

## 冰糖橙×枸橼杂交后代的胚抢救及杂种鉴定

张新宇<sup>1</sup>, 陈驰杰<sup>1</sup>, 张文<sup>3</sup>, 田洋<sup>1</sup>, 陈严<sup>1</sup>, 王吾谦<sup>1</sup>, 邓子牛<sup>1,2</sup>, 李大志<sup>1,2\*</sup>

(1.湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.国家柑橘改良中心长沙分中心, 湖南 长沙 410128; 3.湖南省园艺研究所, 湖南 长沙 410125)

**摘要:** 为获得冰糖橙×枸橼的合子苗, 以抗柑橘溃疡病枸橼为父本, 以高感病品种冰糖橙为母本进行杂交, 利用胚抢救技术获得杂交后代, 然后利用筛选出的 SSR 引物对亲本和子代的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 分析并鉴定杂交后代中的合子苗。结果表明: 在最终获得的 359 株杂交后代中, 利用 SSR 标记能鉴定出合子苗 12 株。

**关键词:** 冰糖橙; 枸橼; 杂种鉴定; 胚抢救技术

中图分类号: S666

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)02-0157-05

## Embryo rescue and hybrid identification of sweet orange (Bingtang) and citron

ZHANG Xin-yu<sup>1</sup>, CHEN Chi-jie<sup>1</sup>, ZHANG Wen<sup>3</sup>, TIAN Yang<sup>1</sup>, CHEN Yan<sup>1</sup>,

WANG Wu-qian<sup>1</sup>, DENG Zi-niu<sup>1,2</sup>, LI Da-zhi<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Changsha Subcenter, National Center for Citrus Improvement, Changsha 410128, China; 3.Hunan Horticultural and Research Institute, Changsha 410125, China)

**Abstract:** In order to obtain zygotic seedlings from hybrid of sweet orange (Bingtang) and citron, a experiment was conducted by taken Bingtang as female parent and citron with resistance to canker as male parent. Embryo rescue technology was firstly used to obtain filial generation, and then the genomic DNA of parents and their hybrids were amplified by PCR using screened simple sequence repeats (SSR) primers, and zygotic seedlings of next generation were further identified. The results showed that twelve zygotic seedlings were identified from the 359 obtained seedlings by SSR markers.

**Key words:** Bingtang sweet orange; citron; molecular marker; embryo rescue

冰糖橙(*Citrus sinensis* Osbeck ‘Cheng’)为湖南省主栽的甜橙品种之一, 是高度感柑橘溃疡病的品种<sup>[1-2]</sup>。柑橘溃疡病严重影响柑橘产业的发展<sup>[3]</sup>。农业生产中运用农业防治、化学防治和生物防治等技术来防治柑橘溃疡病, 但均不能彻底根治<sup>[4-7]</sup>。Deng 等<sup>[8]</sup>对湖南柑橘资源接种离体和活体溃疡病菌, 获得了 1 个主动抗溃疡病资源——枸橼。近年来, 胚抢救技术在柑橘育种中的应用越来越广泛。该技术有效地克服了柑橘的多胚性障碍<sup>[9]</sup>, 加快了育种进程。简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)已被广泛用于对柑橘合子苗的早期鉴定<sup>[10-11]</sup>。本

试验中将冰糖橙与枸橼进行杂交, 通过胚抢救技术获得杂交后代, 再利用 SSR 分子标记对杂交后代进行早期鉴定, 旨在为柑橘杂交育种提供参考。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

母本冰糖橙来自湖南省怀化洪江市安江镇, 父本枸橼(*Citrus medica* L.)来自湖南农业大学国家柑橘改良中心长沙分中心。

在枸橼开花前采集花粉, 干燥保存。在冰糖橙花药成熟, 但花朵未开放时, 对母本去雄, 并授以

收稿日期: 2013-08-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071773); “十二·五”国家“863”计划项目(2011AA100205); 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(SCX1202)

作者简介: 张新宇(1972—), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要从事抗病分子研究, 1292333949@qq.com; \*通信作者, Ldazhi@163.com

