

## 宜昌橙与伏令夏橙种间体细胞杂种

邓秀新 肖顺元 邓占鳌 章文才

(华中农业大学柑桔研究所, 武汉 430070)

宜昌橙(*Citrus ichangensis* Swingle)试管实生苗叶肉原生质体与伏令夏甜橙(*C. sinensis* Osbeck)胚性悬浮细胞系原生质体,经聚乙二醇(PEG)诱导融合。再生出的胚状体为畸形,转移到生芽培养基中诱导产生丛芽。丛芽微嫁接在15天龄的枳壳砧上成为完整植株。幼叶染色体检查表明,两亲本均为二倍体 $2n = 2x = 18$ ,融合后再生出的植株为四倍体 $2n = 4x = 36$ 。过氧化物酶(POX)及谷草酰胺转氨酶(GOT)同工酶分析证明,这些四倍体均为体细胞杂种,它们同时含有双亲的酶带。杂种植株叶片形态更像甜橙。植株移入土壤后生长旺盛。

**关键词** 柑桔;原生质体融合;体细胞杂种;宜昌橙;甜橙

柑桔原生质体融合技术近年来取得了很大进展。自1985年首次报道通过原生质体融合培育出柑桔属(*Citrus*)与枳属(*Poncirus*)的属间体细胞杂种以来<sup>[1,2]</sup>,迄今,已获得30余个种间及属间体细胞杂种<sup>[1,3]</sup>。这一技术已成为克服柑桔有性杂交过程中所遇到的珠心胚干扰,花粉/胚囊败育等困难的有效方法。使一些以前无法进行杂交的亲本间实现了基因重组<sup>[1,6,8]</sup>。

本研究室自1987年开始了这方面的工作,已培育出柑桔属与金柑属(*Fortunella*)属间以及粗柠檬与哈姆林甜橙种间体细胞杂种各一个<sup>[3,5]</sup>。本文报道新近培育的宜昌橙(*Citrus ichangensis* Swingle)与伏令夏甜橙(*C. sinensis* Osbeck)种间体细胞杂种。

宜昌橙为原产我国湖北等地的一个抗寒野生柑桔种。它可抗 $-18^{\circ}\text{C}$ 的低温,其抗寒性在柑桔属中是最强的,但其果实有异味、种子多,不能食用。伏令夏甜橙为优良的晚熟品种,但不抗寒。本研究的目的在于培养抗寒优质的柑桔类型或为进一

步开展柑桔抗寒育种提供中间材料。

### 材料与方 法

#### (一) 原生质体的制备及悬浮细胞系的建立

宜昌橙种子经表面消毒后,播种于试管中。待叶片充分展开后,分离原生质体。播种培养基及消毒方法同前<sup>[5]</sup>,伏令夏橙的愈伤组织由胚珠诱导产生,美国佛罗里达大学 Grosser 博士提供。愈伤组织按Grosser的方法建立起悬浮细胞系<sup>[6]</sup>。

#### (二) 原生质体分离方法

叶肉及悬浮细胞系的原生质体分离方法参照Grosser等<sup>[6]</sup>的做法。原生质体融合及培养方法与以前的报道<sup>[3]</sup>基本相同。在下列方面作了修改。融合后培养再生的胚状体为畸形,没能萌发出茎芽。随后,用刀片将这种畸形胚状体分割成几块,转入诱导生芽培养基中产生丛芽。培养基为MT<sup>[10]</sup>基本培养基,附加 $0.5\text{mg/L}$

本文于1992年5月14日收到。

国家教委资助基金及国家自然科学基金项目。

KT、0.5mg/L BA及0.1mg/L NAA。选取生长较健壮的丛芽微嫁接在15天龄的枳壳 (*Poncirus trifoliata* Raf.) 砧木上。将从芽留0.5cm长, 用手术刀片将其基部削成楔形, 与此同时, 将试管中生长15天龄的砧木去掉主根, 在子叶上1.5cm处去掉茎, 并将其劈开。随后, 将从芽插入裂口。整个操作均在无菌条件下进行。接好的植株培养于MT基本培养基中。伤口愈合后, 及时清除砧木的萌蘖。待伤口充分愈合, 并且丛芽长出新叶后, 移入土壤。刚移栽时, 罩上烧杯, 每隔一天喷施一次1/3浓度的MT大量元素。植株长出新叶后拿去烧杯

