

柑橘原生质体融合-电融合

Citrus Protoplast Electrofusion

刘丹[#], 肖诗鑫[#], 邓秀新^{*}, 郭文武^{*}

园艺植物生物学教育部重点实验室, 园艺林学学院, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: xxdeng@mail.hzau.edu.cn; guoww@mail.hzau.edu.cn

[#]共同第一作者

引用格式: 刘丹, 肖诗鑫, 邓秀新, 郭文武. (2018). 柑橘原生质体融合-电融合. *Bio-101* e1010186. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010186.

How to cite: Liu, D., Xiao, S. X., Deng, X. X. and Guo, W. W. (2018). Citrus protoplast electrofusion. *Bio-101* e1010186. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010186. (in Chinese)

实验原理: 细胞融合即细胞核来源于一个亲本, 线粒体基因组或叶绿体基因组来源于另一个亲本的融合方式。在柑橘中, 我们采用电融合。在交流电作用下, 双亲原生质体迅速平行排成多个串珠, 随后在直流电作用下, 部分小串珠开始解体又融合在一起, 形成新的圆球体。细胞融合能有效克服有性杂交不亲和以及远缘杂交障碍等困难, 突破生殖隔离。

关键词: 基因组, 电融合, 原生质体

材料与试剂

1. 滤纸
2. 玻璃器皿 (90 mm)
3. 双圈定性滤纸 (中速)
4. 生根管
5. 刀片
6. 专用细胞培养皿
7. 玻璃离心管
8. 长吸管
9. 0.22 μm 醋酸纤维微孔滤膜
10. 橡皮筋

11. 封口膜
12. 活性炭
13. 锡箔纸
14. 柑橘种子
15. 柑橘胚性愈伤
16. 75%酒精
17. 3% NaClO
18. NaOH
19. FDA
20. 纤维素酶 R-10 (Yakult Honsha)
21. 离析酶 R-10 (Yakult Honsha)
22. DMSO
23. Sucrose
24. 椰子汁 20 ml
25. 6-Benzylaminopurine (6-BA)
26. Kinetin (KT)
27. Naphthalene acetic acid (NAA)
28. Indole-3-acetic acid (IAA)
29. KOH
30. KH_2PO_4
31. KNO_3
32. MgSO_4
33. CuSO_4
34. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
35. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
36. 甘露醇
37. BH_3 营养液配制所需试剂:
 - 1) 麦芽提取物
 - 2) 蔗糖
 - 3) 谷氨酰胺
 - 4) 七水合硫酸镁

- 5) 磷酸二氢钾
- 6) 二水合氯化钙
- 7) 氯化钾
- 8) 水解酪蛋白
- 9) 碘化钾
- 10) 硼酸
- 11) 二水合钼酸钠
- 12) 五水合硫酸铜
- 13) 六水合氯化钴
- 14) 一水合硫酸锰
- 15) 乙二胺四乙酸
- 16) 七水合硫酸亚铁
- 17) 肌醇
- 18) 果糖
- 19) 核糖
- 20) 木糖
- 21) 甘露糖
- 22) 鼠李糖
- 23) 纤维二糖
- 24) 半乳糖
- 25) 丙酮酸钠盐
- 26) 柠檬酸
- 27) 苹果酸 Malic acid
- 28) 延胡索酸 Fumaric acid
- 29) 生物素
- 30) 核黄素
- 31) 叶酸
- 32) 对氨基苯甲酸
- 33) 氯化胆碱

