

体细胞杂交技术在蔬菜育种中的应用

闫 静, 张明方*, 陈利萍

(浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029)

摘 要: 从创造蔬菜新种质, 丰富蔬菜种质资源; 转移和创造 CMS 性状; 蔬菜抗病、抗虫、抗逆育种; 改变蔬菜生理类型等四方面详细介绍了体细胞杂交技术在蔬菜育种上的应用。并对体细胞杂交的主要优缺点及其注意事项进行了分析讨论。

关键词: 体细胞杂交; 蔬菜; 新种质

中图分类号: Q28 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)01-51-6

体细胞杂交(Somatic hybridization)即原生质体融合(Protoplast fusion), 是生物技术中重要的领域之一, 在植物种质资源创新和品种改良中发挥了独特的作用, 并获得了一些新种质。它是指双亲的原生质体(可以是种间、属间、甚至科间)在特定的物理或化学因素作用下诱导融合成杂种细胞(核质杂种或胞质杂种), 通过细胞分裂形成愈伤组织, 并分化和再生出植株^[1]。这项技术是建立在原生质体培养基础上, 主要包括: 原生质体分离、体细胞杂交、融合产物的培养和杂种的鉴定等技术环节。作为传统育种的辅助手段, 体细胞杂交不仅可以克服有性杂交的不亲和性、不育性, 还能够快速组合蔬菜作物的一些优良农艺性状, 或者将野生种的个别有用性状引入蔬菜栽培种。与有性杂交相比, 应用该技术可以获得有性杂交难于获得的远缘杂种。当用二倍体植物做亲本进行体细胞杂交时, 没有减数分裂, 等位基因不进行独立分离, 因此, 它能够保持亲本原有的杂合性^[2]。另外, 体细胞杂交明显优于有性杂交的是它可以对细胞质进行遗传操作, 引起线粒体、叶绿体等细胞器基因组的重组^[3,4]。由此可见, 体细胞杂交创造变异的潜力很大, 能够丰富种质资源, 保持和促进生物多样性。

随着经济的发展, 生活水平的提高, 人们对蔬菜品质和种类要求越来越高, 都希望不断有品质优良的新类型蔬菜上市。然而, 物种间生殖隔离在一定程度上阻碍了作物遗传进程, 使利用性状重组得到优良品种的传统育种受到限制^[5]。再加上蔬菜种质资源有限, 传统育种已经难以满足人们对蔬菜产品的需求。目前为止, 在十字花科、茄科、伞形花科、菊科、百合科和葫芦科等蔬菜中均有体细胞杂交的研究。其中研究最多的是十字花科的甘蓝和茄科的马铃薯。在这两种蔬菜中通过体细胞杂交已

经育成优良的品种或得到有利用价值的育种系, 初步显示了体细胞杂交在蔬菜育种上的应用前景。

1 体细胞杂交的原理与方法

体细胞杂交可以分为对称杂交和非对称杂交。对称体细胞杂交是指种内或种间完整原生质体的融合, 可以产生核与核、胞质与胞质间重组的对称杂种, 理论上可发育为遗传稳定的异源双二倍体杂种植株。非对称体细胞杂交是指用物理或化学方法处理亲本原生质体, 使一方细胞核失活, 或同时使另一方细胞质基因组失活, 再进行体细胞杂交。这样得到的融合后代只具有一方亲本的细胞核, 形成不对称杂种^[6]。非对称杂种或胞质杂种有一些优点, 比如在受体染色体数目不变的情况下供体基因插入, 核基因不变的情况下细胞质基因重组, 从而达到转移部分目标性状基因, 提高杂种育性和缩短体细胞杂种后代性状稳定时间。因为向作物转移少量有用的遗传信息比组合双亲的全部基因组更有意义, 所以非对称杂交更具有实际意义^[8]。但非对称杂交的缺点是植株再生困难。Forsberg 等比较了不同剂量的紫外线、X-射线和限制性酶切三种方法处理供体原生质体的效果。结果表明紫外线和 X-射线处理的效果明显, 而且剂量越大获得的杂种非对称性越高, 育性也越好。但是限制性内切酶处理与未处理的对照相比几乎没有差别, 可能是因为体细胞杂交的环境不适宜内切酶的酶切反应。

