

应用胚挽救技术获得三倍体柑橘植株

刘可慧^{1,2}, 于方明³, 张秋明⁴, 易干军^{1*}

(1. 广东省农业科学院 果树研究所, 广州 510640; 2. 桂林电子科技大学 应用科技学院, 广西 桂林 541004;
3. 广西师范大学 环境与资源学院, 广西 桂林 541004; 4. 湖南农业大学 园艺园林学院, 长沙 410128)

摘要: 以3个柑橘异源四倍体体细胞杂种(即四倍体粗柠檬与哈姆林甜橙体细胞杂种, 简称“HR”; 酸柚与粗柠檬体细胞杂种, 简称“SR”; 墨西哥来檬与伏令夏甜橙体细胞杂种, 简称“KV”)为父本, 分别与二倍体单胚性沙田柚进行有性杂交, 在有性胚还没有完全败育以前, 通过胚抢救技术进行三倍体植株培养(以四季柚花粉亲本为对照)。结果表明, 处理的杂交组合直接成苗率极显著低于对照($P < 0.01$), 其中又以沙田柚×HR组合成苗率相对较高, 达10.1%; 较适合瘦籽沙田柚幼胚离体培养的培养基是MT+GA₃ 1.0 mg/L+蜂皇浆200 mg/L+水解乳蛋白250 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂0.7%; 流式细胞分析仪检测结果显示, 本试验成功获得了柑橘三倍体植株。

关键词: 体细胞杂种; 有性杂交; 瘦籽沙田柚; 胚抢救; 三倍体植株

中图分类号: S662.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)02-0246-04

Regenerating triploid citrus plants by embryo rescue technique

LIU Ke-Hui^{1,2}, YU Fang-Ming³, ZHANG Qiu-Ming⁴, YI Gan-Jun^{1*}

(1. Institute of Pomology, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 2. College of Applied Science and Technology, Guilin University of Electronic Technology, Guilin 541004, China;
3. Department of Environmental Engineering, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China;
4. College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Diploid Shatian pummelo was used as the female and crossed with the allotetraploid somatic hybrids (*Citrus jambhiri*+*C. sinensis*(HR); *C. grandis*+*Rough lemon*(SR); *C. aurantiifolia*+*C. sinensis*(KV)) to regenerate triploid citrus plants by embryo rescue technique, using *C. grandis* pollen as the control. Results showed that the regenerating rate of treated sexual hybridization was significantly lower than that of the control ($P < 0.01$), in which the corresponding value of Shatian pummelo×HR was comparably higher (the rate of seedling is 10.1%). The optimal medium for embryo rescue was solid MT medium supplemented with GA₃ 1.0 mg/L, queen bee oar 200 mg/L, lacialbumin hydrolysate 250 mg/L and agar 0.7%. Results of flow cytometry analysis showed that triploid citrus plants were successfully obtained in this study.

Key words: somatic hybrids; hybridizing; seedless Shatian pummelo; embryo rescue; triploid plants

胚抢救是指对由于营养或生理原因造成的难以播种成苗或在发育早期阶段就败育、退化的胚进行早期分离培养(伊华林等, 2001)。它是果树早熟类

型品种的选育以及近年来对无核类果树品种选育所采取的有效手段与成功方法之一。1933年Tukey成功地培养了甜樱桃的幼胚, 成为胚培养在果树应

收稿日期: 2008-05-18 修回日期: 2009-02-28

基金项目: 广东省科技攻关项目(2002A2080303); 桂林电子科技大学博士启动基金(Z20718)[Supported by the Scientific and Technological Project of Guangdong Province(2002A2080303); Doctoral Scientific Research Foundation of Guilin University of Electronic and Technology(Z20718)]

作者简介: 刘可慧(1976-), 女, 湖南邵阳人, 博士, 主要从事环境生态学和全球变化生态学的研究, (E-mail) coffeeleave@126.com.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: yiganjun@vip.163.com)