父本枸橼的花粉,然后套袋防止污染。

## 1.2 方法

### 1.2.1 利用胚抢救技术获得杂交后代

授粉后约 90 d 采收果实。在超净工作台上用 75%的乙醇将果实表面消毒,然后在酒精灯上灼烧,直至果实颜色变黑。用手术刀沿果实赤道面划开一道口子(勿碰伤种子)。取出种子,剥开种皮,将胚分离,置于 MT+1 mg/L GA<sub>3</sub>+10%蔗糖的固体培养基中。待胚成熟后,将胚移入 MT+1 mg/L GA<sub>3</sub>+3%蔗糖的固体培养基中。

### 1.2.2 杂交后代的移栽

将发酵好的营养土进行高温、高压灭菌。在超净工作台上移栽培养皿中的幼苗。用无菌水洗净幼苗根部残留的培养基,将幼苗栽入装有营养土的小塑料盆中。将移栽后的幼苗置于 26℃、相对湿度 80%的组培室生长,待幼苗长出新的叶片后进行炼苗。炼苗成功后,将幼苗移栽到大塑料盆中,置于塑料大棚中生长。

### 1.2.3 亲本和子代基因组 DNA 的提取及浓度检测

参照改良的 CTAB 法,提取亲本叶片和子代幼

苗叶片的基因组 DNA,用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测亲本和子代的基因组 DNA 浓度和纯度。

### 1.2.4 亲本和子代基因组 DNA 的 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测

PCR 反应体系 20 μL,其中 10×PCR Buffer 2 μL, MgCl<sub>2</sub>(20 mmol/L)2 μL, dNTPs(10 mmol/L)0.3 μL, 上游引物(2.5 μmol/L)2 μL, 下游引物(2.5 μmol/L)2 μL, Taq 聚合酶(2 U/μL)0.5 μL, DNA 模板 1.5 μL, 无菌 ddH<sub>2</sub>O 9.7 μL。

PCR 反应程序:94℃预变性 3 min;94℃变性 1 min, T<sub>m</sub> 复性 1 min, 72℃延伸 1 min, 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物置于 4℃冰箱保存。

采用 3.0%的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳,电压 120 V,时间 30 min,利用凝胶成像系统进行拍照和观测。