为了增加双亲原生质体的融合频率, 需用一些措施对其进行处理, 这叫诱导融合。诱导融合主要分为两类: 一类是物理因素诱导, 即用显微操作、

离心震荡、磁-电、激光、电刺激法等促使体细胞杂交。另一类是化学因素诱导,即用一些化学试剂处理双亲原生质体使其融合,包括聚乙二醇法(Polyethelene glycol, PEG)、高钙高pH法、硝酸钠法等。以前PEG法应用较多,最近电融合法用于体细胞杂交研究越来越多。用电融合代替PEG融合减少了PEG对亲本原生质体的化学伤害,融合细胞再生更为容易^[8]。

在马铃薯抗病育种中对体细胞杂交的研究不仅很多,而且很深入。不但进行种内^[9,10]和种间^[11,12]体细胞杂交,还比较了对称体细胞杂交和非对称体细胞杂交两种途径获得的杂种在分子水平上的差异^[13]。一般来说,对称杂交获得的杂种中核基因和细胞质基因控制的性状会出现更广泛的变异,可供下一步选择用;而非对称杂交在转移有限的或特定的基因时更适用,比如转移某个基因群、基因家族、染色体片段或染色体以产生附加系时一般选择非对称杂交。另外,非对称杂种出现的异常现象(单价染色体、染色体桥、松懈染色体等)比较少,植株的育性比较高^[13]。在马铃薯的抗病育种中也有人分析亲本的倍性水平对体细胞杂种及其后代的影响。非对称杂交时,受体亲本多倍化可以缓冲外来基因组产生的某些负效应^[14]。而进行对称杂交时,亲本的倍性高可能会造成基因组间不协调,重组复杂,给选择有用杂种后代增加难度。因此对称体细胞杂交常与花药培养相结合,进行优良基因的组合^[15]。通过花药培养来降低双亲的倍性,有利于杂种中来源不同的染色体配对,使体细胞杂种及其后代能够比较稳定的遗传。若对野生亲本先进行花药培养再进行体细胞杂交,会使体细胞杂种在形态上更接近栽培种亲本,有利于得到利用价值高的体细胞杂种。

2 创造新的遗传变异

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^[16]。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,不仅有希望得到蔬菜新类型,还能够丰富蔬菜种质资源。

Richard等^[2]报道芜菁和甘蓝的体细胞杂种(*Brassica.rapa.L.+Brassica.oleracea.L.*)自交后代(F_2)群体内的变异很大。从几个可育体细胞杂种的后代中进行选择,就有希望得到理想的新的个体类型。而要得到同样有希望的 F_2 群体,则需要很多的有性杂种 F_1 个体,但是远缘有性杂交又很难获得杂种。

因此,与有性杂交相比,体细胞杂交在创造遗传变异方面潜力很大。特别是多倍体蔬菜和无性繁殖的蔬菜,通过体细胞杂交创造变异的机会更高。比如马铃薯,几个形态、生理和农艺性状是由细胞质基因或者细胞质基因与核基因互作控制的,而以往的马铃薯育种只重视了对核基因组的操作,而忽略了对细胞质基因的操作。应用体细胞杂交可以对细胞质基因操作,不断诱导出一些新的、有潜在应用价值的可遗传的细胞质变异^[17]。Buiteved等^[18]为了提高韭葱的品质,将抗病、抗虫的韭葱(*Allium ampelorasum L.*)与农艺性状优良的洋葱(*A.cepa L.*)进行体细胞杂交。对获得的体细胞杂种进行染色体分析,发现所有杂种都有来自双亲的染色体。其中一个植株含45条染色体,30条来自韭葱,12条来自洋葱,3条是双亲染色体重组产生的。虽然其它植株没有重组染色体,这些植株形态上均介于韭葱和洋葱之间,若与韭葱回交并选择,有可能得到品质优良的韭葱品种。另外,这些杂种染色体数在41~45范围内(韭葱32,洋葱16),可以用这些杂种建立韭葱的洋葱单体或双体附加系,用来研究洋葱优良农艺性状的遗传规律。