用上的里程碑。1987 年至今, Rammig(1990)经过三年的努力, 利用胚挽救技术已成功的培育出了早熟桃与无核葡萄。如今, 胚抢救技术在果树育种上的应用越来越广泛。在我国, 胚抢救技术在柑橘育种上也取得了一定进展(邓秀新等, 1996; Carimi 等, 1998; 伊华林等, 1998; Grosser & Gmitter, 2005; 宋健坤等, 2005)。采用常规二倍体和四倍体品种间杂交, 具有很大的杂交障碍, 杂种胚早期败育, 很难获得杂交后代, 因而育种效率极低。随着生物技术的发展, 采用胚胎挽救技术可阻止三倍体杂交幼胚的早期败育, 形成三倍体植株。但在柑橘上, 通过不同来源的异源四倍体体细胞杂种与二倍体单胚进行有性杂交试验获得三倍体植株的研究相对较少。因此, 本研究通过对不同来源的异源四倍体体细胞杂种与二倍体单胚性沙田柚进行有性杂交试验, 对杂交果实的幼胚在未完全败育前进行胚抢救实验, 试图获得三倍体柑橘植株, 旨在为进一步培育无籽沙田柚提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以沙田柚为试验母本。供试父本分别为四倍体粗柠檬(*Citrus jambhiri*)与哈姆林甜橙(*C. sinensis*)体细胞杂种, 简称“HR”; 酸柚(*C. grandis*)与粗柠檬(*Rough lemon*)体细胞杂种, 简称“SR”; 墨西哥来檬(*C. aurantifolia*)与伏令夏甜橙(*C. sinensis*)体细胞杂种, 简称“KV”。以四季柚(*C. grandis*)花粉亲本为对照。于 2003 年 3 月 20~22 日进行授粉试验。除去未授粉的花和小幼果。将它们杂交所得的果实分别简称为 H, S, K, CK。异源四倍体花粉由华中农业大学邓秀新教授课题组提供。在授粉后 99 d 将幼果采回, 于 4 °C 下暂时保存。

1.2 沙田柚胚抢救培养基筛选

首先将幼果漂洗干净后(以 H 为试验材料), 果实横切, 用尖手术刀挑起败育种籽, 用 75% 酒精浸泡 30 s, 再放入 0.1% 升汞中消毒 10 min, 用无菌水冲洗 3~5 次, 然后用无菌水浸泡 0.5~1.0 h 待用。每瓶培养基接种 3~5 粒。培养基为 MT 基本培养基附加不同浓度的 GA₃、蜂皇浆、水解乳蛋白(LH)。比较各种组合对沙田柚胚挽救直接成苗率的影响, 以筛选适合于沙田柚胚挽救的培养基。本试验设三个因素, 其中 A 为 GA₃; B 为蜂皇浆; C 为

水解乳蛋白(LH), 各因素均设置 3 个浓度水平(表 1)。每个处理根据材料多少接种的瓶数有所不同, 重复 3 次(每一批培养基为一次重复)。采用 L₉(3³)正交试验设计。

表 1 幼胚直接成苗正交试验因素水平表 (mg/L)

Table 1 Levels of factors to embryo rescue

水平 Levels	因素 Factors		
	A	B	C
1	0.5	0	0
2	1.0	200	250
3	2.0	400	500

为比较三个杂交后代的直接成苗率情况, 分别取其幼胚用 MT+GA₃ 1.0 mg/L+蜂皇浆 200 mg/L 进行培养。以 MT 基本培养基为对照。所有培养基均加蔗糖 30 g/L, 琼脂 7 g/L。培养基用 0.1 mol/L HCl 或 0.1 mol/L NaOH 将 pH 值调至 5.8~6.0, 1.1 kg/cm² 高压灭菌 15 min, 灭菌后放置 2 d 左右备用。以上实验均重复 3 次, 每一批配制的培养基为一次重复。培养条件: 光照强度为 36 μmol·m⁻²·s⁻¹, 每天光照 16h, 温度为 (26±2)°C, 培养室湿度约 70%。

