

菊科植物原生质体融合研究进展

赵宏波 陈发棣* 房伟民

(南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095)

摘要: 原生质体融合是转移目标性状, 特别是那些多基因控制或尚未克隆目标基因控制的性状的一种很有潜力的方法。菊科植物中原生质体融合研究主要集中在向日葵属 (*Helianthus*)、菊属 (*Dendranthema*)、莴苣属 (*Lactuca*) 等少数几个属, 主要围绕抗性改良、雄性不育材料的获得、多倍体诱导、育种中间材料的创造等方面展开研究。本文对历年来菊科植物原生质体融合方面的研究作一综述, 并对存在的问题和改进措施进行了探讨。

关键词: 菊科; 原生质体融合; 综述

中图分类号: S 682.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 04-0908-07

Progress on the Research on Protoplast Fusion of Compositae Plants

Zhao Hongbo, Chen Fadi*, and Fang Weimin

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: Protoplast fusion is a potential method, by which the target characters, especially ones controlled by multigenes or un-cloned genes, can be transferred. The research on protoplast fusion of Compositae plants has been focused on *Helianthus*, *Cichorium*, *Dendranthema*, *Lactuca* genera etc, and the purposes are concentrated on resistance improvement, male-sterile materials, polyploid induction and obtainment of intermediate materials. In this paper we reviewed the achievements of protoplast fusion of Compositae plants, and discuss on existent questions at present and further improvements.

Key words: Compositae; Protoplast fusion; Review

菊科 (Compositae) 是显花植物中最大的科, 包含有很多重要的油料作物、蔬菜作物、药用植物、观赏植物^[1], 经过人为选择和长期栽培, 各种栽培作物都已育出一批具有较好农艺性状的栽培品种, 这为性状的进一步改良和创新奠定了良好的物质基础; 但是在目前集约化和设施化栽培模式条件下, 品种的抗性、适应性等受到了严峻的考验, 而且频繁的栽培和轮作加重了病虫害的传播和感染。人们利用多种育种途径改良、优化现有栽培品种的各种性状。常规杂交在品种选育和性状改良方面发挥了重要的作用, 但由于杂交亲和性障碍的限制, 在一些作物或一些性状的改良方面显得束手无策。基因工程在作物育种中同样也发挥了重要的作用, 但由于受目前获得的可利用的目的基因较少、控制优良性状基因的复杂性、转化后的有效性以及对其他作物的适用性等因素的影响, 基因工程在菊科植物上的应用受到了一定限制。

各种栽培作物在自然界中分布有大量的野生近缘种, 这些野生材料具有抗病、抗虫、耐盐、耐旱、抗寒等优良性状, 是良好的育种材料^[2]。利用原生质体融合技术, 在已知优良性状而未得到具体基因的前提下, 利用近缘或远缘材料中包含的优良基因或性状, 可以有针对性地进行有效基因和优良性状的转移, 特别是对于转移那些数量性状和多基因控制的性状而言, 原生质体融合将是一条捷径。建立原生质体再生体系是进行原生质体融合的基础, 到目前为止, 在菊科中已经有 20 个属 50 多

收稿日期: 2005 - 07 - 08; 修回日期: 2005 - 10 - 18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30400308); 江苏省科技厅高技术研究项目 (BG2003305, BG2004310); 江苏省农业三项工程项目 [SX (2003) 065]; 上海农委重点攻关项目 [(2004) D3-1]

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: chenfd@njau.edu.cn)

种植物的原生质体培养获得了再生^[3~9]。从 20 世纪 90 年代前后, 相继展开了菊科植物融合研究, 主要集中在向日葵属 (*Helianthus*)^[10, 11]、菊属 (*Dendranthema*)^[12, 13]、莴苣属 (*Lactuca*)^[14, 15]等少数几个属。本文对菊科植物原生质体融合作一综述, 以期为今后利用原生质体融合及其相关技术进行菊科植物遗传改良等方面的研究提供参考依据。