3 CMS性状的转移、创造和机理研究

杂种优势现象在生物界普遍存在,利用这一现象是提高蔬菜品质和产量的有效途径之一。为了降低生产一代杂种种子的成本,提高杂种种子的质量,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,利用受到了限制。而细胞质雄性不育(Cytoplasmic male sterility, CMS)的不育系、恢复系和保持系较易得到,特别是通过体细胞杂交,在较短的时间内就可以育成以上三系。因此越来越受重视。

CMS性状是严格按照母性遗传(也叫细胞质遗传)的规律进行遗传的^[18,16,19],而且与线粒体基因有关。体细胞杂交不仅可以进行核基因组重组,还可以进行细胞质基因组的重组^[20]。所以在CMS性状的转移、创造和机理研究中,体细胞杂交具有独特的优越性。特别是非对称杂交获得的胞质杂种,在CMS分子机理研究上非常有用。

3.1 转移CMS性状

一般来说蔬菜作物有三种途径获得CMS性状。(1)自发产生CMS性状;(2)种内或种间有性杂交再回交,转育CMS性状;(3)通过体细胞杂交获得CMS性状^[21]。自发产生CMS的频率很低,而且随机性强,所以不方便利用。通过回交转育CMS性状在芥菜^[22]、不结球白菜^[23]等作物中已经有成功的

例子。但是所获得的植株除了CMS特性以外，还常常伴有黄化，蜜腺发育不良，花形态异常和结实率低等异常现象。侯喜林等^[23]认为这些现象是异源细胞质与细胞核之间不协调导致的。而Baldev等^[24]则认为是叶绿体之间缺少基因转移（叶绿体基因没有重组），各种各样的亲本叶绿体不协调引起种间杂种或其回交后代甚至一些体细胞杂种的细胞内叶绿素缺陷所致。以上两种说法都涉及到细胞质，所以用有性杂交的方法难以弥补。通过体细胞杂交途径进行品种间或物种间转移CMS性状，则很少发生上述异常现象。或者将得到的缺陷植株与绿色、可育的正常植株进行体细胞杂交也有希望得到有实际用途的正常CMS系。除此之外，用传统回交的方法转育CMS性状需较长的时间，通过体细胞杂交途径在较短的时间内就可以完成CMS性状的转移。因此体细胞杂交是转移CMS性状的有效途径^[25]。

不仅可以转移植物的CMS性状，体细胞杂交还能用来恢复CMS植株的育性。Yamamoto等^[19]用八个可育的胡萝卜品种与CMS胡萝卜(*MS-1*)进行非对称体细胞杂交，获得的胞质杂种中20%可育。说明通过体细胞杂交恢复CMS植株育性的频率比较高。有趣的是从*MS-1 + Koisumi-riso-gosum*和*MS-1 + Kokumbun-senkou-oonaga*两个杂交组合得到的胞质杂种全部不育的情况下，不育的胞质杂种(*MS-1 + Koisumi-riso-gosum*)作受体，再与*Kokumbun-senkou-oonaga*进行非对称体细胞杂交，得到的二次杂交胞质杂种全部可育。因为二次杂交胞质杂种组合了两个可育胡萝卜的细胞质和一个CMS胡萝卜的细胞核，所以与一次体细胞杂交相比，重复进行体细胞杂交恢复CMS植物育性效果更好。

3.2 创造CMS性状

对两个雄性可育的个体进行体细胞杂交，来源不同的线粒体基因组和核基因组不协调或线粒体基因组发生重组等都会导致体细胞杂种及其后代产生CMS性状。虽然体细胞杂交创造CMS性状的机制还不很清楚，目前为止已经成功创造了具有CMS性状的甘蓝与萝卜的属间体细胞杂种(*Brassica oleracea L. var. + Raphanus sativus L. cv.*)^[16]和马铃薯与其野生种的种间体细胞杂种(*Solanum tuberosum + S. commersonii*)^[17]等。Kanno等^[16]为了验证CMS的产生机理，详细分析了前者的叶绿体和线粒体的基因组。认为可能是亲本的线粒体DNA发生重组产生嵌合体所致，也可能是正常的线粒体基因转录受阻引起的，同时也没排除由细胞核与细胞质不协调造成的。Cardi等^[17]分析后者发现体细胞杂种的叶绿体和线粒体基因组均发生了重组，但同样没有弄清楚