1.3 杂种后代倍性检测

随机抽取 3 株杂种后代植株叶片, 以大田沙田柚叶片为对照, 用流式细胞仪(Flow cytometry)进行细胞倍性检测(付春华等, 2005)。检测时, 取待测样品约 0.5 cm², 处理后上样于 Partec 倍性分析仪, 测定样品单个细胞核的 DNA 总量。

2 结果与分析

2.1 不同杂交组合对幼胚直接成苗的影响

观察结果表明, 授粉 99 d 后, 杂交果实种子均呈干瘪状, 而对照种子发育饱满, 这与邓秀新等(1996)的报道一致。从表 2 可知, 经处理的幼胚直接成苗率极显著的低于对照(n=3, P<0.01); 各处理之间又以 H 处理的萌发率最高, 小苗生长情况相对健壮, 处理效果最好。说明不同来源的异源四倍体父本对沙田柚胚抢救的效果影响较大。

2.2 不同添加物对沙田柚幼胚直接成苗的影响

由表 3 可知, MT+GA₃ 1.0 mg/L+蜂皇浆 200 mg/L+LH500 mg/L 培养基较适宜于沙田柚幼胚成苗实验, 直接成苗率达 13.1%。A 因素对直接成苗率的影响处于主要地位, 并以 A₂(1 mg/L)为最

好;其次为 B 因素,以 B3(400 mg/L)为佳;第三为 C 因素。就 C 因素而言,三个水平的直接成苗效果相差不大,从成本考虑选用 0 mg/L,从而其优化培养基配方为 A2B3C1,即 MT+条 GA₃1.0 mg/L+蜂皇浆 400 mg/L。在培养过程中发现添加 LH 后小

表 2 不同杂交组合对胚挽救直接成苗率的影响
Table 2 Effects of different crossing combinations on regeneration rate of embryo rescue

处理 Treatment	接种数 No. of inoculation	成苗数 No. of plant	成苗率(%) Regeneration rate	生长情况 Growth status
H	89	9	10.1bB	相对健壮
S	105	4	3.8cB	细弱
K	170	7	4.1cB	细弱
CK	35	31	91.4aA	健壮

注:表中同列不同大写字母和小写字母表示 Tukey's HSD 法分别在 5% 和 1% 水平的差异显著(n=3)。

Note: Different capital letters in same column indicate significant differences at 0.05 or 0.01 levels according to Tukey's HSD(n=3).

表 3 幼胚直接成苗率 L9(3³) 正交试验结果 (mg/L)
Table 3 Results of experiment analysis about plant regeneration rate

处理 Treatment	因素 Factors			成苗率(%) Rate of plant regeneration
	A	B	C	
1	1	1	1	2.0
2	1	2	2	2.4
3	1	3	3	3.3
4	2	1	2	8.3
5	2	2	3	10.2
6	2	3	1	13.1
7	3	1	3	6.8
8	3	2	1	9.1
9	3	3	2	9.8
对照(Control)				0
K1	7.27	17.29	22.14	
K2	29.65	21.53	20.62	
K3	25.72	24.27	20.33	
R 值 R value	21.63	6.98	1.81	
主要顺序 Order	1	2	3	

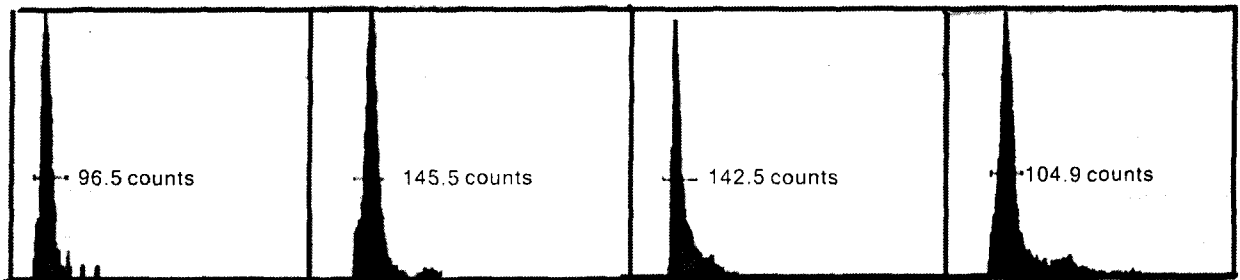


图 1 杂种后代倍性测定结果

Fig. 1 The results of somatic hybrid identification

检测数值在 100 counts 附近表示为二倍体;在 150 counts 附近表示为三倍体

Analyzed values closed to 100 counts meant the plant was diploid, while closed to 150 counts was triploid