1 融合方法和类型

在菊科植物中, 诱导原生质体融合主要有 PEG法和电融合法, 也可以将两种方法结合起来使用。利用 PEG法相继获得了菊苣与向日葵属间杂种 (*C. intybus* × *H. annuus*)^[16]、向日葵属内种间杂种 (*H. annuus* × *H. annuus*)^[17]、*H. annuus* × *H. giganteus*^[18]、*H. annuus* × *H. maximiliani*^[11, 19]、莴苣属内种间杂种 (*L. tatarica* × *L. perennis*)^[14]、菊蒿属内种间杂种 (*Tanacetum vulgare* × *T. cinerariifolium*)^[20]; 利用电融合法获得了菊花与智利喇叭花 (茄科) 的科间杂种 (*D. grandiflorum* × *Salpiglossis sinuata*)^[21]、菊花与大籽蒿的属间杂种 (*D. grandiflorum* × *Artemisia sieversiana*)^[12]、莴苣属内种间杂种 (*L. sativa* × *L. virosa*)^[22]、*L. sativa* × *L. perennis*^[15]、*L. sativa* × *L. tatarica*^[15]、金光菊属种间杂种

表 1 菊科植物的原生质体融合

Table 1 Protoplast fusion in compositae plants

种 Species	原生质体来源 Source of protoplasts	融合方法 Methods	试验结果 Results	参考文献 Reference
菊苣 <i>Cichorium intybus</i>	叶片 Leaf	PEG	四倍体植株 Tetraploid plants	27
菊苣 × 向日葵 <i>C. intybus</i> × <i>Helianthus annuus</i>	叶肉细胞, 下胚轴 Mesophyll cell, hypocotyl	PEG	雄性不育植株 Male sterile plants	31, 16
金盏菊 <i>Calendula officinalis</i> × <i>Ca. officinalis</i>	叶肉细胞 Mesophyll cell	激光微束 Laser microbeam		25
菊花 × 智利喇叭花 <i>Chrysanthemum morifolium</i> × <i>Salpiglossis sinuata</i>	叶片 Leaf	电融合 Electrofusion	杂种植株 Hybrids plants	13
菊花 × 智利喇叭花 <i>Dendranthema grandiflorum</i> × <i>Sa. sinuata</i>	叶片 Leaf		杂种植株 Hybrids plants	21
菊花 × 大籽蒿 <i>D. grandiflora</i> × <i>Artemisia sieversiana</i>	叶肉细胞 Mesophyll cell	电融合 Electrofusion	抗锈病植株 Resistance rust hybrids	12
向日葵 <i>Helianthus annuus</i> × <i>H. annuus</i>	叶肉细胞, 下胚轴 Mesophyll cell, hypocotyl	PEG, 电融合 Electrofusion	不育植株 Sterile plants	32 ~ 35
向日葵 <i>H. annuus</i> × <i>H. giganteus</i>	下胚轴, 叶肉细胞, 微原生质体 Hypocotyl, mesophyll cell, microprotoplast	PEG	可育的杂种植株 Fertile hybrids plants	11, 18, 19
向日葵 <i>H. annuus</i> × <i>H. maximiliani</i>	下胚轴, 叶肉细胞, 微原生质体 Hypocotyl, mesophyll cell, microprotoplast	PEG	杂种植株 Hybrids plants	11, 19
向日葵 × 蚕豆 <i>H. annuus</i> × <i>Vicia faba</i>	下胚轴, 保卫细胞 Hypocotyl, guard cell	电融合 Electrofusion	杂种细胞 Hybrid cells	36
莴苣 <i>Lactuca sativa</i> × <i>L. virosa</i>	叶片 Leaf	电融合 Electrofusion	不育的杂种植株 Sterile hybrids plants	22
莴苣 <i>L. sativa</i> × <i>L. perennis</i>	小叶 Leaflet	电融合 Electrofusion	杂种植株 Hybrids plants	15
莴苣 × 蒙山莴苣 <i>L. sativa</i> × <i>L. tatarica</i>	小叶, 叶片 Leaflet, leaf	电融合 Electrofusion	气候敏感型杂种 Climatic sensitive hybrids	15
蒙山莴苣 <i>L. tatarica</i> × <i>L. perennis</i>	小叶 Leaflet	PEG	可育的种间杂种 Fertile interspecific hybrids	14
黑心金光菊 × 金光菊 <i>Rudbeckia hirta</i> × <i>R. laciniata</i>	叶片, 愈伤组织 Leaf, callus	电融合 Electrofusion	体细胞杂种植株 Somatic hybrid plants	23
<i>Senecio fuchsii</i> × <i>Se. jacobaea</i>		高钙高 pH 值 High Ca ²⁺ high pH	体细胞杂种和胞质杂种 Somatic hybrids and cybrids	24
菊蒿 <i>Tanacetum vulgare</i> × <i>T. cinerariifolium</i>	叶肉细胞 Mesophyll cell	PEG	杂种愈伤组织 Hybrid calli	20