### 1.2.5 SSR 标记引物的筛选

从 32 对引物(表 1)中筛选出能在亲本间产生特异性位点的引物,然后利用得到的特异性引物对杂交后代的基因组 DNA 进行扩增分析。

表 1 32 对引物组合

Table 1 32 primer combinations

引物编号	正向引物序列(5'-3')	长度/bp	反向引物序列(5'-3')	长度/bp
CAT01	GCT TTC GAT CCC TCC ACA TA	20	GAT CCC TAC AAT CCT TGG TCC	21
AG14	AAA GGG AAA GCC CTA ATC TCA	21	CTT CCT CTT GCG GAG TGT TC	20
CT21	CGA ACT CAT TAA AAG CCG AAA C	22	CAA CAA CCA CCA CTC TCA CG	20
AGC9	TAA AAA CCA ACG TCC CCT CA	20	CGG GCG AGG TAG AAG TAA TG	20
GA18	GGA CCC CTT CAA AGT TTG TTT	21	AAA CGA AAG GAC CCA AGT CA	20
AG16	TGA TGT AGT GGC CGA ATC AA	20	AGC TCC ACG TCA GCT CAA CT	20
TG16	TGT TGC GCA GTT ATT CTC AAA	21	CCG ACC ACT TTT ACC CAC TG	20
AAT12	TTG CCA AGA GAT TAA ACG AAC A	22	GAC GAG AGG TCC AGA AAT CG	20
Cit01	TGA ACA GCC TCA GGT CAA CA	20	CCC TCT CCA ATC TCC TTT CC	20
Cit03	CAC AGC TAA AGC CAG CAC AA	20	GAA GAG ACA GCG GGT AGC AC	20
Cit16	TTT TGT ACG CCT GCT GTT GT	20	AAT TTG TCA TGG CGG GAA T	19
F03	CGA GGA TGA CTC AAG TGA TGA AGA	24	TCT TGG TCT TTG GCT TTT TCT CAG	24
F04	AGT GAA CTG TCC ATT GGA TTT TCG	24	GTG TTG AAT CCC GAC CTT CTA CC	23
F06	TTC ATT TGG AAC AAA ACC CAA TTC	24	GCT GCT AAT CAC AGC ATC AAG AGA	24
FO9	AGC AGT TGT CAT CTT CGG TCA GTT	23	ATA ACC AGC AGG ACC AGT CAC AAT	24
F14	GCT CCT CGA ATG AGA ATG AAA TGA	24	TGG TTG TGC GAA AAT GAA GAG ATA	24
F18	GTC TTC AAC GAA GTT GCA GGC T	22	TAC TAT TTC GAG AGA GCA GCA GCA	24
F21	CTA CAA GTT CCC CAG TTA TCC CG	23	ACT TGA CCC GCT CTA GGA GTG AC	23
TAA15	GAA AGG GTT ACT TGA CCA GGC	21	CTT CCC AGC TGC CAC AAG C	19
CAC33	GGT GAT GCT GCT ACT GAT GC	20	CAA TTG TGA ATT TGT GAT TCC G	22
CT02	ACG GTG CGT TTT GAG GTA AG	20	TGA CTG TTG GAT TTG GGA TG	20
GT03	GCC TTC TTG ATT TAC CGG AC	20	TGC TCC GAA CTT CAT CAT TG	20
CT19	CGC CAA GCT TAC CAC TCA CTA C	22	GCC ACG ATT TGT AGG GGA TAG	21
CTT01	TCA GAC ATT GAG TTG CTC G	19	TAA CCA CTT AGG CTT CGG CA	20
CAG01	AAC ACT CGC ACC AAA TCC TC	20	TAA ATG GCA ACC CCA GCT TTG	21
CAGG9	AAT GCT GAA GAT AAT CCG CG	20	TGC CTT GCT CTC CAC TCC	18
TAA27	GGA TGA AAA ATG CTC AAA ATG	21	TAG TAC CCA CAG GGA AGA GAG C	22
TAA41	AGG TCT ACA TTG GCA TTG TC	20	ACA TGC AGT GCT ATA ATG AAT G	22
CAC23	ATC ACA ATT ACT AGC AGC GCC	21	TTG CCA TTG TAG CAT GTT GG	20
CAC15	TAA ATC TCC ACT CTG CAA AAG C	22	GAT AGG AAG CGT CGT AGA CCC	21
CAC39	AGA AGC CAT CTC TTC TGC TGC	21	AAT TCA GTC CCA TTC CAT TCC	21
TAA33	GGT ACT GAT AGT ACT GCG GCG	21	GCT AAT CGC TAC GTC TTC GC	20

1.2.6 杂交后代的鉴定

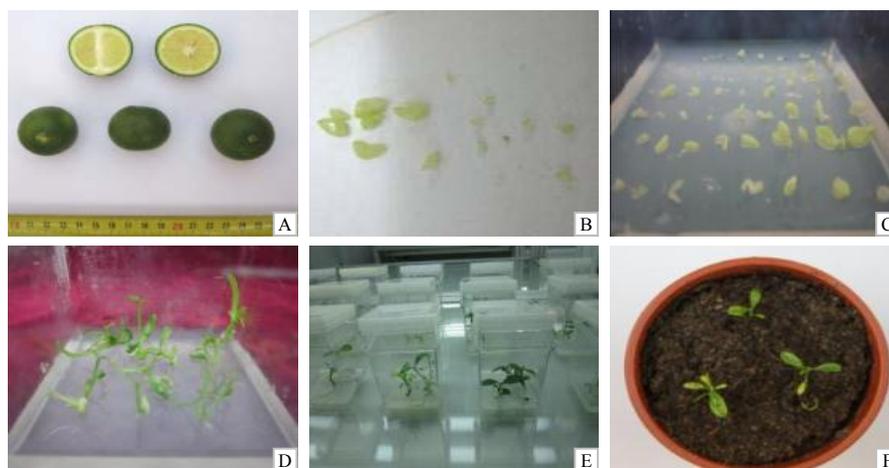
参照文献[12],用筛选出的多态性高、能在亲本间产生特异性位点的引物对杂交后代进行鉴定:杂交后代 SSR 带谱中的条带均来自父本和母本,没有杂带出现,并具有父本的特异性条带时,判断这个杂交后代为真杂种。