- 34) 抗坏血酸
 - 35) 泛酸钙
 - 36) 维生素 B1
 - 37) 维生素 B6
 - 38) 烟酸
 - 39) 维生素 A
 - 40) 维生素 D3
 - 41) 维生素 B12
38. 培养基相关母液 (见溶液配方)
- 1) 肌醇储备液 (100x)
 - 2) 甘氨酸储备液 (100x)
 - 3) 微量储备液 (100x)
 - 4) Fe²⁺-EDTA 储备液 (100x)
 - 5) Vitamin 储备液 (100x)
 - 6) 大量储备液 (100x)
 - 7) 6-BA 储备液 (1 mg/ml)
 - 8) KT 储备液 (1 mg/ml)
 - 9) IAA 储备液 (1 mg/ml)
 - 10) NAA 储备液 (1 mg/ml)
39. 培养基的配制 (见溶液配方)
- 1) 胚状体诱导培养基
 - 2) 胚状体增殖培养基
 - 3) 固体培养基
 - 4) 悬浮培养基
 - 5) 播种培养基
 - 6) 生芽培养基
 - 7) 生根培养基
 - 8) 0.6 M EME 培养基
 - 9) 0.15 M EME 培养基

- 10) CPW13 (见溶液配方)
- 11) CPW25 (见溶液配方)
- 12) 电融合液 (见溶液配方)
- 13) BH₃ 液体培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. 酒精灯
2. 镊子
3. 三角瓶
4. 刀柄
5. 325 目不锈钢过滤网筛
6. 超净台
7. 摇床
8. 培养箱

实验步骤

1. 材料的准备

1.1 愈伤亲本的准备

胚性愈伤悬浮系建立：固体培养基上挑选继代20天左右生长旺盛，疏松，颗粒细小的胚性愈伤组织于液体悬浮培养基 (100 ml 三角瓶)，120 rpm 振荡培养，每两周继代一次，继代3代后，若悬浮愈伤状态良好，可用于原生质体分离。

1.2 叶肉亲本的准备

无菌苗的培养：柑橘果实完全成熟时进行采摘，之后进行单果包装，贮存在4 °C 冷库中备用。

使用时从柑橘果实中取出种子并将种子表面的果肉洗掉，将种子浸泡在1 mol/L NaOH 中10 min 去除表面果胶，之后用蒸馏水清洗3次，洗除 NaOH。然后剥除外种皮，用浓度为3% (w/v) 的 NaClO 浸泡消毒15 min 左右，用无菌水清洗至少3次，直至无菌水变无色，避免残留的 NaClO 对种子造成毒害作用。

用镊子将消毒好的种子置于垫有滤纸的玻璃皿上去除内种皮，并接种于 MT 播

种培养基上，封口置于光下培养。光照培养一段时间后，待叶片完全转绿、长势旺盛，充分展开后，可以用于原生质体的提取。

另外，除使用无菌苗提取原生质体以外，也可以采摘温室中的叶片。叶片采摘要选择嫩绿、成熟、无病虫害的叶片，采摘后先将叶片洗干净，然后在 2% (w/v) NaClO 中浸泡消毒 15 min 左右，然后在无菌环境中用无菌水清洗 6 次，以免残留的 NaClO 对叶片产生毒害作用。

2. 原生质体的分离

2.1 愈伤原生质体的分离：用长吸管吸取 1 g (继代 6-10 天) 的愈伤组织于 50 ml 的三角瓶中，吸干悬浮培养基，先加入 1.5 ml 0.6 EME，后加入等体积的酶液，封口后置于 28 °C、40 r/min 恒温摇床遮光酶解 15 h。

2.2 叶肉原生质体的分离：先加入 1.5 ml 0.6 EME 于 50 ml 的三角瓶中，之后用解剖刀将叶片切成 0.1 cm 的细条，及时放入预先加好的 1.5 ml 0.6 EME 中，避免叶片失水，后加入等体积的酶液，封口后置于 28 °C、40 r/min 恒温摇床遮光酶解 16 h。

