

# 植物原生质体融合培养技术及其应用

孙慧慧<sup>1,2</sup>, 王力军<sup>2</sup>, 闫晓红<sup>2</sup>, 叶永忠<sup>1\*</sup>, 魏文辉<sup>2\*</sup>

(1. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002; 2. 中国农业科学院油料作物研究所, 湖北 武汉 430062)

**摘要:** 综述了原生质体融合培养技术在芸薹属植物新品种培育或品种改良、新物种创造等方面取得的进展及成就, 指出目前存在的问题, 展望了今后的研究方向。

**关键词:** 芸薹属; 原生质体培养; 原生质体融合; 应用

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2010)07-0118-05

最初采用机械法制备原生质体, 但原生质体质量差、产量低, 后来酶解法逐渐取代该法。在原生质体培养方面, Nagata 等<sup>[1]</sup>首次通过烟草原生质体培养得到可育再生植株, 至此植物原生质体培养研究广泛兴起。继 Carlson 等<sup>[2]</sup>报道首例粉蓝烟草与郎氏烟草种间体细胞杂种植株的再生后, Melchers 等<sup>[3]</sup>得到了番茄与马铃薯属间体细胞杂种, 随后 Kisaka 等<sup>[4]</sup>将番茄叶肉细胞原生质体与胡萝卜悬浮培养细胞原生质体经电融合获得科间杂种。目前, 至少有 400 多种植物通过原生质体培养得到再生植株, 并已获得多种植物的种间、属间甚至科间原生质体融合的再生植株<sup>[5]</sup>。

原生质体融合技术建立在原生质体培养的基础上, 主要包括原生质体的分离、原生质体融合诱导、融合产物的培养、杂种的筛选鉴定等技术环节。

## 1 植物原生质体培养技术

近年来芸薹属植物原生质体培养技术已取得较大进展<sup>[6-17]</sup>。其 3 个基本种(白菜、甘蓝、黑芥)和 3 个复合种(甘蓝型油菜、芥菜型油菜、埃塞俄比亚芥)原生质体均成功获得了再生植株。

### 1.1 原生质体的分离与培养

影响原生质体植株再生的因素有很多, 包括外植体生理状态、培养基组成、植物激素或生长调节因子、植物基因型等<sup>[16]</sup>。以下着重从分离原生质体的材料、基因型和培养条件 3 个方面分析其对原生

体离体培养的影响。

1.1.1 分离原生质体的材料 选择适宜的材料是分离原生质体成功的关键, 继 Kartha 于 1974 年以油菜实生苗叶片原生质体培养获得再生植株后, 许多学者以无菌苗下胚轴<sup>[7, 17]</sup>、子叶<sup>[8, 10-12]</sup>、真叶<sup>[13-15]</sup>等作为供体组织游离和培养原生质体均获得再生植株。此外茎皮层<sup>[18]</sup>、微胚<sup>[19]</sup>、叶柄<sup>[20]</sup>、根<sup>[21]</sup>及悬浮细胞<sup>[22]</sup>也是制备原生质体的材料来源。

原生质体产量和活力受许多因素影响。其中苗龄较关键, 草木樨状黄芪(*Astragalus melilotoides*)幼嫩叶片原生质体活力超过 70%, 产量较高<sup>[23]</sup>。在芸薹属中, 苗龄 3~5 d 的赤甘蓝(*Brassica oleracea*)下胚轴原生质体产量较苗龄 7 d 的高(每株苗大约  $1.8 \times 10^4$  个), 且分裂频率高<sup>[17]</sup>。然而也有报道认为, 材料部位对原生质体产量影响较大, 茎用芥菜(*Brassica juncea* Coss. var. *tumida* Tsen et Lee)每株苗下胚轴仅得原生质体约  $8.44 \times 10^2$  个<sup>[16]</sup>, 埃塞俄比亚芥(*Brassica carinata*)下胚轴原生质体产量不如子叶高<sup>[8]</sup>。酶解之前对材料预处理有利于原生质体的分离<sup>[10, 11, 16, 17, 24]</sup>。此外有报道认为, 黄化苗子叶原生质体比绿苗子叶原生质体再生能力高。Zhao 等<sup>[11, 12]</sup>研究的 12 个品种黄化苗子叶原生质体都得到了愈伤组织, 而绿苗子叶原生质体仅有 6 个品种得到愈伤组织。