CMS性状与线粒体基因组具体区段之间的关系。很多实验表明体细胞杂交后双亲的线粒体比双亲的叶绿体变异大^[3,16,17,22,25]。Mohapatra等^[26]分析芥菜的体细胞杂种，结果表明叶绿体是作为整体进行随机分离，而线粒体基因组要发生重组，产生双亲中间类型的线粒体。细胞器的生物遗传都是相似的，与叶绿体基因组相比，线粒体基因组在体细胞杂交过程中之所以有很高的重组率，可能与它的大小和在几种基因组中存在的能力有关^[16]。Smith等^[27]在烟草和胡萝卜体细胞杂交实验中发现与种内体细胞杂交相比，远缘物种间体细胞杂交会有更多的因素导致CMS性状产生。Liu等^[28]曾报道过非对称体细胞杂交在改变细胞质成分，创造CMS性状方面更有吸引力。因为非对称杂种组合了供体亲本的细胞质和受体亲本的细胞核。总之通过体细胞杂交产生CMS性状的机理很复杂，具体是什么原因造成的，对不同的植物和不同的融合方法可能有不同的解释。

3.3 研究CMS的分子机理

具有CMS性状的个体细胞质基因组比较复杂，给研究与CMS性状相关的基因造成很大困难。体细胞杂交过程中细胞质基因特别是线粒体基因与核基因一样发生重组，并且在体细胞杂种中有所体现^[29]。因此，体细胞杂交与分子生物学技术相结合能够很方便的研究与CMS相关基因的起源，判断不同蔬菜的CMS相关基因是否同源。Iwabuchi等^[29]在判断日本萝卜的一个栽培种(*Raphanus sativus cv. Kosen*)的CMS相关基因与*Ogura CMS*的相关基因是否同源的研究中，将CMS日本萝卜、*Ogura CMS*萝卜、CMS日本萝卜与可育芜菁甘蓝的CMS胞质杂种(*Raphanus sativus cv. Kosen + Brassica napus L.*)、雄性可育的芜菁甘蓝(*B. napus L.*)和育性恢复的胞质杂种后代的DNA进行完全酶切，并将酶切产物与*Ogura CMS*相关基因编码区*orf138*杂交。结果是CMS日本萝卜和*Ogura CMS*萝卜都有一个2.5kb的杂交片段，CMS胞质杂种有一个2.2kb杂交片段，而可育的芜菁甘蓝和胞质杂种后代没有任何杂交信号。由此判断出这个日本萝卜栽培种的CMS相关基因与*Ogura CMS*相关基因(*orf138*)有相同的起源。在此之前，Bonhomme等^[30]也是通过比较CMS胞质杂种和育性恢复后代的DNA分离得到*Ogura CMS*相关基因*orf138*。

4 进行抗病、抗虫和抗逆育种

病害、虫害和逆境严重影响蔬菜的产量和品质。尤其是一些典型的病害，如十字花科蔬菜的黑斑病、软腐病，茄科蔬菜的早疫病、晚疫病和青

枯病,以及葫芦科蔬菜的枯萎病等。这些病害使蔬菜在生产、贮藏和运输中受到严重威胁。多年来,蔬菜的病害主要采用化学药物防治,这不仅浪费劳力,提高成本,还对环境造成污染。通过抗病育种得到抗各种病害的优良品种,用于蔬菜生产,可以说是一件有意义的事情。但是,蔬菜的抗病性大多是由多基因控制的数量遗传性状,而且在蔬菜栽培种或与其没有生殖隔离的植物中很难找到抗源,即使个别品种有一定的抗性,其抗性水平也比较低。但是在蔬菜野生种中常常有很好的抗源。传统的蔬菜育种克服不了有性杂交的不亲和性和杂种的不育性,但很难利用这些野生植物中的抗源。即使有性杂交得到少量的杂种植株,从中选择出具有较好抗性个体的机会也很小。而且通过有性杂交组合数量遗传的性状需要年限很长。体细胞杂交可以说是为蔬菜抗病育种提供了一条克服生殖障碍,缩短育种年限的捷径。另外,选择非对称杂交途径使野生种与栽培种进行融合,能够在引入野生种的抗病基因的同时尽量减少体细胞杂种中野生种的DNA含量^[9]。正因如此,体细胞杂交才在蔬菜抗病育种中,特别在甘蓝和马铃薯的抗病育种中广泛应用。