苗的生长情况比不加要好。故选 A2B3C2,即 MT+GA₃1.0 mg/L+蜂皇浆 400 mg/L+LH250 mg/L 配方作为沙田柚胚挽救直接成苗的培养基,这在正交试验中没有出现。对照培养基(MT 基本培养基)直接成苗率为 0,说明在沙田柚的胚挽救直接成苗试验中加入一定浓度的 GA₃ 及附加物是必要的。

2.2 杂种后代倍性检测

从形态上看,所获得的杂种后代大多数植株叶片较大,颜色较浓。以往的研究也表明,柑橘多倍体叶片面积和厚度一般大于二倍体,这主要是因为多倍体细胞染色体数目相对较多,使细胞体积增大所引起(李小梅等,1999)。本试验共获得完整植株 25 株,随机抽取 3 株经流式细胞仪检测,其中 2 株为三倍体植株,1 株为二倍体(图 1)。

3 讨论

通过 2x(♀)与 4x(♂)杂交后,形成的种子高度不育,在种子未完全败育以前,将幼胚进行离体培养可获得三倍体植株(伊华林等,1997;1998;宋健坤等,2005)。本研究结果表明,以沙田柚为母本与异源四倍体体细胞杂种进行杂交,对其幼胚进行离体培养,幼胚直接成苗率达 3.81%~10.11%,说明该时期进行沙田柚杂种胚挽救实验是成功的。但直接成苗率比已经报道的都要低一些,这可能与采样时期有关。邓秀新等(1996)、宋健坤等(2005)在授粉 90 d 后进行幼胚培养取得了很好的效果;而伊华林等(1997)则认为胚挽救的适宜时间为授粉后 80~

90 d;本试验胚抢救的时间为授粉后 99 d,相对较晚。另外,广东梅县较武汉纬度低、温度更高和湿度更大,胚败育可能更快,从而导致本研究中成苗率较低。同时,成苗率还与亲本组合有关。宋健坤等(2005)以沙田柚、本地早橘、中秋橘、HB 柚、国庆 4 号温州蜜柑等二倍体品种为母本,以(橘柚+无酸甜橙)、(橘柚+柚)、(无酸甜橙+柚)、(伏令夏橙+橘橙)、(甜橙+丹西橘)等优良四倍体体细胞杂种的花粉授粉,通过胚挽救技术获得再生植株其成苗率从 16.3%到 93.1%不等。本研究结果表明,各处理之间的成苗率差别也较大,以四倍体粗柠檬与哈姆林甜橙体细胞杂种为父本与沙田柚进行杂交,其植株再生率相对较高。

幼胚的离体培养过程中细胞分化是一个复杂的生理生化过程,不同植物、不同胚培养阶段,培养基有所不同。并且,在胚培养的早期阶段合适的激素种类和浓度对胚抢救效果影响较大。Carimi 等(1998)认为添加适量的生长调节物质,是柑橘幼胚生长的前提条件。本实验研究结果表明,加 GA_3 的培养基,尤以 1.0 mg/L 水平的效果最好,直接成苗率达 8.3%~13.1%。任杰等(2007)认为在柑橘球形胚和心形胚阶段,2.9 $\mu\text{mol/L}$ 的 GA_3 有利于胚发芽。还有研究表明, GA_3 可促进根茎生长和胚早期萌发(Garimi 等,1998)。另外,适量的蜂皇浆和 LH 也有利于幼胚的直接成苗。这些附加物的加入除提供丰富的营养物质外,还可能直接对幼胚的萌发有刺激作用或间接的加强了植物生长调节剂对幼胚的作用。在本试验中较适合于瘦籽沙田柚胚抢救的培养基组合是 MT+ GA_3 1.0 mg/L+蜂皇浆 200 mg/L+水解乳蛋白 50 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 0.7%。