1.1.2 基因型 芸薹属植物原生质体细胞壁再生、细胞分裂、植株再生能力受基因型控制<sup>[11-13]</sup>。Zhao

收稿日期: 2010-03-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671312); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金

作者简介: 孙慧慧(1983-), 女, 河南商丘人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物原生质体融合。

\*通讯作者: 叶永忠(1957-), 男, 湖北黄梅人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物生理、生态学研究。

魏文辉(1971-), 男, 湖北红安人, 副研究员, 主要从事植物遗传学、基因组学和分子生物学研究。

等<sup>[12]</sup>指出,芸薹属双二倍体甘蓝型油菜(基因组AACC)子叶再生能力最高,二倍体白菜型油菜(基因组AA)次之,二倍体甘蓝(基因组CC)最差。而Murata等<sup>[25]</sup>认为,甘蓝和甘蓝型油菜再生频率高,白菜型油菜再生能力差,认为控制芸薹属原生质体再生的基因在C基因组上。此外同一基因型的不同品种再生能力也不相同,白菜型油菜(Wonk Bok)原生质体分裂频率很高,最终仅得到愈伤组织而未分化出再生植株<sup>[12]</sup>。因此,基因型的选择对能否得到再生植株非常重要。

1.1.3 培养条件 每个原生质体都有发育成1株或几株完整植株的可能,但仅有一部分能分裂,除植物种类、基因型影响外,还受限于培养基成分和培养条件。

培养原生质体的方法主要有液体浅层培养法、固体培养法、固液结合培养法、琼脂糖包埋培养法、看护培养法等。液体培养法是最容易建立的方法<sup>[5, 23, 26]</sup>。固体培养法最初是将原生质体包埋于琼脂里培养,此方法后来被琼脂糖包埋培养法取代。琼脂糖凝固温度更低,在保持原生质体活力方面效果更好<sup>[8, 16]</sup>。固液结合培养是先将原生质体悬浮于液体培养基里,再把液体培养基滴于硝酸纤维素尼龙膜<sup>[13]</sup>或滤纸上培养,膜或滤纸下面为固体培养基,或直接将悬浮原生质体的液体培养基加在固体培养基上培养。与其他培养法相比,看护培养法是提高某些难再生植物原生质体植板率,获得再生植株的有效方法<sup>[17]</sup>。通常看护培养法里包含液体培养环节,因此液体培养易于发生褐化的植物不宜用<sup>[27]</sup>。看护细胞可以是同种的原生质体,如百合原生质体培养<sup>[28]</sup>,也可以来自不同种的原生质体,如Matsumoto等<sup>[29]</sup>以水稻原生质体作为香蕉原生质体的看护细胞。芸薹属植物赤甘蓝下胚轴原生质体在不同水平BA、NAA、2,4-D的MS培养基上因褐化而不能持续分裂,然而当用茎用芥菜原生质体来看护培养时便能够分裂并形成愈伤组织<sup>[17]</sup>。茎用芥菜和赤甘蓝的体细胞杂种植株也通过看护培养法得到<sup>[30]</sup>。

培养基种类对细胞分裂有重要影响,不合适的培养基抑制原生质体的分裂<sup>[31]</sup>。用于原生质体再生的培养基大多是从MS和B5这2种最基本的培养基上发展而来的。经常使用的有KM8p<sup>[8, 26]</sup>、NT<sup>[11, 12]</sup>、改良MS<sup>[16, 17, 30]</sup>等。另外,Pelletier等设计的培养基广泛应用于芸薹属植物<sup>[6, 9, 13-15, 32]</sup>。