2 结果与分析

2.1 冰糖橙与枸橼的杂交授粉和胚抢救结果

以枸橼为父本,对母本冰糖橙授粉 5 000 朵花,

结果 502 个,座果率为 10.04%,明显高于理论座果率,其原因可能是授粉提高了座果率,或是父、母本之间的亲和性较好。剥离其中的 121 个果实,得到 330 粒种子,获得 2 217 个胚,单种子平均胚数为 6.72 个,可见,冰糖橙×枸橼的种子具有多胚性。2 217 个胚经过胚抢救(图 1),获得 547 株幼苗,成苗率为 24.67%。炼苗和移苗(图 1)后经过 4 个月的生长,最终得到杂交后代 359 株,成活率为 65.63%。胚的死亡原因可能是操作失误,或是培养过程中长霉导致,也可能是胚较弱小,不易成苗。



A 授粉后90 d采收的杂交果实;B 分离的杂种胚;C 在MT培养基上培养8 d的杂种胚;D 在MT培养基上培养21 d的杂种胚;E 在MT培养基上培养50 d的杂种胚;F 第一次移栽的幼苗。

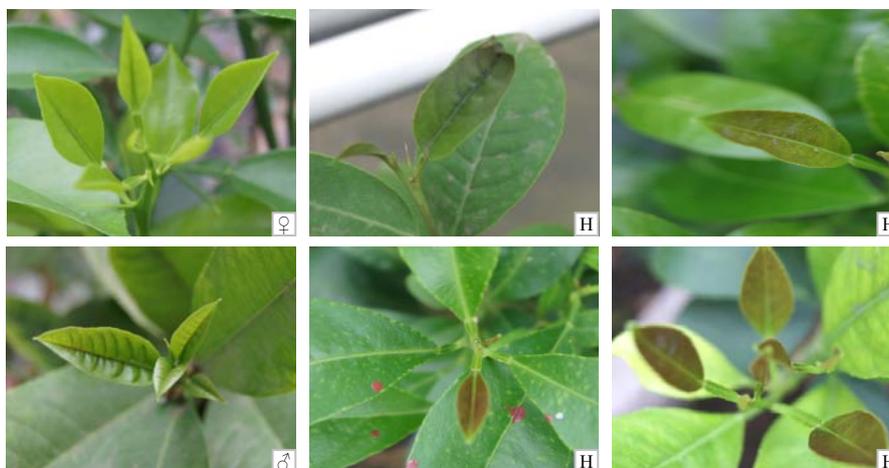
图 1 冰糖橙×枸橼的果实、分离及培养过程中的杂种胚、移栽的幼苗

Fig. 1 Fruits, hybrid embryos in the process of isolation and culture and transplanted seedlings of sweet orange and citron