注: 广义菊属拉丁学名为 *Chrysanthemum*, 狭义菊属 *Dendranthema*; 本文是以原文中的学名表示。

Note: *Chrysanthemum* is the sense of sensu lato, and *Dendranthema* is the sense of sensu stricto. But in this paper still according to the original authors

(*Rudbeckia hirta* × *R. laciniata*^[23]) (表 1)。也有利用其它方法诱导融合, 但应用较少, 例如 Wang 等^[24]用高钙高 pH 值诱导千里光属 (*Senecio*) 两种植物融合获得了杂种植株; 卜宗式等^[25]应用激光微束法诱导金盏菊 (*Calendula officinalis*) 叶肉细胞原生质体融合, 但未获得杂种后代。

原生质体融合分为对称融合和不对称融合。对称融合是两个完整原生质体间的融合; 不对称融合是某一亲本的完整原生质体与另一亲本的不完整原生质体如胞质体 (Cytoplast, 利用物理或化学的方法制备仅含有胞质基因组的胞质体)、微质体 (Miniprotoplast, 包含一条或几条染色体的微质体或亚原生质体) 或细胞核 (仅含有细胞核或含有极少量细胞质的微核等) 等的融合^[26]。不对称体细胞杂种只包含另一亲本的部分染色体或基因组, 将从一定程度上改良体细胞杂种, 扩大其应用范围, 但这将大大增加技术上的难度。例如, Binsfeld 等^[19]将向日葵下胚轴原生质体与多年生向日葵属植物 *H. giganteus* 和 *H. maximiliani* 的微核进行融合, 创造了含有 2~8 条野生种染色体的杂种植株。这表明不对称融合可以有效地克服有性杂交的障碍, 实现从野生种到栽培种的优良性状 (基因) 的转移或渗入。Varotto 等^[16]将菊苣叶肉原生质体与一个向日葵胞质雄性不育系的下胚轴胞质体 (经 γ-射线照射处理使细胞核失活) 进行融合, 获得了胞质雄性不育的杂种材料。从目前的报道来看, 菊科植物主要是对称融合。

2 杂种细胞、杂种植株的筛选和鉴定

在原生质体融合研究中, 对杂种细胞的筛选、分离和杂种植株的鉴定十分重要。对杂种细胞的筛选主要有: 根据亲本与杂种原生质体密度不同利用梯度离心进行选择, 利用杂种和亲本原生质体对外源植物生长调节剂的要求不同进行选择, 利用生长特性和愈伤组织颜色不同进行选择, 根据原生质体形态机械分离杂种细胞, 荧光激活分选杂种细胞、亲本原生质体等^[26]。而对杂种植株的筛选主要通过形态学观察、育性检查、染色体数目和核型分析、减数分裂行为、生物化学和分子标记等方法。另外, 进行杂种筛选和鉴定的时期也很重要。将某一亲本的原生质体用碘乙酸或碘乙酰胺处理, 使其不能分化, 这可以减少后期筛选的步骤和工作量; 利用流式细胞仪可以在愈伤组织或植株各个生长阶段初步鉴定出杂种。

Keskitalo 等^[20]对艾菊和除虫菊的杂种愈伤组织进行了鉴定, 其主要通过检测核 DNA 总量、挥发类化合物种类及含量和 RAPD 分子标记等进行杂种鉴定, 核 DNA 总量和 RAPD 分子标记都能很好地鉴定出杂种, 但由于挥发类化合物在愈伤组织中含量很少, 有的甚至检测不到, 所以通过检测挥发类化合物种类和含量的方法未能鉴定出杂种。因此, 在进行杂种鉴定时不仅要注意杂种的发育时期, 而且还要将多种方法结合使用, 以争取得到更加可靠的结果。Rambaud 等^[27]通过测定气孔保卫细胞中叶绿体的数量来鉴定杂种, 杂种中产生了两种类型的植株, 一种叶绿体数目为 18~20 个, 从而判断其为二倍体, 而另一类型叶绿体数目为 23~24 个, 可判断其为四倍体, 为同一亲本两个原生质体融合体再生形成的植株。