适宜的培养密度对原生质体培养至关重要,密度过低原生质体不能分裂,过高则又导致集聚、褐化。不同植物原生质体对培养密度要求不同,一般 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL<sup>[5]</sup>。芸薹属一般在 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个/mL条件下培养,而拟南芥在 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 个/mL的低密度下即可进行持续分裂,并能发育成细胞团<sup>[24]</sup>。

原生质体培养初期往往要求黑暗或弱光条件<sup>[6, 9, 17, 23, 30, 32, 33]</sup>,当完整的细胞壁形成以后,细胞具有了耐光的特性,才可以转移到光下。而拟南芥原生质体,黑暗或光照条件对分裂频率及植板率的影响都不大<sup>[24]</sup>。

## 1.2 原生质体融合

原生质体融合(protoplast fusion)即体细胞杂交(somatic hybridization),它是指双亲(可以是种间、属间,甚至科间物种)的原生质体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,并分化出再生植株<sup>[34]</sup>。

早期原生质体融合方法有:硝酸钠法、高Ca<sup>2+</sup>高pH法、聚乙二醇法(polyethylene glycol, PEG)、PEG与高Ca<sup>2+</sup>高pH相结合法、电融合法以及聚集微束激光法。目前,国内外实验室广泛使用的是化学法中的PEG-高Ca<sup>2+</sup>高pH法和物理法中的电融合法。

1.2.1 PEG-高Ca<sup>2+</sup>高pH法 1974年Kao<sup>[35]</sup>建立了聚乙二醇(PEG)法,经过不断改进建立起来的PEG-高Ca<sup>2+</sup>高pH法,至今应用广泛。原生质体融合的报道多采用了该方法<sup>[6, 30, 32, 36]</sup>,但融合频率不高仍是这项技术的弱点。Kiriti等<sup>[36]</sup>报道的融合频率为5%,Chen等<sup>[30]</sup>报道的融合频率约4.5%。细胞融合要求新鲜的原生质体,Zhao等<sup>[1]</sup>发现,在2—4h内已有部分细胞生出了新的细胞壁。近年来一些研究者发现,加入二甲基亚砜(DMSO)可以有效地提高融合频率。孙蒙祥等<sup>[37]</sup>报道,用PEG诱导选定的成对原生质体融合,从而使PEG融合技术更精确化,由此可能省去杂种细胞筛选步骤。

1.2.2 电融合法 1979年Senda建立的电融合法,是目前最流行的融合方法<sup>[38]</sup>。其原理是利用原生质体在交变电场作用下相互接触并排列成串后,施加一次或几次高压直流电脉冲,使相互接触的原生质体质膜发生局部可逆击穿,形成融合体。该方法避免了化学药剂的毒害作用,操作简便,快速,融

合同步性好,可在显微镜下观察融合的全过程,整个过程中的参数容易控制。Schweiger 等<sup>[39]</sup> 将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,其方法是将 2 个异源原生质体置于微滴融合液中,在倒置显微镜下用直径为  $50\mu\text{m}$  的白金电极进行融合操作,然后将融合的异核体移到微滴培养液中培养再生杂种植株。这是近年来融合技术上取得的最突出的成就,有可能解决融合细胞的选择问题。

### 1.3 杂种的筛选

原生质体融合后筛选杂种细胞是原生质体融合技术的基本步骤<sup>[30]</sup>。利用或创造各种缺陷型或抗性互补细胞系(细胞系互补包括叶绿素缺失互补、营养缺陷互补、抗性互补及代谢互补等),用选择培养基将互补的杂种细胞选择出来<sup>[30]</sup>。由杂种细胞获得再生植株后,必须作进一步分析和鉴定,以判定杂种的真实性,其中表型鉴定、细胞学鉴定、同工酶鉴定及分子生物学鉴定均是常用的方法。染色体数目和形态具有种特异性,是鉴定杂种的细胞学主要证据。基因组原位杂交(GISH)是分子细胞学鉴定杂种的主要方法。同工酶分析是最基本的生化分析方法,杂种的同工酶谱往往是双亲酶谱的总和,同时表现双亲特有的酶谱,也可能出现双亲没有的新酶带。近年来,分子生物学鉴定已成为强有力手段,常用的方法有:限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性(random amplified polymorphic DNA, RAPD)<sup>[30, 32]</sup>、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)等。