3. 原生质体的纯化

过夜酶解的原生质体经孔径为 45 μm 的不锈钢网筛去除未完全酶解的残渣，将滤液转移至无菌的 10 ml 玻璃离心管中，100 x g 离心 6 min，使原生质体沉于管底，去除上清液。之后向管内加入 3 ml 的 CPW 13 并用长吸管轻轻地吸打混匀，然后将液体吸出并缓慢加到事先加有 6 ml CPW 26 的 10 ml 离心管中，这一步骤动作一定要缓慢轻柔，避免产生太大冲击力，使 CPW 13 混合液悬浮于 CPW 26 液体上方，然后 80 x g 离心 3 min 进行界面梯度离心。完整的原生质体在 CPW 13 和 CPW 26 的分界面处出现一个清晰的环形带，其它杂质及少量原生质体沉于管底。

注：如果此种情况下无法形成界面，则原生质体沉淀物用 CPW13 悬浮，用长吸管将其吸出置于另一个无菌的 10 ml 离心管中 (将长吸管垂直插入离心管中吸取原生质体，勿倾斜)，加入适量电融合液至 6 ml 并吸打混匀，100 x g 离心 6 min。去除上清液，加入适量的电融合液吸打混匀，在倒置显微镜下用血细胞计数板统计原生质体数目，然后用电融合液调整愈伤和叶肉原生质体的密度。一般来说，愈伤原生质体密度为 1×10^6 个/ml，叶肉原生质体密度 2×10^6 个/ml。

4. 原生质体活性检查：利用 FDA (二乙酸荧光素) 进行柑橘原生质体活力检测

- 4.1 首先用电融合液重悬原生质体，吸取200 μl 的原生质体悬浮液，置于事先包裹锡箔纸的1.5 ml 离心管中，加入4.8 μl 的5 mg/ml FDA，避光染色10 min。染色结束后吸出50 μl 于载玻片上，在倒置荧光显微镜 (Olympus IX 71) 下观察。
 - 4.2 从显微镜中可以看出：有活力的原生质体会发出绿色的荧光，统计绿色原生质体的数量。同一个视野中散发绿色荧光的原生质体数量与明场下完整原生质体的总量的比值即为原生质体活性。当比值大于80%时，则可用于融合等后续实验。
5. 原生质体融合-电融合法
 - 5.1 将双亲原生质体用电融合液重悬，混合均匀 (胚性愈伤组织原生质体 1×10^6 个/ml；叶肉原生质体 2×10^6 个/ml)。
 - 5.2 融合小池先用电融合液洗涤，以防原生质体聚集于电极两侧的角落里，然后取0.8 ml (FTC-03) 或1.6 ml (FTC-04) 原生质体混合液于环形融合小槽，融合小池中央加2滴电融合液用来保持湿度，封口膜封口。
 - 5.3 将融合小池置于倒置显微镜载物台，插线静置。在倒置显微镜下观察，当大多数原生质体处于同一水平面时开始进行电融合 (此过程一般需要5-10 min)。
 - 5.4 电击结束后，静置15-20 min，等待融合的原生质体圆球化。
 - 5.5 轻轻吸出融合产物于无菌的10 ml 离心管，80 x g 离心8 min，去上清液，培养密度为 1×10^5 个/ml，常采用 BH_3 液体浅层培养。
 6. 融合细胞培养

将融合细胞采用 BH_3 液体浅层培养，随着原生质体的生长发育，期间不断降低渗透压。待细胞团变成淡黄色时，转移至胚状体诱导培养基中，进一步增殖，之后诱导其生芽生根。

结果与分析

融合细胞圆球化后，采用 BH_3 液体浅层培养融合细胞。培养15 d 后，培养皿中出现了肉眼可见的白色的的小颗粒，此时降低渗透压至0.45 M。培养25 d 后，培养皿中出现较大细胞团，此时降低渗透压至0.3 M。培养至35 d 后时，培养皿中出现致密的淡黄色小颗粒，将其转移至胚状体诱导培养基中，固液共培，弱光下继续培养，待胚状体长出转移至

胚状体增殖培养基，胚状体迅速壮大、转绿。随后将长势良好的胚状体转移至生芽培养基继续培养，当再生芽长至有3-4片叶时，将其从胚状体上切下并转至生根培养基诱导生根。再生完整根系后，挑选根系健壮、生长势好的再生苗炼苗2周，最后移栽到温室。