### (三) 染色体数观察

采用幼叶, 染色方法为海氏苏木精法。每一植株至少观察5个清晰的中期细胞。

### (四) 酶的分析

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析亲本及再生植株叶片的过氧化物(POX)及谷草酰胺转氨酶(GOT)两种同工酶。取样及分析方法与以前报道相同<sup>[4]</sup>。

## 结果与讨论

### (一) 原生质体培养与再生

融合后的原生质体浅层培养10天时, 观察到原生质体恢复分裂。20天时, 观察到分裂2—3次的多细胞团。随着培养基渗透压降低, 多细胞团生长加块。培养100天时, 再生出球形胚状体。按以前的方法<sup>[3]</sup>, 胚状体没能进一步发育至子叶期, 不能萌发出茎芽。其中一些胚状体增殖产生许多子叶状结构, 成为畸形胚状体。这一种胚状体被分割成几块, 在诱导生芽培养基中2个月后, 再生出不定芽。在使畸形胚状体改变再生途径, 产生不定

芽过程中, 观察到已木质化的组织较易产生不定芽。而未木质化的则较难, 甚至在生芽培养基中产生愈伤组织, 回复到未分化状态。因此, 本试验在以后的诱导不定芽过程中, 将畸形胚状体切开后置于MT基本培养基中先培养(木质化)一段时间, 然后再诱导不定芽。

### (二) 微嫁接产生完整植株

本试验获得的丛芽在生根培养基<sup>[3]</sup>中未能生根。丛芽经试管微嫁接后成为植株。嫁接成活率在70%以上。芽的质量与嫁接成活率有直接关系。嫁接时, 选取生长粗壮充实, 已有叶片的丛芽嫁接较易成活。嫁接10天后, 必须注意清除砧木上的萌蘖, 以保证接上去的芽生长。一般嫁接后2个月, 植株可移入土壤。本研究采用此法已获得50余棵完整植株, 其中15株已移入土壤中, 植株生长旺盛。从融合到植株移入土壤所需时间远比作者进行的另外2个组合<sup>[3,5]</sup>长。这可能与宜昌橙生长较缓慢以及扦插不易生根等特点有关。

本试验目前获得的丛芽均来自该融合最先再生出来的2个畸形胚状体。后来证明均为体细胞杂种。这一结果与以前报道<sup>[3,5]</sup>相类似。说明杂种细胞在生长过程中具有优势。在柑桔属与其近缘植物(种)的融合中, 常遇到胚状体畸形化, 难以生根等问题<sup>[5,6,8,12]</sup>。目前报道的体细胞杂种中, 有一部分就是将畸形胚状体诱导丛芽后再生成株的。因此, 在开展融合时, 特别是进行野生种的融合时, 不仅要建立起一套有效的融合及培养体系, 而且, 还要注意畸形胚状体的成苗问题。改变畸形胚状体再生途径, 先诱导丛芽, 然后生根或试管嫁接成植株, 以提高体细胞杂种的再生频率。

### (三) 体细胞杂种的确认

对移入土壤的15棵植株进行叶片形态

比较,见图版 I-1—2。这些植株的叶片较宜昌橙及伏令夏橙厚,叶色深。翼叶大小是鉴别柑桔种类的重要指标。从图版 I-2 看出,杂种植株的叶片翼叶比亲本伏令夏橙大,但比另一亲本宜昌橙小;杂种叶片大小及形态更像伏令夏橙。这15棵植株之间,叶片形态上无明显差异。对其中5株的幼叶进行染色体观察,结果表明为四倍体,  $2n=4x=36$  (图版 I-5), 而其亲本伏令夏橙及宜昌橙均为二倍体,  $2n=2x=18$  (图版 I-3)。

POX及GOT两种同工酶分析结果显示,这5棵四倍体植株均为异源四倍体体细胞杂种。伏令夏橙及宜昌橙的POX及GOT同工酶带均有差异(图版 I-4—6), 它们的体细胞杂种则同时含有双亲的酶带,双亲的酶带在杂种中均得到表现。以上几方面的结果证明本试验获得了宜昌橙与伏令夏橙的种间体细胞杂种。