## 2 原生质体融合在生产上的应用

植物原生质体是遗传转化的理想受体,原生质体能够捕获外源基因、细胞器、染色体及 DNA 片段,常被用于基因转化、新品种培育或品种改良、新物种的创造等领域。原生质体融合避开了有性杂交过程中的不亲和障碍,在获得种间、属间甚至科间杂种方面均发挥着重要作用。

原生质体融合涉及了双亲的细胞质,它不仅可以把细胞质基因转移到全新的核背景中,也可使叶绿体基因组或线粒体基因组间重新组合。采用原生质体融合能够实现胞质基因控制的有益性状的转移,如雄性不育<sup>[6, 33, 40]</sup>、除草剂抗性<sup>[41, 42]</sup>、抗冻性<sup>[33]</sup>

等。而不育胞质的获得是培育杂种的重要途径<sup>[6, 33, 40]</sup>。

在十字花科植物中已开展了大量原生质体融合的研究工作<sup>[6, 33, 40-42]</sup>,特别是在芸薹属植物原生质体融合形成异源四倍体<sup>[43]</sup>、创造新型胞质或核质组合<sup>[44]</sup>、转移人们感兴趣的远缘物种染色体片段或基因<sup>[45-47]</sup>等方面取得了巨大成绩。迄今为止,已在拟南芥与甘蓝型油菜、白菜与甘蓝、甘蓝型油菜与萝卜、黑芥、芥菜、白芥、芥菜与刺油菜(*Brassica spinescens*,  $2n=8$ ),以及甘蓝型油菜之间通过原生质体融合获得了再生植株,为油菜育种提供了许多珍贵的种质资源。

## 3 结论

体细胞杂交技术在植物育种中已显示出广阔的应用前景。这种技术作为常规育种的重要辅助手段,为创造新物种提供了新的途径。与发达国家比,中国在油菜原生质体融合方面研究较少,但在体细胞杂交创建甘蓝型油菜异质性雄性不育系方面已见成效<sup>[48]</sup>,如含新疆野芥细胞质的 Nsa 甘蓝型油菜,及含诸葛菜细胞质的 Orych 甘蓝型油菜,均是细胞质雄性不育系,均是中国拥有自主知识产权的第一批油菜异质性雄性不育系,经过改良,有望在中国油菜杂交种生产上发挥重大作用。

原生质体再生体系难以建立,仍是制约这项技术应用的瓶颈。比如兰科很多重要花卉植物的原生质体再生体系,至今仍是国内外研究的空白。此外,原生质体融合,植株再生频率低以及体细胞杂种育性低等问题,也严重制约着这一技术在育种中的应用。通过原生质体遗传转化途径改良作物品质、抗逆性、产量等性状,通过体细胞融合高效获得可育杂种将是今后工作的重要方向。

## 参考文献:

- [1] Nagata T, Takebe I. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium[J]. *Planta*, 1971, 99 (1): 12-20.
- [2] Carlson P S, Smith H H, Dearing R D. Parasexual interspecific plant hybridization[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 1972, 69: 2292-2294.
- [3] Melchers G, Sacristain M D, Holder A A. Somatic hybrid plants of potato and tomato regeneration from fused protoplasts[J]. *Carlsberg Research Communications*, 1978, 43: 203-206.