注意事项

1. 融合亲本状态最佳：悬浮细胞继代一周后状态最好，叶肉则在叶片充分成熟、展开，叶色浓绿时状态最好。
2. 提取原生质体过程中，动作一定要轻缓，慢速。
3. 原生质体融合过程中，叶片密度:愈伤密度 = 2:1。

溶液配方

一、培养基相关母液

1. 6-BA 储备液 (1 mg/ml)

6-BA 100 mg 加入1.0 ml 1 M KOH 搅拌至6-BA 完全溶解，然后加蒸馏水定容到100 ml，4 °C 保存

2. KT 储备液 (1 mg/ml)

KT 100 mg 加入1.0 ml 1 M KOH 搅拌至 KT 完全溶解，然后加蒸馏水定容到100 ml，4 °C 保存

3. IAA 储备液 (1 mg/ml)

IAA 100 mg 加入1.0 ml 1 M KOH 搅拌至 IAA 完全溶解，然后用蒸馏水定容至100 ml，4 °C 避光保存

4. NAA 储备液 (1 mg/ml)

NAA 100 mg 加入1.0 ml 1 M KOH 搅拌至 NAA 完全溶解，然后用蒸馏水定容到100 ml，4 °C 避光保存

5. 5 mg/ml FDA 储备液

FDA 5 mg 溶解于1 ml DMSO 中，用1.5 ml 离心管装，-20 °C 避光保存

6. 1 M KOH 储备液

KOH 5.6 g 用100 ml 蒸馏水溶解，室温保存

注：溶液配方7-12 详见柑橘组织培养常用培养基配制方法 (杨雯惠等, 2018)

7. 大量储备液
8. 微量储备液
9. 铁盐储备液
10. 肌醇储备液
11. 甘氨酸储备液
12. 维生素储备液
13. CPW 盐储备液

CPW stock I 母液

KH ₂ PO ₄	0.272 g
KNO ₃	1.0 g
MgSO ₄	2.5 g
KI	0.002 g
CuSO ₄	0.00003 g

加蒸馏水定容至水，定容至100 ml，-20 °C 避光保存

注:

- 1) 配 CPW stock I 时，由于100 ml 只需加 KI 0.002 g，故先称取0.2 g 溶于1 ml 蒸 馏水中，配成100x 母液，使用时取10 μl。
- 2) 配 CPW stock I 时，由于100 ml 只需加 CuSO₄ 0.00003 g，故先称取0.006 g CuSO₄ 溶于2 ml，配成100x 母液，使用时取10 μl。

CPW stock II 母液：CaCl₂ 1.5 g 溶解于蒸馏水，定容至100 ml，-20 °C 避光保存

14. 酶母液储备液

CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.6 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.14 g

溶解于蒸馏水，定容至100 ml，-20 °C 避光保存

15. CaCl₂储备液 (100x)

CaCl₂ 0.2775 g 溶解于蒸馏水，定容至100 ml，4 °C 避光保存

二、培养基的配制

1. MT 固体培养基、悬浮培养基、播种培养基详见柑橘组织培养常用培养基配制方法。

2. 0.6 mol/L EME 培养基 (200 ml)

肌醇储备液 (100x)	2 ml
甘氨酸储备液 (100x)	2 ml
微量储备液 (100x)	2 ml
Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100x)	2 ml
Vitamin B 储备液 (100x)	2 ml
Vitamin C 储备液 (100x)	2 ml
大量储备液 (100x)	20 ml
Sucrose	41.04 g
Malt Extract	0.1 g

加蒸馏水定容至200 ml, 调 pH 至5.8, 高压灭菌

3. 0.15 M EME 培养基 (200 ml)