流式细胞仪检测结果表明,本试验成功获得了柑橘三倍体植株,进一步证实采用胚挽救技术,对三倍体杂种幼胚进行早期离体培养,使其在适宜的条件下成苗,获得三倍体的柑橘新种质这一技术路线是可行的,值得深入研究。

致谢 感谢广东省果树研究所周碧蓉研究员、

曾继吾副研究员及吴元立老师对本研究的指导和辛勤付出;感谢广东省梅州市兴宁市龙威农业发展有限公司为本实验提供了良好的实验场地。

参考文献:

- Carimi F, Pasquale FDE, Puglia AM. 1998. In vitro rescue of zygotic embryos of sour orange, *Citrus aurantium*, and their detection based on RFLP analysis[J]. *Plant Breeding*, 117(3): 261-26
- Deng XX, Sun ZH, Gao L. 1995. The agronomic performances of citrus somatic hybrids and the parents[J]. *Acta Hort*, 392: 69-75
- Deng XX(邓秀新), Yi HL(伊华林), Li F(李锋), et al. 1996. Triploid citrus plants obtained from crossing the diploids with allotetraploid somatic hybrids(以异源四倍体体细胞杂种为父本杂交培育三倍体柑桔植株的研究)[J]. *Acta Bot Sin(植物学报)*, 138(8): 631-636
- Fu CH(付春华), Guo WW(郭文武), Deng XX(邓秀新). 2005. Rapid identification of *Citrus* somatic hybrids through flow cytometry and RAPD analysis(用流式细胞仪和 RAPD 快速鉴定柑橘体细胞杂种)[J]. *J Huazhong Univ Sci Tech (Nat Sci Edi)(华中科技大学学报:自然科学版)*, 33(10): 102-105
- Grosser JW, Gmitter JR, FG. 2005. Applications of somatic hybridization and cybrization in crop improvement with citrus as a model[J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 41: 220-225
- Ramming DW. 1990. The use of embryo culture in fruit breeding [J]. *Hort Sci*, 25(4): 393-398
- Ren J(任杰), Xiu YP(徐彦平). 2007. Applied of embryo rescue technology on grape(胚挽救技术在葡萄上的应用)[J]. *Agric Fore Techn Ningxia(宁夏农林科技)*, 3: 45-47
- Song JK(宋健坤), Guo WW(郭文武), Yi HL(伊华林), et al. 2005. Creation of triploid *Citrus* plants by crossing elite allotetraploid somatic hybrid pollen parents with diploid cultivars(以异源四倍体体细胞杂种为父本与二倍体杂交创造柑橘三倍体的研究)[J]. *Acta Hort Sin(园艺学报)*, 32(4): 594-598
- Tukey HB. 1933. Artificial culture of sweet cherry embryos[J]. *Hered*, 24: 7-12
- Yi HL(伊华林), Deng XX(邓秀新), Fu CH(付春华). 2001. Application of embryo rescue techniques in fruit crops(胚挽救技术在果树上的应用)[J]. *J Frit Sci(果树科学)*, 18(4): 224-228
- Yi HL(伊华林), Deng XX(邓秀新), Shi YZ(史永忠), et al. 1997. Studies on culture of immature triploidy embryos *in vitro* (三倍体柑桔幼胚离体培养研究)[J]. *Acta Hort Sin(园艺学报)*, 24(3): 289-290
- Yi HL(伊华林), Deng XX(邓秀新). 1998. A study of culture of citrus triploid plantlets(培养三倍体柑桔植株的研究)[J]. *J Friut Sci(果树科学)*, 15(3): 212-216