2.2 冰糖橙与枸橼杂交后代的形态学观察

珠心苗与合子苗的主要差异是新梢颜色。父本枸橼的新梢颜色为紫红色,冰糖橙则为嫩绿色,6

株杂交后代出现了深浅不同的紫红色,可初步认定这 6 株杂交后代为合子苗(图 2)。



♀ 冰糖橙;♂ 枸橼;H 杂交后代。

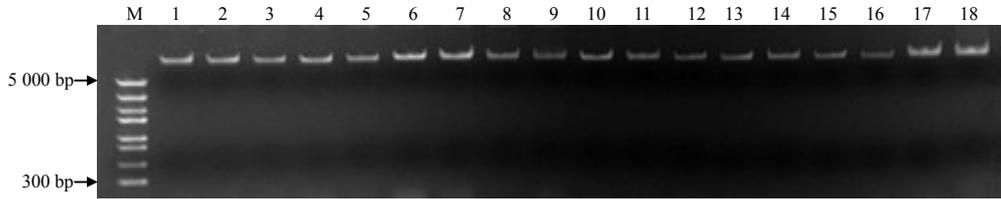
图 2 父、母本及杂交后代的新梢

Fig. 2 New shoots of parents and hybrid offspring

### 2.3 DNA 的提取和特异引物的筛选结果

提取的各材料基因组 DNA 条带大小一致, 没有蛋白质和 RNA 污染(图 3), 可用于后续试验。利用 32 对引物对冰糖橙和枸橼的基因组 DNA 进行

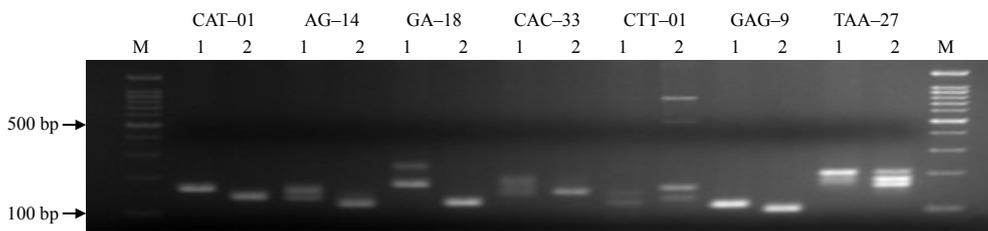
PCR 扩增, 从中筛选出 CAT01、AG14、GA18、CAC33、CTT01、CAGG9 和 TAA27 等共 7 对重复性好、多态性高的引物(图 4)。



M Trans 5 kb DNA Marker ; 1-18 子代。

图 3 DNA 检测结果

Fig. 3 DNA detection



M Trans 100 bp Plus I DNA Ladder ; 1 母本 ; 2 父本。

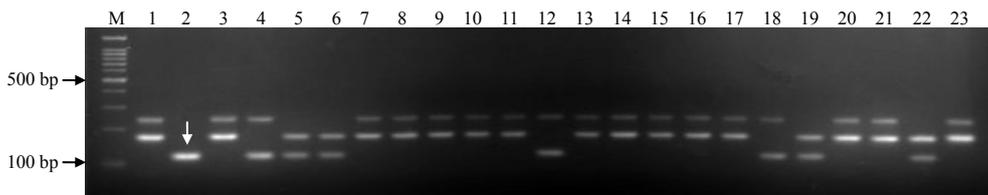
图 4 亲本对 SSR 引物的筛选结果

Fig. 4 Screened results of parents to SSR primers

### 2.4 杂交后代的鉴定结果

在用引物 GA-18 对枸橼杂种后代进行鉴定时, 子代 4、5、6、12、18、19、22 出现了父本的特异性条带(图 5); 用引物 CAT-01、AG-14 进行鉴定时, 子代 4、5、6、12、18、19、22 同样出现了父本的

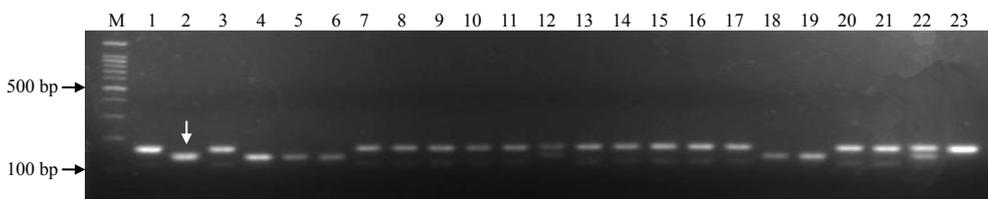
特异性条带(图 6、7), 由此可确定子代 4、5、6、12、18、19、22 为合子苗。最终从 359 株杂交后代中鉴定出合子苗 12 株。在形态学上发生颜色变化的 6 株杂交后代, 经分子标记鉴定皆为合子苗。此外, 还鉴定出 6 株未发生形态学变化的杂交后代为合子苗。