肌醇储备液 (100x)	2 ml
甘氨酸储备液 (100x)	2 ml
微量储备液 (100x)	2 ml
Fe ²⁺ -EDTA 储备液 (100x)	2 ml
Vitamin B 储备液 (100x)	2 ml
Vitamin C 储备液 (100x)	2 ml
大量储备液 (100x)	20 ml
Sucrose	10.26 g
Malt Extract	0.1 g

加蒸馏水定容至200 ml, 调 pH 至5.8, 高压灭菌

4. 胚状体诱导培养基

肌醇储备液 (100x)	10 ml
甘氨酸储备液 (100x)	10 ml
微量储备液 (100x)	10 ml

Fe ²⁺ -EDTA 储备液 (100x)	10 ml
Vitamin B 储备液 (100x)	10 ml
Vitamin C 储备液 (100x)	10 ml
大量储备液 (100x)	100 ml
Sucrose	50 g
Malt Extract	0.5 g

加蒸馏水定容至1,000 ml, 调 pH 至5.8, 高压灭菌

5. 胚状体增殖培养基

肌醇储备液 (100x)	10 ml
甘氨酸储备液 (100x)	10 ml
微量储备液 (100x)	10 ml
Fe ²⁺ -EDTA 储备液 (100x)	10 ml
Vitamin B 储备液 (100x)	10 ml
Vitamin C 储备液 (100x)	10 ml
大量储备液 (100x)	100 ml
Sucrose	50 g
Malt Extract	1.5 g

加蒸馏水定容至1,000 ml, 调 pH 至5.8, 高压灭菌

6. CPW13 (100 ml)

CPW stock I	1 ml
CPW stock II	1 ml
甘露醇	13 g

加蒸馏水定容至100 ml, 调 pH 至5.8, 高压灭菌

7. CPW25 (100 ml)

CPW stock I	1 ml
CPW stock II	1 ml
蔗糖	25 g

加蒸馏水定容至100 ml, 调 pH 至5.8, 高压灭菌

8. 酶1 (愈伤组织) (40 ml)

纤维素酶 R-10	0.48 g
-----------	--------

离析酶 R-10 0.48 g

甘露醇 5.1 g

酵母液 4 ml

加蒸馏水定容至40 ml, 调 pH 至5.8, 通过0.22 μ m 醋酸纤维微孔滤膜过滤灭菌

9. 酶2 (试管苗叶片) (40 ml)

纤维素酶 R-10 0.6 g

离析酶 R-10 0.6 g

甘露醇 5.1 g

酵母液 4 ml

加蒸馏水定容至40 ml, 调 pH 至5.8, 通过0.22 μ m 醋酸纤维微孔滤膜过滤灭菌

10. 电融合液 (100 ml)

甘露醇 12.75 g

CaCl₂ (100x) 母液 1 ml

加蒸馏水定容至100 ml, 调 pH 至 5.8, 高压灭菌

11. 生芽培养基

肌醇储备液 (100x) 10 ml

甘氨酸储备液 (100x) 10 ml

微量储备液 (100x) 10 ml

Fe²⁺-EDTA 储备液 (100x) 10 ml

Vitamin B 储备液 (100x) 10 ml

Vitamin C 储备液 (100x) 10 ml

大量储备液 (100x) 100 ml

1 mg/ml 6-BA 500 μ l

1 mg/ml KT 500 μ l

1 mg/ml NAA 100 μ l

Source 40 g

Agar 8 g

加蒸馏水定容至1,000 ml, 调 pH 至5.8, 高压灭菌

12. 生根培养基

肌醇储备液 (100x)	10 ml
甘氨酸储备液 (100x)	10 ml
微量储备液 (100x)	10 ml
Fe ²⁺ -EDTA 储备液 (100x)	10 ml
Vitamin B 储备液 (100x)	10 ml
Vitamin C 储备液 (100x)	10 ml
大量储备液 (100x)	50 ml
1 mg/ml IBA	100 μl
1 mg/ml NAA	500 μl
Source	25 g
Agar	8 g
活性炭	0.5 g