- [ 4] Kisaka H, Kameya T. Production of somatic hybrids between *Daucus carota* L. and *Nicotiana tabacum*[ J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 88: 75-80.
- [ 5] Davey M R, Anthony P, Power J B, et al. Plant protoplast technology: Current status[ J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2005, 27(1): 117-129.
- [ 6] Pelletier G, Primard C, Vedel F, et al. Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion[ J]. Molecular and General Genetics 1983, 191: 244-250.
- [ 7] Kao H M, Keller W A, Gleddie S, et al. Efficient plant regeneration from hypocotyl protoplasts of broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *italica* Plenck)[ J]. Plant Cell Reports, 1990, 9: 311-315.
- [ 8] Jaiswal S K, Hammatt N, Bhojwani S S, et al. Plant regeneration from cotyledon protoplasts of *Brassica carinata*[ J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990, 22: 159-165.
- [ 9] Walters T M, Earle E D. A simple, versatile feeder layer system for *Brassica oleracea* protoplast culture[ J]. Plant Cell Reports, 1990, 9: 316-319.
- [ 10] Zhao K N, Whitecross M I, Bittslich D J. Studies on plant regeneration from cotyledonary protoplasts in *Brassica campestris*[ J]. Plant Cell Reports 1994, 13: 164-170.
- [ 11] Zhao K N, Bittslich D J, Halloran G M, et al. Studies of cotyledon protoplast cultures from *Brassica napus*, *B. campestris* and *B. oleracea*. I : Cell wall regeneration and cell division[ J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 40: 59-72.
- [ 12] Zhao K N, Bittslich D J, Halloran G M, et al. Studies of cotyledon protoplast cultures from *B. napus*, *B. campestris* and *B. oleracea*. II: Callus formation and plant regeneration[ J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 40: 73-84.
- [ 13] Hu Q, Andersen S B, Hansen L N. Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species[ J]. Plant Cell, Tissue and Culture, 1999, 59: 189-196.
- [ 14] Hu Q, Andersen S B, Hansen L N. Plant regeneration from mesophyll protoplasts in *Isatis indigotica*[ J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 55: 155-157.
- [ 15] Hansen L N, Earle E D. Regeneration of plants from protoplasts of rapid cycling *Brassica oleracea* L.[ J]. Plant Cell Reports, 1994, 13: 335-339.
- [ 16] 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.
- [ 17] Chen L P, Zhang M F, Xiao Q B, et al. Plant regeneration from hypocotyl protoplasts of red cabbage (*Brassica oleracea*) by using nurse cultures[ J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 77: 133-138.
- [ 18] Klimaszewska K, Keller W A. Plant regeneration from stem cortex protoplasts of *Brassica napus*[ J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1987, 8: 225-233.
- [ 19] Swanson E B, Coumans M P, Brown G L, et al. The characterization of herbicide tolerant plants in *Brassica napus* L. after *in vitro* selection of microspores and protoplasts[ J]. Plant Cell Reports, 1988, 7: 83-87.
- [ 20] Bornman C H. Regeneration *in vitro* of economically important crop plants in the Nordic countries[ J]. Hereditas Supplement, 1985, 3: 7-13.
- [ 21] Xu Z H, Davey M R, Cocking E C. Plant regeneration from root protoplasts of *Brassica*[ J]. Plant Science Letters, 1982, 24: 117-121.
- [ 22] Simmonds D H, Long N E, Keller W A. High plating efficiency and plant regeneration frequency in low density protoplast cultures derived from an embryogenic *Brassica napus* cell suspension[ J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991, 27: 231-241.
- [ 23] Zhang G N, Jia J F, Hao J G, et al. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed *Astragalus melilotoides*[ J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(2): 373-376.
- [ 24] Dovzhenko A, Bosco C D, Meurer J, et al. Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in *Arabidopsis thaliana*[ J]. Protoplasma, 2003, 222: 107-111.
- [ 25] Murata M, Orton T J. Callus initiation and regeneration capacities in *Brassica* species[ J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1987, 11: 111-123.
- [ 26] Wang J, Sun Y, Yan S, et al. High frequency plant regeneration from protoplasts in cotton via somatic embryogenesis[ J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(4): 616-620.
- [ 27] Liu M C. A novel method of plant regeneration from suspension culture protoplast of sugarcane[ J]. Plant Physiology, 1994, 143: 753-755.
- [ 28] Horita M, Morohashi H, Komai F. Production of fertile somatic hybrid plants between Oriental hybrid lily and *Lilium × formolongi*[ J]. Planta, 2003, 217: 597-601.