在融合体的再生植株中不仅包含杂种植株也包括了亲本植株, 这给杂种的筛选带来了很大麻烦。构建含有 1 个显性标记和 1 个隐性标记的杂种材料, 在植株再生阶段就可将杂种植株筛选出来, 这在胡萝卜^[28]、烟草^[29]等上得到了验证。在菊科植物中, Chupeau 等^[14]利用带抗卡那霉素显性性状的杂合的莴苣品种 'Ardente' 与带白化隐性性状的杂合的莴苣品种 'Girelle' 杂交获得了抗卡那霉素的白化材料, 构建了含有抗卡那霉素显性性状和白化隐性性状的双标记材料, 利用这个材料与莴苣属野生种 *L. tatarica* 和 *L. perennis* 进行了原生质体融合, 利用抗卡那霉素和白化这两个标记性状, 在植株再生阶段就筛选得到了 9 个种间杂种, 并通过 RAPD 分析得以证实, 这证明了构建的双选择标记材料的实用性和准确性。

3 杂种后代的细胞学分析

原生质体融合是转移目标性状特别是多基因控制或尚未克隆目标基因控制的性状 (从野生种转

移到栽培种)的一种很有潜力的方法^[11],能有效克服杂交亲和障碍,从而扩大遗传多样性。对杂种后代的染色体行为分析是鉴定杂种最有效和可靠的证据之一。在体细胞杂种中,部分同源染色体减数分裂过程发生重组是成功实现基因渗透的前提。来自不同物种的基因组重组在一起,造成部分同源染色体之间配对降低,形成不平衡的配偶子,因此杂种通常是不育或半不育的;但若杂种中发生整条染色体或较小片段的互换,那么形成稳定、可育的杂种的几率将增加。在近缘种的杂种中经常发生染色体的部分消除,形成附加系,这样发生染色体替换和基因渗透的可能性就大大增加。通常在杂种中,如果两个亲本基因组之间亲缘关系较近或者存在控制配对的基因,允许部分同源的染色体发生配对,那么就会形成多价体,这种多价体稳定性较差,因此杂种的育性也降低;然而在这种情况下,从供体到受体发生小片段基因渗透的几率将大大增加。B insfeld等^[19]利用不对称融合创造了含有2~8条野生种(*H. giganteus*和*H. maximiliani*)染色体的向日葵杂种,通过杂种的减数分裂行为观察发现,大部分性母细胞表现正常,但有一些异常现象发生如后期染色体桥、落后染色体、单价体和多价体等,杂种花粉活力和染色体数目呈显著的负相关;对杂种分析后得出结论:尽管存在减数分裂异常现象,但是杂种的大多数花粉母细胞减数分裂正常,产生的花粉具有较高的活力,杂种中包含的外源基因组能通过有性方式传递给后代^[30]。

4 原生质体融合在菊科植物中的应用

4.1 提高抗性

利用原生质体融合技术克服有性杂交障碍将野生种的抗性基因转入到栽培品种中,是包括菊科植物在内大部分植物中应用最广泛的。Henn等^[11]用PEG法诱导向日葵下胚轴和抗核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)的向日葵属植物*H. maximiliani*、*H. giganteus*和*H. nuttallii*叶肉原生质体融合,经过培养获得了*H. annuus* × *H. maximiliani*和*H. annuus* × *H. giganteus*杂种,形态学和RAPD分析证明确实是种间杂种;杂种植株在3~4个月后均开花结实,70%~80%的种子具有活力。莴苣属野生种*L. virosa*高抗蚜虫、*Erysiphe cichoracearum*引起的白粉病、*Pseudomonas cichorii*和*Erwinia carotovora*引起的细菌性软腐病等。Matsumoto等^[22]用电融合法诱导栽培莴苣和*L. virosa*原生质体融合,获得了21个再生植株,利用同工酶和染色体分析证明这些再生植株为种间杂种,都具有正常的花,但不育。Maisonneuve等^[15]进行了栽培莴苣与*L. virosa*、*L. tatarica*、*L. perennis*原生质体融合,成功获得了杂种,初步实现了抗性的转移,但要育成完全可育的带有抗性性状的莴苣品种,还需要将获得的体细胞杂种与栽培品种进一步回交,以纯化性状。Furuta等^[12]利用电融合法诱导菊花和大籽蒿叶肉原生质体融合,菊花原生质体预先经过碘乙酰胺使其在培养过程中不能分裂,最终获得了1342个再生植株,经RFLP分析这些再生植株全部是体细胞杂种,这些杂种比菊花表现出更强的抗锈病能力。