加蒸馏水定容至1,000 ml, 调 pH 至5.8, 高压灭菌

13. BH₃营养液配方

中文名	英文名	分子式	浓度 (mg/L)
Chinese Name	English Name	molecular formula	Concentration (mg/L)
麦芽提取物	Malt extract		500
蔗糖	Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	51350
甘露醇	Mannitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	81900
谷氨酰胺	Glutamine	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	3100
	magnesium sulfate		
七水合硫酸镁	heptahydrate	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
	Potassium Phosphate		
磷酸二氢钾	Monobasic	KH ₂ PO ₄	170
二水合氯化钙	Calcium chloride dihydrate	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
氯化钾	Potassium chloride	KCl	1500
水解酪蛋白	Casein hydrolysate		250
碘化钾	Potassium iodide	KI	0.83
硼酸	Orthoboric acid	H ₃ BO ₃	6.2
七水合硫酸锌	Zinc sulfate heptahydrate	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
二水合钼酸钠	Sodium MolybdatDihydrat	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25

	Copper (II) sulfate		
五水合硫酸铜	pentahydrate	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
六水合氯化钴	cobalt chloride	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
一水合硫酸锰	Manganese sulphate	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.3
	Ethylenediaminetetraacetic		
乙二醇四乙酸	acid	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	37.3
七水合硫酸亚铁	ferrous sulfate	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
肌醇	Myo-inositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	100
果糖	Fructose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	250
核糖	Ribose	$\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_4\text{CHO}$	250
木糖	Xylose	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	250
甘露糖	Mannose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	250
鼠李糖	Rhamnose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$	250
纤维二糖	Cellobiose	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	250
半乳糖	Galactose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	250
丙酮酸钠盐	Sodium pyruvate	$\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$	20
柠檬酸	Citric acid	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	40
苹果酸	Malic acid	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$	40
延胡索酸	Fumaric acid	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$	40
生物素	Biotin	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	0.01
核黄素	Riboflavin	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$	0.2
叶酸	Folic acid	$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$	0.4
对氨基苯甲酸	p-aminobenzoic acid	$\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2$	0.02
氯化胆碱	Choline chloride	$\text{C}_5\text{H}_{14}\text{CNO}$	1
抗坏血酸	VC(Ascorbic acid)	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	2
泛酸钙	Calcium pantothenate	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{CaN}_2\text{O}_{10}$	1
维生素 B1	vitamin B1	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{OS}$	10
维生素 B6	vitamin B6	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_5\text{P}$	10
烟酸	vitamin B3	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	1
维生素 A	vitamin A	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$	0.01
维生素 D3	vitamin D3	$\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$	0.01
维生素 B12	vitamin B12	$\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{NCoN}_{14}\text{O}_{14}\text{P}$	0.02
椰子汁			20 ml

加蒸馏水定容至1,000 ml, 用 KOH 调 pH 至5.8, 通过0.22 μm 醋酸纤维微孔滤膜过滤
灭菌

参考文献

1. 郭文武. (1998). [柑橘细胞电融合及其再生植株遗传变异研究\[D\]](#). 武汉: 华中农业大学图书馆.
2. 肖诗鑫. (2014). 柑橘胞质杂种创制及原生质体再生过程的细胞学研究[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆.
3. 杨雯惠, 解凯东, 郭文武. (2018). [柑橘组织培养常用培养基配制方法](#). *Bio-101* e1010184. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010184.
4. Grosser, J. W., Gmitter, F. G., Louzada, E. S. and Chandler, J. L. (1992). [Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless citrus development](#). *HortScience* 27(10): 1125-1127.
5. Guo, W. W. and Deng, X. X. (1998). [Somatic hybrid plantlets regeneration between Citrus and its wild relative, *Murrayapaniculata* via protoplast electrofusion](#). *Plant Cell Rep* 18(3-4): 297-300.