Hansen^[31,32]和 Sigareva^[33]等用不抗黑斑病的甘蓝(*Brassica oleracea* L.)分别与对黑斑病高抗的野生植物欧白芥(*Sinapis alba* L.)和亚麻芥(*Camelina sativa* L.)进行体细胞杂交。在所获得的体细胞杂种中均有对黑斑病高抗的个体,从而证明已将野生植物对黑斑病的抗性引入甘蓝。在此之前, Gaikwad 等^[4]用芥菜(*B. juncea* L.)和欧白芥作亲本进行体细胞杂交,虽然所得杂种的生活力低下,但与芥菜回交以后 BC₁ 不仅恢复了生活力,还表现出对黑斑病有一定的抗性。十字花科蔬菜经常患的另一毁灭性病害是软腐病。Ren 等^[34]用芜菁(*B. rapa* L.)和对软腐病高抗的甘蓝作亲本,经体细胞杂交得到体细胞杂种芜菁甘蓝(*B. napus* L.)。虽然杂种群体内对软腐病的抗性差异很大,但是有的植株抗性甚至超过高抗亲本甘蓝。

体细胞杂交在蔬菜抗虫、抗逆育种方面的应用虽然不多,但也有一些成功的例子。如 Shelley^[35]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^[36]对耐霜冻的野生种(*Solanum tuberosum* L.)和栽培种(*S. commersonii* L.)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,其中有三株比野生种亲本的耐性还高。由此可见,体细胞杂交在蔬菜抗病、抗虫和抗逆育种中的应用潜力都很大。

5 改变生理类型

通过体细胞杂交来改变蔬菜生理类型的研究比较少,其中的一例是 Yan 等^[37]用 C₃ 光合类型的甘蓝与 C₄ - C₄ 光合类型(介于 C₃ 与 C₄ 之间)的野生植物(*Moricandia nitens*)做亲本,体细胞杂交后得到体细胞杂种。在参加 CO₂ 补偿点测定的 8 个体细胞杂种中,6 个植株的 CO₂ 补偿点介于两亲本之间(明显低于 C₃ 植物)。其中 CO₂ 补偿点最低的杂种是六倍体的体细胞杂种(2 个 *Moricandia nitens*+1 个甘蓝细胞)。在此之前,Rawsthorne 等^[38]报道 *Moricandia nitens* 和 芜菁甘蓝(*B. napus*)的体细胞杂种 CO₂ 补偿点仅稍低于 C₃ 植物。两个实验结果差异很大,可能是因为 C₃ - C₄ 基因在甘蓝的二倍体基因组(CC)中比在芜菁甘蓝的双二倍体基因组(AACC)中更易表达造成的^[37]。

除此之外,体细胞杂交消除回交转育 CMS 性状时出现的异常现象,也是通过改变杂种的生理特性来实现的。Kirti 等^[22]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。

