

# 柑桔细胞电融合再生两个种间体细胞杂种

郭文武 邓秀新

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室 武汉 430070)

**摘 要** 朋娜脐橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) 胚性细胞悬浮系原生质体分别与粗柠檬 (*C. jambhiri* Lush)、枸头橙 (*C. aurantium*) 叶肉原生质体经电场诱导而融合。经培养, 两组合均获得再生植株。对朋娜脐橙 + 粗柠檬的再生胚状体进行染色体计数, 随机取样的 52 个胚状体中, 26 个为四倍体, 另外 26 个为二倍体; 对 74 棵再生植株进行染色体计数, 由此说明都为四倍体; 表明体细胞杂种在植株再生过程中具有明显的竞争优势。朋娜脐橙 + 枸头橙再生的 14 棵植株都为四倍体。对朋娜脐橙 + 粗柠檬部分植株进行 POX 同工酶和 RAPD 分析, 表明所有检测植株都为杂种。朋娜脐橙 + 枸头橙再生植株经 RAPD 分析, 表明也为杂种。

**关键词** 柑桔, 体细胞杂交, RAPD, 品种改良

**中图分类号** Q813.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0179-04

柑桔体细胞杂交技术可以有效地克服其常规育种实践中所遇到的珠心胚干扰、雄/雌性败育等困难。近 10 年来, 该技术发展迅速, 已创造一大批种间、属间体细胞杂种<sup>[1]</sup>。作者已建立起柑桔细胞高效电融合技术体系<sup>[2]</sup>, 使得体细胞杂种植株再生率大大提高, 并获得一批新的体细胞杂种<sup>[2~5]</sup>。本文报道的是采用电融合法获得的 2 个柑桔种间体细胞杂种。

## 1 材料和方法

**1.1 材料:**朋娜脐橙 (*C. sinensis*) 胚性愈伤组织由幼嫩珠心组织诱导产生<sup>[6]</sup>, 继代保存于 MT 基本培养基<sup>[7]</sup>中。胚性细胞悬浮系培养基为 MT + 蔗糖 50g/L + 麦芽提取物 500mg/L, 每 14d 继代 1 次, 继代 3 次后用于原生质体分离。粗柠檬 (*C. jambhiri*)、枸头橙 (*C. aurantium*) 成熟种子经消毒后接种于试管中, 叶片充分展开后用于叶肉原生质体分离。

### 1.2 原生质体分离、纯化、融合及培养

朋娜脐橙悬浮继代后的 6~10 d, 可用于分离原生质体。胚性细胞悬浮系及叶肉原生质体分离、纯化与以前报道相同<sup>[2]</sup>。融合仪为 SSH-2 型 (日本岛津), 融合室为 FTC-03 型。融合参数如下: 交变电场 125V/cm, 作用时间 60s; 直流脉冲电场 1250V/cm, 脉冲宽度 40 $\mu$ s, 脉冲间隔 0.5s, 脉冲个

数为 5。电融合液组成为: 甘露醇 0.6mol/L, CaCl<sub>2</sub> 0.25 mmol/L, pH5.6, 高压灭菌。双核异核体率统计方法同文献<sup>[2]</sup>。融合过程完成后, 静止 10min, 然后离心 4min (100 $\times$ g)。融合产物用 BH3 液体培养基<sup>[8]</sup>悬浮至 1~5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/mL 的密度, 于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中, 用 15mm $\times$ 60mm 玻璃培养皿进行液体浅层暗培养。

胚状体增殖培养基组成为: MT + 蔗糖 50g/L + 麦芽提取物 500mg/L; 生芽培养基组成为: MT + 蔗糖 30g/L + BA 0.5mg/L + KT 0.5mg/L + NAA 0.1mg/L; 生根培养基组成为: 1/2MT + 蔗糖 20g/L + NAA 0.5mg/L + 活性炭 0.05%。所有培养基的 pH 值均为 5.8。

### 1.3 染色体计数、同工酶及 RAPD 分析

胚状体、根尖染色体计数采用铁矾苏木精染色法<sup>[9]</sup>。POX 同工酶分析参照文献<sup>[10]</sup>。叶片 DNA 提取采用 SDS 方法<sup>[11]</sup>。扩增仪为 Perkin Elmer 480 型。所用引物为: OPA-04, OPA-05, OPA-07, OPA-08, OPA-10, OPA-19, OPA-20。反应条件同文献<sup>[12]</sup>, 扩增产物经 1.6% 琼脂糖电泳, 溴化乙锭染色后照相。