4.2 雄性不育材料的获得

Ramnaud等^[31]诱导菊苣叶肉原生质体和雄性不育的向日葵下胚轴原生质体融合获得了雄性不育的菊苣胞质杂种;利用线粒体基因组的特异基因为探针的分子杂交技术研究发现,向日葵大部分的线粒体DNA与菊苣线粒体DNA发生了重排,这改变了菊苣的线粒体基因,使花表现异常和不育。Varotto等^[16]将菊苣叶肉原生质体与一个向日葵胞质雄性不育系的下胚轴胞质体(经 γ -射线照射处理)进行融合,获得了胞质雄性不育的杂种材料;以玉米线粒体特异基因*Cox*、*Cox*、*Cob*、*atpA*为探针进行Southern杂交分析,表明胞质杂种基因组中含有菊苣基因组控制可育性的基因片段和向日葵基因组的控制不育性的基因片段。

4.3 多倍体材料的获得

利用原生质体融合技术诱导同种材料的原生质体融合,获得融合细胞,培养、再生植株,从而获得多倍体材料。Ramnaud等^[27]利用PEG法诱导二倍体菊苣*C. intybus*叶肉细胞原生质体融合,进行培养,最后有97个愈伤组织再生了植株并且生根,通过检测气孔细胞的叶绿体数目和根尖染色体数目,发现

有 24 个产生四倍体植株, 远远高于利用秋水仙素诱导多倍体的发生频率。因此, 在已经建立原生质体再生体系的植物上, 利用同种材料的原生质体融合创造多倍体材料将是一种非常有效的途径。

4.4 方法学方面的研究

保卫细胞中有和 C4 途径相关联的酶系统, 能降低光呼吸, 提高作物产量; 因此如何将保卫细胞中的特异基因转移到 C3 植物成为一个热点研究课题。Schnabl 等^[36]为了探讨这种可能性, 利用诱导向日葵下胚轴原生质体和蚕豆保卫细胞原生质体融合, 获得了多细胞团, 虽然未获得再生植株, 但为进一步深入研究奠定了基础。卜宗式等^[25]以金盏菊叶肉细胞原生质体为材料, 研究了激光微束诱导原生质体融合的效果, 结果表明: 当照射到细胞膜表面激光微束的能量密度约有 $0.2 \mu\text{J}/\mu\text{m}^2$ 时, 对被选择融合的细胞对接连施加 40 ~ 50 脉冲, 可导致金盏菊叶肉原生质体融合, 其中激光的强度、作用位点、光斑性状等对融合成功率影响很大。

4.5 创造中间材料

体细胞杂种植株由于包含两个亲本的全部或者部分染色体, 减数分裂行为紊乱, 而且伴随着一些异常现象 (如滞后染色体、单价体、多价体等), 从而导致不育; 获得的杂种一般含有两个亲本的原始性状 (通常都是栽培品种与其近缘野生种进行融合, 因此获得的杂种一般都具有部分野生性状), 有的即使转移了某一亲本的一些优良性状但同时也带进了一些不良性状, 这就很大程度上限制了杂种后代的应用, 因此很多获得的杂种都只作为中间材料加以利用。Krasnyanski 等^[18]诱导 *Helianthus annuus* 和 *H. giganteus* 原生质体融合, 获得了可育的杂种, 虽然没有获得 *H. giganteus* 的多年生性状, 但其具有很强的离体再生能力, 将其与向日葵栽培品种回交创造新的向日葵种质, 将是基因操作的良好受体。Matsumoto 等^[22]用电融合法获得莴苣 \times *L. virosa* 体细胞杂种, 但不育; Al-Atabie 等^[23]用电融合法获得了黑心金光菊 (*Rudbeckia hirta*) \times 金光菊 (*R. laciniata*) 的种间杂种; Wang 等^[24]利用高 Ca^{2+} 高 pH 诱导 *Senecio fuchsii* \times *S. jacobaea* 原生质体融合, 获得了种间杂种; Keskitalo 等^[20]利用 PEG 法获得了菊蒿 (*Tanacetum vulgare*) \times *T. cinerariifolium* 的种间杂种。这些工作的完成, 都为进一步的育种工作准备了良好的材料, 奠定了坚实的基础。

