plant Science, 2001, 160: 301-313.
- [75] 连勇, 刘富中, 冯东昕, 等. 应用原生质体融合技术获得茄子种间体细胞杂种[J]. 园艺学报, 2004, 31(1): 39-42.
- [76] Iwamoto Y, Hirai M, Ohnido N, et al. Fertile somatic hybrids between *Solanum integrifolium* and *S. sanitwongsei* (syn. *S. kurzii*) as candidates for bacterial wilt-resistant rootstock of eggplant[J]. Plant Biotechnology, 2007 (24): 179-184.
- [77] Collonnier C, Fock I, Daunay M C, et al. Somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. sisymbriifolium*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal wilts[J]. Plant Science, 2003, 164: 849-861.
- [78] 王桂香, 严红, 曾兴莹, 等. 花椰菜—黑芥体细胞杂交获得抗黑腐病异附加系新材料[J]. 园艺学报, 2011, 38(10): 1901-1910.
- [79] 胡琼, 李云昌. 体细胞杂交在油菜细胞质雄性不育创建和改良中的应用[J]. 作物学报, 2006, 32(1): 138-143.
- [80] 谭芳, 沈火林, 王帅, 等. 芹菜与 CMS 胡萝卜原生质体非对称性融合的初步研究[J]. 园艺学报, 2009, 36(8): 1169-1176.
- [81] 司家钢, 朱德蔚, 杜永臣, 等. 原生质体非对称融合获得胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 种内胞质杂种[J]. 园艺学报, 2002, 29(2): 128-132.
- [82] Cappelle C, Morchen M, Hilbert J L, et al. Regeneration and molecular characterization of a male sterile interspecific somatic hybrid between *Cichorium intybus* and *C. endivia* [J]. Plant Science, 2007, 172: 596-603.
- [83] 刘文明, 李立, 任丽, 等. 微流控细胞芯片生命分析应用多元化[J]. 分析化学, 2012, 40(1): 24-31.

Research and Prospect of Vegetables Protoplast Culture and Fusion's Status

ZHANG Jin-peng, HAN Yu-zhu, ZHANG Xiao-xu, ZHANG Guang-chen
(College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: The protoplast culture and fusion technology is an important means of genetic improvement of vegetable crops. This paper reviewed status of vegetable protoplasts' isolation, culture, fusion and applications of the technology in vegetable crops. Meanwhile, the prospect was made.

Keywords: vegetable; protoplast culture; fusion