## 2 结果和分析

### 2.1 融合产物经培养获得再生植株

朋娜脐橙胚性细胞悬浮系原生质体分别与粗柠檬、枸头橙叶肉原生质体经电场诱导而融合,双核异核体率达 10% 以上。利用不同类型原生质体比重的不同,即柑桔叶肉原生质体、融合体的比重比悬浮系原生质体大,并且柑桔叶肉原生质体在目前培养体系下不能分裂再生成株,融合后通过控制离心时间,即离心 4min,而不是通常的 10min,又可收集到更高比例的双核异核体<sup>[2]</sup>。融合产物经培养,20~30 d 形成肉眼可见细胞团,及时降低渗透压和扩大培养面,细胞团直接转化为绿色球形胚状体(朋娜脐橙+粗柠檬大约 100 个/皿,朋娜脐橙+枸头橙 5 个/皿)。将胚状体转至增殖培养基,光照下进行液-固双层培养,胚状体进一步增大并且木质化。将木质化的胚状体转至生芽培养基,诱导出大量丛芽。将再生芽切下并转至生根培养基,100% 的芽可以生根而成为完整植株。整个过程,朋娜脐橙+粗柠檬为 3~4 个月,朋娜脐橙+枸头橙为 5~6 个月。

## 2.2 体细胞杂种鉴定

朋娜脐橙、粗柠檬、枸头橙均为二倍体( $2n = 2x = 18$ ),叶形较细长,而它们的融合再生植株叶片较厚、叶形较宽,具多倍体特征(图 1)。对朋娜脐橙+粗柠檬的再生胚状体,随机取 52 个进行染色体计数,表明 26 个为四倍体( $2n = 4x = 36$ ),另外 26 个为二倍体( $2n = 2x = 18$ ),即各占 50%。而对再生的 74 棵植株进行根尖染色体计数表明,都为四倍体(图 2)。植株水平上的四倍体率远远大于胚状体水平上的,表明体细胞杂种在植株再生过程中具有明显的竞争优势。对朋娜脐橙+枸头橙再生的 14 棵植株进行根尖染色体计数表明,全为四倍体(图 3)。

对朋娜脐橙+粗柠檬随机取 12 株进行 POX 同工酶分析表明,再生植株综合了双亲的谱带,为体细胞杂种(图 4)。RAPD 分析表明,引物 A-08、A-19 扩增时,随机取样的 6 棵再生植株综合了双亲的谱带,都为杂种类型(A-08 谱带见图 5:9~16 道)。A-07 扩增时,再生植株的谱带同粗柠檬(图 5:1-4 道);A-04 扩增时,再生植株谱带与朋娜脐橙相同(A-04 谱带见图 5:5-8 道),即 A-07 与 A-04 结合也可鉴定其杂种性。对朋娜脐橙+枸头橙的其中 2 棵再生植株进行 RAPD 分析表明,A-04、A-08 扩增时,可以有效地鉴定再生植株为体细胞杂种(A-04 谱带见图 5:17-20 道)。形态学观察、染色体计数、同工酶及 RAPD 分析,表明获得了朋娜脐橙+粗柠檬、朋娜脐橙+枸头橙的异源四倍体体细胞杂种植株。

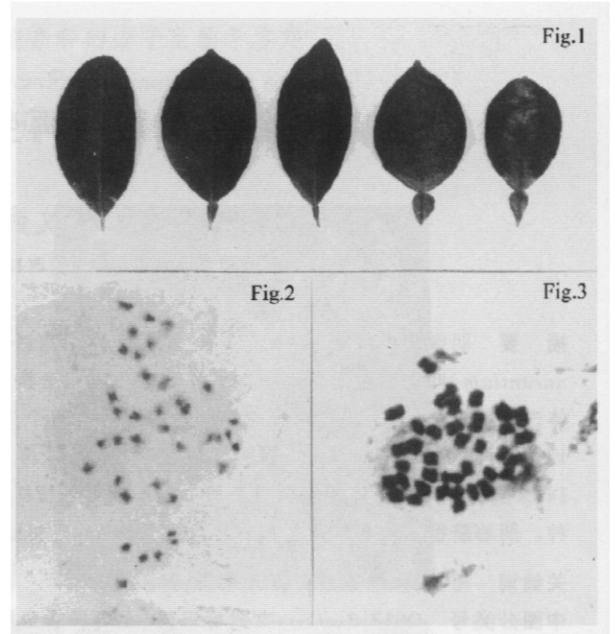


图 1 体细胞杂种及双亲叶片形态比较

Fig. 1 Comparison of leaf morphology between somatic hybrids and their parental genotypes

From left to right: Rough lemon, Bonnaza navel + rough lemon, Bonnaza navel, Bonnaza navel + Goutou orange, Goutou orange