M Trans 100 bp Plus I DNA Ladder ; 1 母本 ; 2 父本 ; 3-23 子代。箭头示父本特异性条带。

图 5 引物 GA-18 对杂交后代的 SSR 检测结果

Fig. 5 Test results of SSR fingerprint amplified with primer GA-18 in hybrids



M Trans 100 bp Plus I DNA Ladder ; 1 母本 ; 2 父本 ; 3-23 子代。箭头示父本特异性条带。

图 6 引物 CAT-01 对杂交后代的 SSR 检测结果

Fig. 6 Test results of SSR fingerprint amplified with primer CAT-01 in hybrids

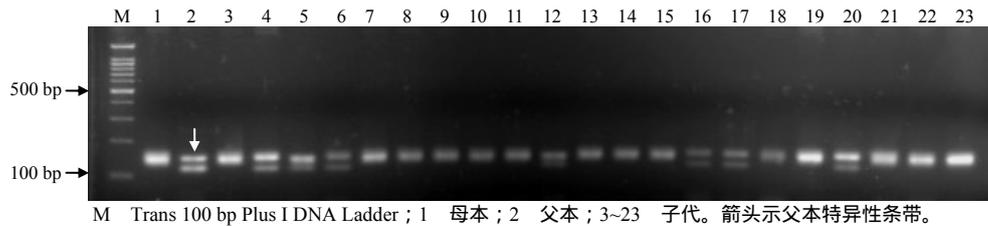


图 7 引物 AG-14 对杂交后代的 SSR 检测结果

Fig.7 Test results of SSR fingerprint amplified with primer AG-14 in hybrids

### 3 结论与讨论

a. 有性杂交和胚抢救。湖南的柑橘种质资源丰富，地方性良种多，为柑橘的杂交育种提供了便利条件。由于冰糖橙具有多胚性，多数无性胚在生长过程中竞争有性胚的营养，造成有性胚的生长较弱或死亡。本试验中利用胚抢救技术获得了 359 株杂交后代，可见，胚抢救技术能提高柑橘育种效率，加快杂交育种进程。

b. 冰糖橙×枸橼杂交后代的 SSR 鉴定。目前，SSR 分子标记已广泛应用于遗传图谱的构建、遗传多样性分析和杂种鉴定。韩国辉等<sup>[13]</sup>利用 SSR 分子标记鉴定了柑橘 2 个不同杂交组合的子代，鉴定率分别达 99.04% 和 100%。刘梦培等<sup>[14]</sup>利用 6 对 SSR 引物对华仁杏的杂交后代进行了鉴定，鉴定率达 91.25%，说明利用 SSR 分子标记进行杂种的早期鉴定是切实可行的。本试验中利用 SSR 引物 GA-18、CAT-01 和 AG-14 对 359 株杂交后代进行鉴定，最终鉴定出合子苗 12 株。

#### 参考文献:

- [1] 曾柏全, 甘霖, 熊兴耀, 等. 冰糖橙和冰糖脐橙的性状研究[J]. 广西园艺, 2006(2): 3-4.
- [2] 胡青波. 柑橘种质资源抗溃疡病评价[D]. 长沙: 湖南农业大学园艺园林学院, 2010.
- [3] 单杨, 何建新, 付复华, 等. 湖南省柑橘产业的发展现状、对策与前景[J]. 湖南农业科学, 2003(5): 58-61.
- [4] 罗君琴, 王宏祥. 农用链霉素 WP 防治柑橘溃疡病的药效试验[J]. 浙江柑橘, 2000(4): 44.
- [5] 张洪波, 巢进, 王跃强, 等. 柑橘溃疡病拮抗菌的分离筛选及其田间防效[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2007, 33(5): 605-607.
- [6] 雷邦海. 冰糖橙溃疡病防治的几点经验[J]. 广西热带农业, 2006(3): 12.
- [7] 何秀玲, 袁红旭. 柑橘溃疡病防治措施的研究现状[J]. 现代农业科技, 2007(15): 80-81.
- [8] Deng Z N, Li D Z. Screening citrus genotypes for resistance to canker disease (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)[J]. Plant Breeding, 2010, 129: 341-345.
- [9] 伊华林, 邓秀新, 付春华. 胚抢救技术在果树上的应用[J]. 果树学报, 2001(4): 224-228.
- [10] Scarano M T, Tusa N, Abbate, et al. SSR and modified AFLP markers for the identification of zygotic plantlets in backcross between 'Femminelo' lemon hybrids (2n and 4n) and a diploid clone of 'Femminelo' lemon (*Citrus limon* L. Burm. F.) tolerant to mal secco disease[J]. Plant Science, 2003, 164: 1009-1017.
- [11] Antonio Carlos de Oliveira, Garcia A N, Cristofani M, et al. Identification of *Citrus hybrids* through the combination of leaf apex morphology and SSR markers [J]. Euphytica, 2002, 128: 397-403.
- [12] 桃联安, 楚连璧, 经艳芬, 等. 云南割手密 82-114 种间杂交后代 SSR 分子标记鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2009(1): 132-135.
- [13] 韩国辉, 向素琼, 汪卫星, 等. 沙田柚杂交后代群体的 SSR 鉴定与遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2010(22): 4678-4686.
- [14] 刘梦培, 傅大立, 李芳东, 等. 华仁杏杂种鉴定及遗传变异分析[J]. 林业科学研究, 2012(1): 88-92.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库