6 体细胞杂交面临的问题

自从得到首例烟草体细胞杂种以来,体细胞杂交技术已经有很长的历史,也在许多植物上得到了种间、属间,甚至科间体细胞杂种。但是,体细胞杂交在蔬菜育种方面取得的突破性成果并不多。考虑到体细胞杂交的实际应用,它面临的主要问题是:(1)植株再生的难易会直接影响体细胞杂交育种的成败^[39,40]。如豆科和葫芦科植物,植株再生困难,随机性大。因此,原生质体再生困难直接阻碍了体细胞杂交在这些作物上的应用。(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^[28]。不是通过受精作用组合双亲的遗传物质,而是在物理、化学因素诱导下使双亲的体细胞融合。所以在杂种细胞内很容易产生染色体或基因排斥,减数分裂时联会错乱等异常现象,从而导致基因的拷贝数不定。除此之外,所得的体细胞杂种一般是双亲基因组的随机组合,即使是对称体细胞杂交,也极少得到具有两个亲本完整基因组的杂种。上述因素已经成为体细胞杂交育种面临的主要障碍。因此,提高体细胞杂种的遗传稳定性将成为体细胞杂交育种取得突破性进展的关键。(3)用射线照射(紫外线, X, γ 射线等)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^[41],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^[14]。由于体细胞非对称杂交具有一些独特优点,其应用受到重视。但目前还不能严格控制用射线等因素打断供体染色体的程度,向受体转移特定基因还具有很强的随机性。因此,进一步优化处理供体原生质体的措施,降低转移供体基因的随机性显得尤其重要。(4)体细胞杂交育种同样面临着杂种不育或育性差的问题。利用体细胞杂交技术已经得到许多植物的体细胞杂种,然而一些植物的属间体细胞杂种存在着不育或育性低的问题。这一问题很可能是由上述的遗传不稳定性造成的。因此研究体细胞杂种的遗传基础乃是重中之重。

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,能够促进体细胞杂交在蔬菜育种中取得突破性进展。除此之外,体细胞杂交时选用不同基因型的个体作亲本得到正常植株的希望比较大;延长再生过程能够增加重组率;采用不同的培养方法和诱导植株再生的方法能在一定程度上避免遗传信息丢失^[39]。非对称杂交获得的杂种含供体亲本染色体片段的频率比较高,而对称杂交会使杂种含有较多完整双亲染色体^[42]。所以在体细胞杂交前多选择几个基因型的植株作亲本,慎重选择对称杂交还是非对称杂交,选择合适的融合产物培养方法,以及选择出最好的再生植株加以研究利用都很重要。

总之,体细胞杂交在创造蔬菜新种质,转育蔬菜优良性状,提高蔬菜的抗性,改变蔬菜生理类型等方面都有独特的优点。但是,体细胞杂交也是一项非常精细繁琐的工作,各方面都要考虑周全。作为传统育种的辅助手段,体细胞杂交常常与花药培养^[4,10,11],回交等育种方法相结合,才能发挥其优势,完成新品种的选育,推进蔬菜育种工作的发展。