图 2 朋娜脐橙+粗柠檬体细胞杂种根尖染色体数目 ( $2n = 4x = 36, 1\ 000x$ )

Fig. 2 Root-tip chromosomes of somatic hybrids between bonnaza navel and rough navel and rough lemon ( $2n = 4x = 36, 1\ 000x$ )

图 3 朋娜脐橙+枸头橙体细胞杂种根尖染色体数目 ( $2n = 4x = 36, 1\ 000x$ )

Fig. 3 Root-tip chromosomes of somatic hybrids between Bonnaza navel and Goutou orange ( $2n = 4x = 36, 1\ 000x$ )

## 3 讨 论

本研究通过电融合法成功地获得了朋娜脐橙+粗柠檬、朋娜脐橙+枸头橙的种间体细胞杂种。这两个组合在再生快慢和再生数量上都存在明显差异,即朋娜脐橙+粗柠檬再生过程比朋娜脐橙+枸头橙快,而且再生数量远远多于朋娜脐橙+枸头橙。原因可能有以下两个方面:1. 粗柠檬这个种的速生特性传递给了体细胞杂种;其它含有粗柠檬的融合组合再生过程也较快,再生数量也较多,如 Page 桔柚+粗柠檬再生 150 株<sup>[2]</sup>,红桔+粗柠檬再生 30 余株<sup>[13]</sup>;2. 朋娜脐橙属甜橙类(*Citrus sinensis*)、枸头橙属于酸橙类(*Citrus aurantium*),两者同属橙类,

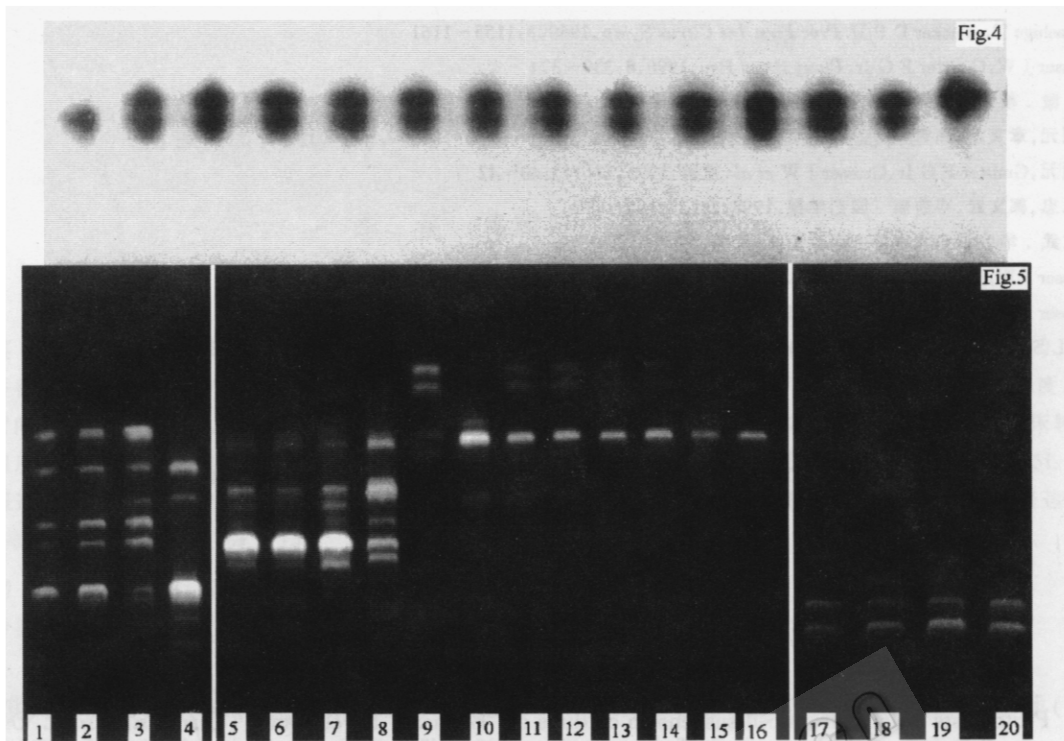


图4 朋娜脐橙+粗柠檬体细胞杂种植株 POX 同工酶分析

Fig.4 POX isozyme analysis of bonnaza navel + rough lemon

( $2n = 4x = 36, 1\ 000x$ )

图5 朋娜脐橙+粗柠檬,朋娜脐橙+枸头橙体细胞杂种植株 RAPD 分析

Fig.5 RAPD analysis of bonnaza navel + rough lemon, bonnaza navel orange + goutou

1~4: OPA-07; 5~8: OPA-04; 9~16: OPA-08; 17~20: OPA-04, From left to right: 3, 8, 10: Rough lemon;

4, 7, 9, 17: Bonnaza navel; 1~2, 5~6, 11~16: Somatic hybrids between bonnaza navel and rough lemon;

18: Goutou orange; 19~20: Somatic hybrids between bonnaza navel and goutou orange.