柑桔有性杂交,长期以来因为珠心胚干扰的障碍而进展缓慢。柑桔属中的绝大

多数种(品种)是多胚的<sup>[13]</sup>。本试验采用的宜昌橙为柑桔属中为数不多的单胚性野生种<sup>[13]</sup>,是抗寒及矮化育种的宝贵资源。华中农业大学六十年代试图将其抗寒性通过有性杂交方式转移到栽培品种去。结果发现以其作为母本的杂交方式没有得到杂种,后来采用本地早(多胚)为母本与它杂交得到了几株杂种苗。这些有性杂种个体间性状差异较大。果实性状表现为不可食用。

本试验通过融合方式得到了一批杂种苗,解决了珠心胚干扰及伏令夏橙花粉和珠囊部分败育种子少<sup>[13]</sup>,难以杂种的困难,提高了育种效率。从目前植株的枝叶看,其野生性状表现不强,而更趋向栽培品种伏令夏橙。值得指出的是,这种异源四倍体会不会像同源四倍体那样表现出果实的,皮粗厚等不利特点,这还有待以后观察。已有关于柑桔异源四倍体体细胞杂种的报道<sup>[2,9,11]</sup>,还不能对这一问题作出结论。

## 参 考 文 献

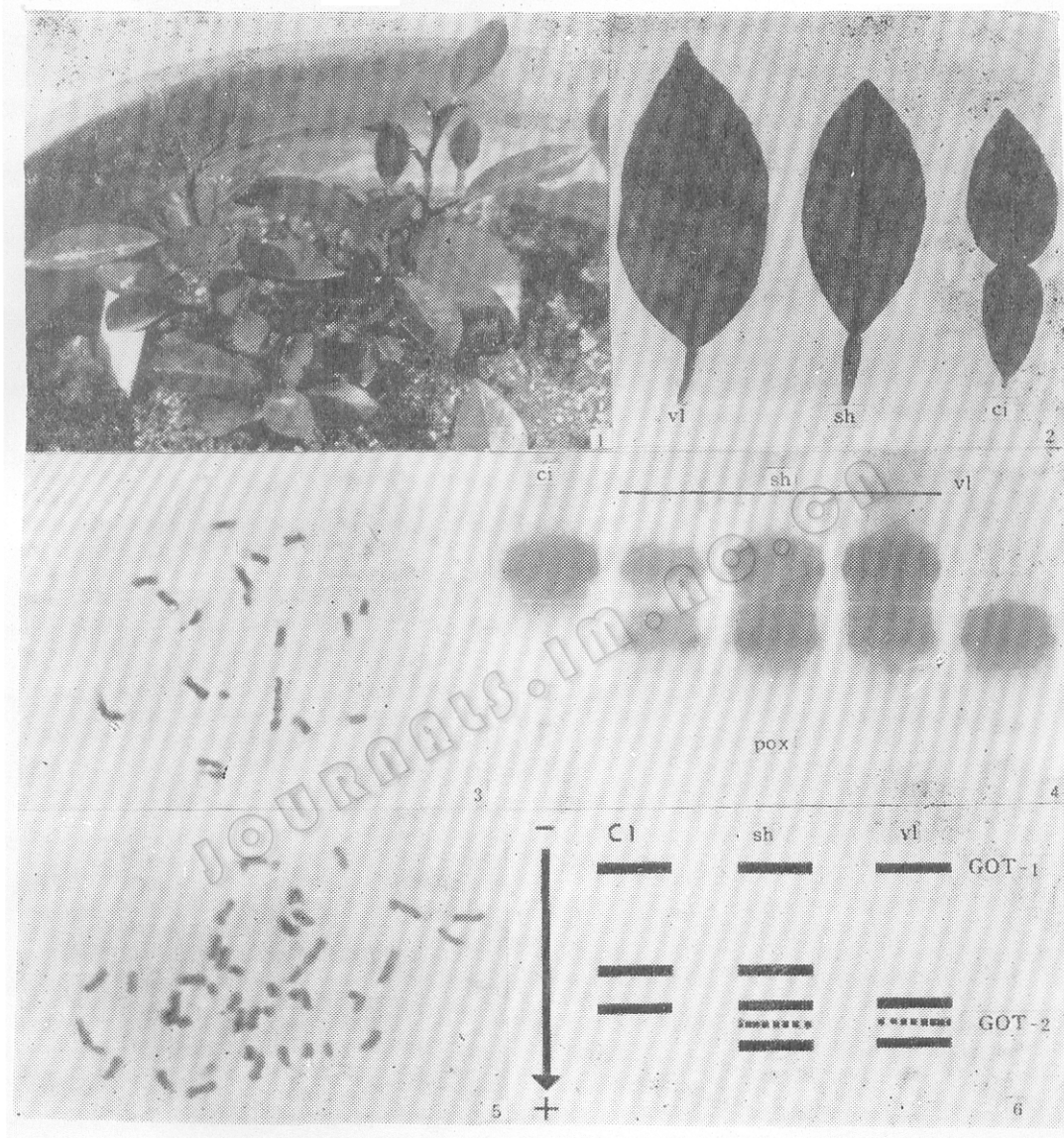
- [1] 邓秀新, 章文才: 果树科学, 8(1):51—58, 1991.
- [2] 邓秀新等: 遗传, 14(1):8—9, 30, 1991.
- [3] 邓秀新等: 遗传学报, 19(2):140—144, 1992.
- [4] 肖顺元等: 园艺学报, 16(4):255—260, 1989.
- [5] Deng, X.X. et al.: Hort.Sci., 49:555—562, 1992.
- [6] Grosser, J.W. and Gmitter, F.G.: Plant Breed. Rev., 8:339—374, 1990.
- [7] Grosser, J.W. et al.: Theor.Appl.Genet., 75:397—401, 1988.
- [8] Grosser, J.W. et al.: Plant Cell Report, 8:656—659, 1990.
- [9] Kobayashi, S. et al.: Hort. Sci., 26:207, 1991.
- [10] Murashige, T. and Tucker, D.H.: Proc.1st. Int. Citrus. Symp., 3:1156—1161, 1969.
- [11] Ohgawara, T. et al.: Theor.Appl.Genet., 81:141—143, 1991.
- [12] Ohgawara, T. et al.: Theor.Appl.Genet., 71:1—4, 1985.
- [13] Soost, R.K. et al.: Advances in Fruit Breeding, (eds. Janick, J. et al.) Purdue University Press, West Lafayette, IN., pp.507—540, 1975.