参 考 文 献

- [1] 高东迎,黄雪青,孙立华.水稻体细胞杂交研究进展[J].生物工程进展,2001,21(3):38-41.
- [2] RICHARD H, OZMINKOWSKI J R, JOURDAN P S. Comparison of somatic and sexual interspecific hybridization for the development of new brassica vegetable crops [J]. *New crops*, 1993, 2: 565-569.
- [3] LOSSL A, ADLER N, HORN R, et al. Chondriome-type characterization of potato:mt α , β , χ , δ , ϵ and novel plastid-mitochondrial configurations in somatic hybrids [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 18: 1-10.
- [4] GAIKWAD K, KIRTI P B, SHARMA A, et al. Cytogenetical and molecular investigations on somatic hybrids of *Sinapis alba* and *Brassica juncea* and there backcross progeny [J]. *Plant Breeding*, 1996, 115: 480-483.
- [5] 刘继红,邓秀新.植物原生质体非对称融合及其在育种上的应用[J].生命科学,1999,11增刊
- [6] 田志宏,孟金陵.芸薹属作物原生质体融合及基因转移[J].中国油料,1997,9(1):70-75.
- [7] FORSBERG J, LAGERCRANTZ U, GLIMELIUS K. Comparison of UV light, X-ray and restriction enzyme treatment as tools in production of asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 1178-1185.
- [8] 司家刚,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.
- [9] RASMUSSEN J O, LOSSL A, RASMUSSEN O S. Analysis of the plastome and chondriome origin in plants regenerated after asymmetric *Solanum* ssp. protoplast fusions [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 336-343.
- [10] RASMUSSEN J O, NEPPER J P, KIRK H G, et al. Combination of resistance to potato sate blight in foliage and tubers by intraspecific dihaploid protoplast fusion [J]. *Euphitica*, 1998, 102: 363-370.
- [11] THIEME R, DARSOW U, GAVRILENKO T, et al. Production of somatic hybrids between *S. tuberosum* L. and late blight resistant Mexican wild species [J]. *Euphitica*, 1997, 97: 189-200.
- [12] CARRIGA-CALDERE F, HUIGEN D J, FILOTICO F, et al. Identification of alien chromosomes through GISH and RFLP analysis and the potential for establishing potato lines with monosomic additions of tomato chromosomes [J]. *Genome*, 1997, 40: 66-673.
- [13] BINSFELD P C, SCHNABL H. Molecular and cytogenetic constitution of plants obtained via two different somatic hybridization methods [J]. *Plant Cell Rep*, 2002, 21: 58-62.
- [14] OBERWALDER B, SCHILDE-RENTSCHLER L, RUOB B, et al. Asymmetric protoplast fusions between wild species and breeding lines of potato- effect of recipients and genome stability [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 1347-1354.
- [15] ROKKA V M, TAURIAINEN A, PIETILA L, et al. Interspecific somatic hybrids between wild potato *Solanum acaule* Bitt. and anther-derived dihaploid potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 18: 82-88.
- [16] KANNO A, KANZAKI H, KAMEYA T. DNAs from the hybrid plant generated by asymmetric protoplasts fusion between radish and cabbage [J]. *Plant Cell Reports*, 1997, 16: 479-484.
- [17] CARDI T, BASTIA T, MONTIL, et al. Organelle DNA and male fertility variation in *Solanum* spp. and interspecific somatic hybrids [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 819-828.
- [18] BUIITVELD J, SUO Y, LOOKEREN CAMPAGNE M M, et al. Production and characterization of somatic hybrid plants between leek (*Allium ampeloprasum* L.) and onion (*Allium cepa* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 765-775.
- [19] YAMAMOTO T, NAKAJIMA Y, OEDA K. Morphological changes in homeotic cytoplasmic male-sterile carrots combined with cytoplasm by asymmetrical cell fusion [J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 363-370.
- [20] HARDING K, MILLAM S. Analysis of chromatin, nuclear DNA and organelle composition in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum sanctae-rosae* [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 939-947.
- [21] RAMBAUD C, BELLAMY A, DUBREUCQ A, et al. Molecular analysis of the fourth progeny of plants derived from a cytoplasmic male sterile chicory cybrid [J]. *Plant Breeding*, 1997, 116: 481-486.
- [22] KIRTI P B, PRAKASH S, GAIKWAD K, et al. Chloroplast substitution overcomes leaf chlorosis in a *Moricandia arvensis*-based cytoplasmic male sterile *Brassica juncea* [J]. *Theor Appl*