而粗柠檬属于枸橼类,朋娜脐橙与粗柠檬的遗传距离比其与枸头橙(酸橙类)的遗传距离相对要远一些,融合产物的杂种优势现象较明显,因而再生相对容易;而朋娜脐橙与枸头橙融合产物的杂种优势现象不太明显,因而再生相对而言要困难一些。不同融合组合再生难易存在差异的现象较为普遍, Grosser 等<sup>[14]</sup>也指出,属间杂种比种间杂种再生容易些,因为其杂种优势现象较明显。

前人研究表明,四倍体作为砧木,嫁接其上的接穗表现较矮化、早果,这对柑桔矮化密植、降低收获

成本和冬季防寒措施的实施等具有重要意义<sup>[15,16]</sup>。柑桔异源四倍体体细胞杂种比同源四倍体生长势强;并且通过融合组合选配,还可以实现双亲某些抗性性状的优势互补。粗柠檬具速生性、耐旱、耐瘠、耐柑桔裂皮病(CEV),枸头橙耐盐碱、抗柑桔速衰病(CTV)。本研究得到的朋娜脐橙+粗柠檬、朋娜脐橙+枸头橙体细胞杂种将有可能成为我国南方无冻害地区的适宜砧木。这两个体细胞杂种的抗性、作为砧木对接穗品种的影响等试验正在进行之中。

### 参 考 文 献

- [1] 邓秀新,刘继红. 武汉植物学研究,1996,14(4):357~369
- [2] 郭文武,邓秀新,史永忠. 植物学报,1998,40(5):417~424
- [3] 郭文武,邓秀新,胡春根. 武汉植物学研究,1999,17(2):127~129
- [4] Guo W W, Deng X X. *Plant Cell Reports*, 1998, 18: 297~300
- [5] Guo W W, Deng X X. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 581~585
- [6] 叶新荣,章文才,万蜀渊. 果树科学,1994,11(2):81~83

- [ 7 ] Murashige T, Tucker D P H. *Proc First Int Citrus Symp*, 1969, 3:1155~1161
- [ 8 ] Grosser J W, Gmitter F G Jr. *Plant Breed Rev*, 1990, 8:339~374
- [ 9 ] 朱 激. 植物染色体及染色体技术. 北京: 科学出版社, 1982
- [ 10 ] 肖顺元, 章文才, 陈吉笙等. 园艺学报, 1989, 16:255~260
- [ 11 ] 肖顺元, Gmitter F G Jr, Grosser J W *et al.* 遗传, 1995, 17(14):40~42
- [ 12 ] 史永忠, 郭文武, 邓秀新. 园艺学报, 1998, 25(2):105~110
- [ 13 ] 郭文武. 华中农业大学博士学位论文, 武汉, 1998
- [ 14 ] Grosser J W, Jiang R, Mourao-Fo F A A *et al.* *HortSci*, 1998, 33(6):1057~1059
- [ 15 ] Grosser J W, Gmitter F G Jr, Sesto F *et al.* *J Amer Soc Hort Sci*, 1992, 117(1):169~173
- [ 16 ] Lee L S, Gillette D, Shaw R. *Proc 3th World Cong Int Soc Citrus Nurserymen*, Australia, 1990, pp. 198~203

## Two Interspecific Somatic Hybrid Plants Regenerated Via Protoplast Electro-fusion

GUO WEN-Wu Deng Xiu-Xin

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract** Protoplasts isolated from cell suspension cultures of 'Bonnaza' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) were electrically fused with mesophyll protoplasts of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) and Goutou orange (*Citrus aurantium* L.) respectively. Plants regenerated from both fusion combinations. Chromosome counting of randomly selected fifty two globular embryoids as well as all the regenerated seventy four plants from Bonnaza navel + rough lemon revealed that twenty six embryoids were tetraploids, and the rest were diploids while 100% regenerated plants were tetraploids. The results inferred that somatic hybrids were more competitive than parental genotypes in the process of plant regeneration. All the regenerated 14 plants from Bonnaza navel + Goutou orange were tetraploids as revealed by chromosome counting. POX isozyme and RAPD analysis verified that the plants from Bonnaza navel + rough lemon were hybrids, and RAPD analysis confirmed the hybridity of those from Bonnaza navel + Goutou orange.

**Key words** *Citrus*, somatic hybridization, randomly amplified polymorphic DNA, cultivar improvement