## Interspecific Somatic Hybrid of Ichang Papeda with Valencia Orange

Deng Xiuxin Xiao Shunyuan Deng Zhanac Zhang Wencai  
(Citrus Research Institute, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Protoplasts from Ichang papeda (*Citrus ichangensis* Swingle) leaf in vitro were fused with embryogenic suspension culture protoplasts of 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* Osbeck) by polyethylene glycol (PEG)-induced fusion. The regenerated embryoids were malformed and were transferred onto shoot induction medium. The shoots were then grafted on 15 day-old seedlings of trifoliate orange in vitro. Chromosome counts of the young leaves showed that the parents were diploids  $2n = 2x = 18$  and, the regenerated plants tetraploids  $2n = 4x = 36$ . Peroxidase and glutamate oxaloacetate transaminase isozymes analysis confirmed that these tetraploids were somatic hybrids. They have the bands of both parents. The hybrid plants were vigorous after transplanted into soil. Leaf morphology of the hybrid was more similar to sweet orange.

**Key words** Citrus; protoplast fusion; somatic hybrid; ichang papeda; sweet orange



1. Somatic hybrid plants of ichang papeda with, valencia orange,
2. Leaf morphology of ichang papeda (ci), valencia orange (vl) and their somatic hybrid (sh),
3. Chromosome counts showed that the parents were diploids  $2n = 2x = 18$ ,
4. Peroxidase (POX) isozyme patterns of the hybrid and its parents,
5. Chromosome counts showed that the somatic hybrids were tetraploids  $2n = 4x = 36$ ,
6. Schematic diagrams of glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) isozymes of the parents and their somatic hybrid.