- [ 29] Matsumoto K, Vilarinhos A D, Oka S. Somatic hybridisation by electrofusion of banana protoplasts[ J]. *Euphytica*, 2002, 125: 317-324.
- [ 30] Chen L P, Zhang M F, Li C S, et al. Production of interspecific somatic hybrids between tuber mustard (*Brassica juncea*) and red cabbage (*Brassica oleracea*)[ J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 80: 305-311.
- [ 31] Montagno T J, Jourdan P S, Berry S Z. Plant regeneration from leaf protoplasts of *Lycopersicon hirsutum* f. *hirsutum*[ J]. *Plant Cell Reports*, 1991, 9: 680-683.
- [ 32] Hu Q, Hansen L N, Laursen J, et al. Intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* containing traits of agronomic importance for oilseed rape breeding[ J]. *Theoretical Applied Genetics*, 2002, 105: 834-840.
- [ 33] Sigareva M A, Earle E D. Direct transfer of a cold-tolerant Ogura male-sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata*) via protoplast fusion [ J]. *Theoretical Applied Genetics* 1997, 94: 213-220.
- [ 34] 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
- [ 35] Kao K N, Michayluk M R. A method for higher-frequency intergeneric fusion of plant protoplast [ J]. *Planta*, 1974, 115: 355-367.
- [ 36] Kirti P B, Narasimhulu S B, Prakash S, et al. Somatic hybridization between *Brassica juncea* and *Moricandia arvensis* by protoplast fusion[ J]. *Plant Cell Reports*, 1992, 11: 318-321.
- [ 37] 孙蒙祥, 杨弘远, 周嬉しい. 用聚乙二醇诱导选定的成对原生质体间的融合[ J]. *植物学报*, 1991, 36(7): 489-493.
- [ 38] Senda M. Plant cell physisol[ J]. *Plant Cell Reports*, 1979, 20: 1441-1443.
- [ 39] Schweiger H G, Dirk J, Koop H U, et al. Individual selection, culture and manipulation of higher plant cells[ J]. *Theoretical Applied Genetics* 1987, 73: 769-783.
- [ 40] Motegi T, Nou I S, Zhou J, et al. Obtaining an Ogura-type CMS line from asymmetrical protoplast fusion between cabbage (fertile) and radish(fertile)[ J]. *Euphytica*, 2003 129: 319-323.
- [ 41] Beversdorf W D, Weiss-Lerman J, Erickson L R, et al. Transfer of cytoplasmically inherited triazine resistance from birds-rape to cultivated oil seed rape (*B. campestris* and *B. napus*)[ J]. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 1980, 22: 167-172.
- [ 42] Binding H, Jain S M, Finger J, et al. Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum* [ J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1982, 63: 273-277.
- [ 43] Health D W, Earle E D. Synthesis of high erucic acid rapeseed (*Brassica napus* L.) somatic hybrids with improved agronomic characters[ J]. *Theoretical and Applied Genetics* 1997, 91: 1129-1136.
- [ 44] Prakash S, Kirti P B, Bhat S R, et al. A *Moricandia arvensis*-based cytoplasmic male sterile and fertile restoration system in *Brassica juncea*[ J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97: 488-492.
- [ 45] Hansen L N, Earle E D. Somatic hybrids between *Brassica oleracea* L. and *Sinapis alba* L. with resistance to *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc.[ J]. *Theoretical and Applied Genetics* 1997, 94: 1078-1085.
- [ 46] Sigareva M A, Earle E D. Camalexin induction in intertribal somatic hybrids between *Camelina sativa* and rapid-cycling *Brassica oleracea*[ J]. *Theoretical and Applied Genetics* 1999, 98: 164-170.
- [ 47] Kirti P B, Baldev A, Gaikwad K, et al. Introgression of a gene restoring fertility to CMS (*Trachystoma*) *Brassica juncea* and genetics of restoration[ J]. *Plant Breeding*, 1997, 116: 259-262.
- [ 48] Hu Q, Li Y C, Mei D S, et al. Establishment and identification of cytoplasmic male sterile in *Brassica napus* by intergeneric somatic hybridization[ J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 2(12): 1321-1328.