- Genet*, 1998, **97**: 1179 – 1182.
- [23] 侯喜林, 曹寿椿, 余建明等. 原生质体融合获得不结球白菜胞质杂种[J]. 园艺学报, 2001, **28**(6): 532 – 537.
- [24] BALDEV A, GALKWAD K, KIRTI P B, *et al.* Recombination between chloroplast genomes of *Trachystoma ballii* and *Brassica juncea* following protoplast fusion [J]. *Mol Gen Genet*, 1998, **260**: 357 – 361.
- [25] TANNO-SUENAGA L, ICHIKAWA H, IMAMURA J. Transfer of the CMS trait in *Daucus carota* L. by donor-reipient protoplast fusion [J]. *Theor Appl Genet*, 1988, **76**: 855 – 860.
- [26] MOHAPATRA T, KIRTI P B, DINESH KUMAR V, *et al.* Random chloroplast segregation and mitochondrial genome recombination in somatic hybrid plants of *Diplotaxis catholica*+*Brassica juncea* [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, **17**: 814 – 818.
- [27] SMITH M A, PAY A, DUDITS D. Analysis of chloroplast and mitochondrial DNAs in asymmetric somatic hybrid between tobacco and carrot [J]. *Theor Appl Genet*, 1989, **77**: 641 – 644.
- [28] LIU CLARKE J H, CHEVRE A M, LANDGREN M, *et al.* Characterization of sexual progenies of male-sterile somatic cybrids between *Brassica napus* and *Brassica tournefortii* [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, **99**: 605 – 610.
- [29] IWABUCHI M, KOIZUKA N, FUJIMOTO H, *et al.* Identification and expression of the kossena radish (*Raphanus sativus* cv. Kossena) homologue of the ogura radish CMS-associated gene, *orf138* [J]. *Plant Mole Biol*, 1999, **39**: 183 – 188.
- [30] BONHOMME S, BUDAR F, FERANT M, *et al.* A 2.5 kb *NcoI* fragment of ogura radish mitochondrial DNA is correlated with cytoplasmic male-sterility in *Brassica* cybrids [J]. *Curr Genet*, 1991, **19**: 121 – 127.
- [31] HANSEN L N, EARLE E D. Somatic hybrids between *Brassica oleracea* L. and *Sinapis alba* L. with resistance to *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, **94**: 1078 – 1085.
- [32] HANSEN L N. Intertribal somatic hybridization between rapid cycling *Brassica oleracea* L. and *Camelina sativa* (L.) Crantz [J]. *Euphytica*, 1998, **104**: 173 – 179.
- [33] SIGAREVA M A, EARLE E D. Camalexin inducible in intertribal somatic hybrids between *Camelina sativa* and rapid-cycling. *Brassica oleracea Theor Appl Genet*, 1999, **98**: 164 – 170.
- [34] REN J P, DICKSON M H, EARLE E D. Improved resistance to bacterial soft rot by protoplast fusion between *Brassica rapa* and *B. oleracea* [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, **100**: 810 – 819.
- [35] SHELLEY J, SANDRA A P, CORINE M. Colorado potato beetle resistance in somatic hybrids of diploid interspecific *Solanum* clones [J]. *Hort Science*, 1999, **34**(5): 922 – 927.
- [36] BASTIA T, CAROTENUTO N, BASILE B, *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. commersonii* [J]. *Euphytica*, 2000, **116**: 1 – 10.
- [37] YAN Z, TIAN Z, HUANG B, *et al.* Production of somatic hybrids between *Brassica oleracea* and the C₃-C₄ intermediate species *Moticanandia nitens* [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, **99**: 1281 – 1286.
- [38] RAWSTHON S, MORGAN C L, O'EILL C M, *et al.* Cellular expression pattern of the glycine decarboxylase P protein in leaves of an intergeneric hybrid between the C₃-C₄ intermediate species *Moticanandia nitens* and the C₃ species *Brassica napus* [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, **96**: 922 – 927.
- [39] MERCEDES D, LUIS G C, MIREIA B, *et al.* Regeneration and characterization of *Cucumis melo* L. (+) *Cucumis anguria* L. var. longipes (Hook. fil.) Meeuse somatic hybrids [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, **52**: 123 – 131.
- [40] HU Q, ANDERSEN S, HANSEN L N. Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, **59**: 189 – 196.
- [41] CHEN L Z, ADACHI T. Protoplast fusion between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*-complex: somatic embryogenesis, plant regeneration and morphology [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, **17**: 508 – 514.
- [42] BOHMAN S, FORSBERG J, GLIMELIUS K, *et al.* Inheritance of *Arabidopsis* DNA in offspring from *Brassica napus* and *A. thaliana* somatic hybrids [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, **98**: 99 – 106.

The Applicability of Somatic Hybridization in Vegetable Breeding

YAN Jing, ZHANG Ming Fang*, CHEN Li Ping

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

Abstract: In this paper, the applicability of somatic hybridization in vegetable breeding is reviewed, including innovation of new germplasm, creation and transfer of CMS trait; enhancement of disease resistance, insect resistance and stress resistance, and improvement of physiological type. Furthermore, its main weakness and corresponding problems are also discussed.

Key words: somatic hybridization; vegetable; new germplasm

*Corresponding author, E-mail: mfzhang@zju.edu.cn