5 问题与展望

从第一例菊科植物原生质体融合再生植株报道以来^[3], 菊科植物原生质体研究取得了一系列的成果, 但是还存在很多问题, 例如融合体再生能力差, 杂种植株性状较差 (不育、生根能力差、生长势较弱等) 等。原生质体融合即使是不对称融合, 杂种都包含了供体和受体的基因组, 常带有一些不利的非目标性状。因此, 就目前的研究结果来看, 体细胞杂种的有效性是菊科植物原生质体融合中最大的问题。针对这些问题, 我们可以从以下几个方面展开工作: (1) 继续深入研究各个材料的原生质体再生技术。目前, 虽然已经建立了很多种菊科植物的原生质体再生体系^[37~40], 但是同一种材料不同栽培品种之间的原生质体再生能力差异很大^[41], 例如 Motonobu 等^[42]用菊花两个品种的叶片分离原生质体, 结果两个品种原生质体的产量相差近两倍, 培养后的植板率相差近一倍; 而一些重要品种原生质体再生困难^[43]; 有的种只是建立了某个品种的再生体系, 但不一定是目标改良品种; 还有一些重要材料原生质体再生困难^[44], 如非洲菊、菊芋等。(2) 积极探索适合不同材料的不对称融合技术。虽然不对称融合不能排除带有某些非目的性状, 但相对于对称融合而言, 不对称融合的杂种中非目的性状较少, 且杂交亲和性高, 我们可以利用回交、杂交等方法加以剔除。(3) 将原生质体融合与染色体显微操作、染色体基因定位、细胞拆合与重组等分子细胞遗传学方法结合起来; 可以将控制某些优良性状的基因利用染色体作图先行在染色体上定位、标记, 然后制作含有标记染色体的微质体或亚原生质体, 诱导融合, 从而定向改造某些性状, 创造出性状优良的材料。例如 Furuta 等^[12]利用电融合法获得了抗锈病的菊花材料, 但也带入了大籽蒿的其它性状, 花色、花型、花径等有所改变, 影响了观赏品质; 我们可以先行将大籽蒿的抗锈病基因进行定位, 然后制备胞质体或微质体, 进

行菊花完整原生质体与统一的胞质体或微质体不对称融合, 创造具有抗性且观赏性状优良的菊花材料。(4) 将原生质体融合(对称、不对称融合)与遗传转化、常规杂交等育种方法结合起来, 更有效地转移、纯化优良性状, 创造优异种质。

参考文献:

- 1 Al-Atabey J S, Power J B. Protoplast isolation and plant regeneration in ornamental Compositae. *Acta Horticulture*, 1990, 280: 255 ~ 258
- 2 Binding H, Nehls R, Rock J, Finger J, Mordhorst G. Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceous species of the Dicotyledoneae class. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1981, 101: 119 ~ 130
- 3 Von A K, Hans G L C, Heide S, Tohsak L M. Influence of electrical treatment and cell fusion on cell proliferation capacity of sunflower protoplasts in very low density culture. *Plant Science*, 1997, 126: 79 ~ 86
- 4 Chanabe C, Burrus M, Bidney D, Alibert G. Studies on plant regeneration from protoplasts in the genus *Helianthus*. *Plant Cell Reports*, 1991, 9: 635 ~ 638
- 5 Keskitalo M, Kanerva T, Pehu E. Development of in vitro procedures for regeneration of petiole and leaf explants and production of protoplast-derived callus in *Tanacetum vulgare* (Tansy). *Plant Cell Reports*, 1995, 14: 261 ~ 266
- 6 Okamura M, Hayashi T, Miyazaki S. Inhibiting effect of ammonium ion in protoplast culture of some Asteraceae plants. *Plant & Cell Physiology*, 1984, 25: 281 ~ 286
- 7 Pan Z G, Liu S J, Murch S J, El-Demerdash M, Saxena P K. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of the Egyptian medicinal plants *Artemisia judaica* and *Echinops spinosissimus* Turra. *Plant Science*, 2003, 165: 681 ~ 687
- 8 Nenz E, Varotto S, Luchin M, Parrini P. An efficient and rapid procedure for plantlet regeneration from chicory mesophyll protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2000, 62 (1): 85 ~ 88
- 9 Engler D E, Grogan R G. Isolation, culture and regeneration of lettuce leaf mesophyll protoplasts (*Lactuca sativa* ssp. *capitata*). *Plant Science Letters*, 1983, 28 (2): 223 ~ 229
- 10 Moyne A L, Thor V, Pelissier B, Bergounioux C, Freyssinet G, Gadal P. Callus and embryoid formation from protoplasts of *Helianthus annuus*. *Plant Cell Reports*, 1988, 7 (6): 437 ~ 440
- 11 Henn H J, Wingender R, Schnabl H. Regeneration of fertile interspecific hybrids from protoplast fusions between *Helianthus annuus* L. and wild *Helianthus* species. *Plant Cell Reports*, 1998, 18: 220 ~ 224
- 12 Furuta H, Shinoyama H, Y Nomura, Maeda M, Makara K. Production of intergeneric somatic hybrids of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Ramat.) and wormwood (*Artemisia sieversiana* J. F. Ehrh. ex Willd.) with rust (*Puccinia horiana* Henning) resistance by electrofusion of protoplasts. *Plant Science*, 2004, 166 (3): 695 ~ 702
- 13 Khalid N, Lee C H, Power J B, Davey M R. Plant regeneration from electrofused protoplasts of *Chrysanthemum morifolium* and *Salpiglossis sinuata*. *Current Plant Science & Biotechnology in Agriculture*, 1988, 7: 269 ~ 270
- 14 Chupeau M C, Maisonneuve B, Bellec Y, Chupeau Y A. *Lactuca* universal hybridizer, and its use in creation of fertile interspecific somatic hybrids. *Molecular and General Genetics*, 1994, 254: 139 ~ 145
- 15 Maisonneuve B, Chupeau M C, Bellec Y, Chupeau Y. Sexual and somatic hybridization in the genus *Lactuca*. *Euphytica*, 1995, 85: 281 ~ 285
- 16 Varotto S, Nenz E, Lucchin M, Parrini P. Production of asymmetric somatic hybrid plants between *Cichorium intybus* L. and *Helianthus annuus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102: 950 ~ 956
- 17 Trabace T, Fiore M C, D'Ambrosio C, Vanadia S, Sunseri F. Sunflower cytoplasmic hybrids revealed by PCR assay using male sterility as selectable marker. *Journal of Genetics and Breeding*, 1996, 50: 29 ~ 34
- 18 Krasnyanski S, Menczel L. Production of fertile somatic hybrid plants of sunflower and *Helianthus giganteus* L. by protoplast fusion. *Plant Cell Reports*, 1995, 11: 7 ~ 10
- 19 Binsfeld P C, Wingender R, Schnabl H. Characterization and molecular analysis of transgenic plants obtained by micropore protoplast fusion in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 101: 1250 ~ 1258
- 20 Keskitalo M, Angers P, Earle E, Pehu E. Chemical and genetic characterization of calli derived from somatic hybridization between tansy (*Tanacetum vulgare* L.) and pyrethrum [*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir) Schultz Bip.]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98: 1335 ~ 1343
- 21 Lee C H, Paek K Y, Hwang J K. Somatic hybridization between *Dendranthema grandiflorum* and *Salpiglossis sinuata* via protoplast fusion. *Korean Journal of Breeding (Korea Republic)*, 1995, 27 (3): 290 ~ 297
- 22 Matsumoto E. Interspecific somatic hybridization between lettuce (*Lactuca sativa*) and wild species *L. virosa*. *Plant Cell Reports*, 1991, 9:

531 ~ 534

- 23 Al-Atabey J S, Mulligan B J, Power J B. Interspecific somatic hybrids of *Rudbeckia hirta* and *R. laciniata* (Compositae). *Plant Cell Reports*, 1990, 8: 517 ~ 520
- 24 Wang G R, Binding H. Somatic hybrids and cybrids of *Senecio fuchsii* Gmel (×) *jacobaea* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 87: 561 ~ 567
- 25 卜宗式, 白洁玲, 李曙光, 戴东旭, 迟红武, 孙巨龙, 安利佳, 张相歧, 王洪庆. 激光诱导金盏菊原生质体融合方法初探. *激光生物学*, 1993, 2 (2): 282 ~ 283
Bu Z S, Bai J L, Li S G, Dai D X, Chi H W, Sun J L, Ai L J, Zhang X Q, Wang H Q. A preliminary study on method for laser-induced fusion of protoplasts of *Calendula officinalis*. *Laser Biology*, 1993, 2 (2): 282 ~ 283 (in Chinese)
- 26 许智宏, 卫志明. 植物原生质体培养和遗传操作. 上海: 科学技术出版社, 1997. 1 ~ 78
Xu Z H, Wei Z M. *Plant protoplast culture and transformation*. Shanghai: Scientific and Technical Press, 1997. 1 ~ 78 (in Chinese)
- 27 Rambaud C, Dubois J, Vasseur J. The induction of tetraploidy in chicory (*Cichorium intybus* L. var *Magdebourg*) by protoplast fusion. *Euphytica*, 1992, 62: 63 ~ 67
- 28 LoSchiavo F, Giovinozzo G, Terzi M. 8-Azaguanine resistance carrot cell mutants and their use as universal hybridizers. *Mol Gen Genet*, 1983, 192: 326 ~ 329
- 29 Pental D, Hamill J D, Cocking E C. Somatic hybridization using a double mutant of *Nicotiana tabacum*. *Heredity*, 1984, 52: 79 ~ 83
- 30 Binsfeld P C, Wingender R, Schnabl H. Cytogenetic analysis of interspecific sunflower hybrids and molecular evaluation of their progeny. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102: 1280 ~ 1285
- 31 Rambaud C, Dubois J, Vasseur J. Male-sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 87: 347 ~ 352
- 32 Trabace T, Fiore M C, D'Ambrosio C, Vanadia S, Sunseri F. Sunflower cytoplasmic hybrids revealed by PCR assay using male sterility as selectable marker. *Journal of Genetics and Breeding*, 1996, 50: 29 ~ 34
- 33 von Keller A, Tewinkel M, Wingender R, Volamann D, Schnabl H. Intracellular movement and reorganization of electrically fused sunflower protoplasts. *International Journal of Plant Science*, 1995, 156: 764 ~ 773
- 34 Barth S, Voeste D, Schnabl H. Somatic hybrids of sunflower (*Helianthus annuus* L.) identified at the callus stage by isoenzyme analysis. *Botanica Acta*, 1993, 106: 100 ~ 102
- 35 Biedinger U, Schnabl H. Ethane production as an indicator of the regeneration potential of electrically fused sunflower protoplasts (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Plant Physiology*, 1991, 138: 417 ~ 420
- 36 Schnabl H, Mahaworasilpa T L, Coster H G L, von Keller A. Production of hybrid cells from single protoplasts of sunflower hypocotyls and broad bean guard cells by electrical fusion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 55: 59 ~ 62
- 37 Pillai V, Davey M R, Power J B. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Centaurea cyanus*, *Senecio × hybridus* and *Callistephus chinensis*. *Plant Cell Reports*, 1990, 9: 402 ~ 405
- 38 Yasua F, Kyoko S. Callus formation from mesophyll protoplasts of pyrethrum (*Chrysanthemum coccineum*). *Plant Tissue Culture Letters*, 1990, 7 (2): 111 ~ 113
- 39 Webb C L, Davey M R, Lucas J A, Power J B. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Lactuca perennis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1994, 38: 77 ~ 79
- 40 Malaure R S, Davey M R, Power J B. Isolation and culture of protoplasts of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. *Pyrethrum Post*, 1989, 17 (3): 90 ~ 94
- 41 Sauvadet M A, Brochard P, Boccon-Gibod J. A protoplast-to-plant system in chrysanthemum: differential responses among several commercial clones. *Plant Cell Reports*, 1990, 8: 692 ~ 695
- 42 Motonobu E D, Nobuyuki F J. Improvement of plating efficiency on the mesophyll protoplast culture of chrysanthemum, *Dendranthema × grandiflora* Kitam. *Plant Biotechnology*, 1997, 14 (1): 81 ~ 83
- 43 Zhou J, Wang B C, Zhu L Q. Conditioned culture for protoplasts isolated from chrysanthemum: an efficient approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 45: 113 ~ 119
- 44 Xu A Q, Jia J F. Callus formation from protoplasts of *Aster spheerocephala* Krasch and some factors influencing protoplast division. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1996, 44: 129 ~ 134