

原生质体电融合再生柑橘属间 四倍体体细胞杂种

刘继红, 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)

Production of Tetraploid Intergeneric Somatic Hybrid Plants Via Protoplast Electro fusion in Citrus

Liu Jihong, Deng Xiuxin

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

Abstract: Mesophyll protoplasts of Changshou kumquat (*Fortunella obovata*) were fused electrically with embryogenic protoplasts of Dancy tangerine (*Citrus reticulata*). Plants were obtained after culture of the fusion-treated protoplasts. Cytological examinations showed that the plants were tetraploids with 36 chromosomes. RAPD analysis indicated that the plants had bands specific to the fusion partners in the primers (OPA-04 and OPA-07) chosen for verifying hybridity of the plants. The results demonstrated that tetraploid intergeneric somatic hybrid plants have been recovered by fusion of protoplasts between kumquat and citrus.

Key words: *Fortunella obovata*; Citrus; Protoplast; Electrofusion; Somatic hybrids

关键词: 金柑; 柑橘; 原生质体; 电融合; 体细胞杂种

中图分类号: S666; Q343 文献标识码: A 文章编号: 0578-1752(2000)02-0098-03

自 Ohgawara 等(1985)得到枳与 *Trovita* 甜橙属间体细胞杂种植株近 15 年来, 已得到了约 150 例柑橘体细胞杂种^[3], 其中有种、属间有性和嫁接亲和的组合, 也有有性和嫁接均不亲和的属间、族间组合。这些体细胞杂种的获得, 丰富了柑橘的种质资源库, 为育种提供了可供选择和利用的新型试材。本文报道的是最近获得的一例金柑与柑橘属间体细胞杂种。

1 材料与方 法

1.1 材 料

丹西红橘(*Citrus reticulata*)愈伤组织悬浮系继代 3 次后, 于第 7~ 10 天时取愈伤组织

收稿日期: 1999-07-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39625017)

作者简介: 刘继红(1971-), 男, 湖北罗田人, 讲师, 博士, 从事生物技术教学与科研工作。

分离原生质体; 长寿金柑 (*Fortunella obovata*) 种子播种于 MT 基本培养基(含 30g/L 蔗糖和 0.7% 琼脂)中, 播种后 20~30d 左右取充分展开的叶片分离叶肉原生质体。

1.2 方法

吸取 1g 左右愈伤组织放入 15mm × 60mm 培养皿中, 加入 1.5ml 酶液(1% 纤维素酶 Onozuka R-10+ 2% 果胶酶 Serva+ 12.8% 甘露醇+ 0.12% MES+ 0.36% CaCl₂, pH 5.6, 过滤灭菌)和等体积的 0.7ml/L EME 培养基[MT+ 0.5g/L 麦芽提取物(ME) + 240g/L 蔗糖], 28℃ 放在低速(26r/min)摇床上酶解 20h。将叶片切成 1~2mm 宽的小条后放入 25ml 三角瓶中, 酶液组成及酶解条件同愈伤组织。原生质体纯化方法参照 Grosser 等^[4]的方法。

融合方式为电场诱导融合, AC 为 75V/cm, 作用时间 60s; DC 为 1250V/cm, 5 次脉冲, 间隔时间 1s。采用液体浅层培养方法培养原生质体。待细胞团长到肉眼可见时, 转入 EME₅₀₀ 培养基(MT+ 500mg/L ME+ 50g/L 蔗糖+ 0.7% 琼脂), 长出的胚状体转入 EME₁₅₀₀ 培养基(MT+ 1500mg/L ME+ 50g/L 蔗糖+ 0.7% 琼脂), 生芽培养基为 MT + 0.1mg/L NAA + 0.5mg/L BA + 0.5mg/L KT + 25g/L 蔗糖+ 0.7% 琼脂。生根培养基为 1/2MT + 0.1mg/L IBA + 0.5mg/L NAA + 0.5g/L 活性炭+ 25g/L 蔗糖+ 0.7% 琼脂。再生植株染色体检查、DNA 提取、PCR 扩增和电泳检测与以前的报道相同^[1]。

2 结果与分析

2.1 融合再生植株

电场诱导的原生质体融合产物培养到第 7~10 天时, 原生质体恢复第 1 次分裂, 随着培养过程的进行, 分裂的细胞不断增多, 第 20 天时能观察到多细胞团, 此时应及时加入新鲜培养基, 以降低培养液的渗透压。30d 左右就能出现肉眼可见的小愈伤组织。待其长到 1~2mm 大小时, 转至 EME₅₀₀ 培养基。30d 左右长出绿色胚状体, 胚状体转至 EME₁₅₀₀ 培养基后迅速长大, 将长到子叶期的胚状体转入生芽培养基, 切下再生出的丛芽转入生根培养基, 20~30d 就可以长出根, 得到完整植株(图版-1)。本组合得到近 20 棵再生植株, 目前均已移入温室, 生长良好。再生植株叶片长椭圆形, 形状与长寿金柑相似, 但叶尖形状与丹西红橘相似, 表现出杂种的特点, 叶片具有翼叶(图版-5)。

2.2 再生植株的倍性分析

从再生植株中选取 4 棵进行染色体检查, 结果表明它们都具有 36 条染色体(图版-2), 是四倍体($2n=4x=36$)植株。

2.3 再生植株杂种特性分析

根据本室以往的研究结果, 挑选 2 个 10-mer 随机引物(OPA-04 和 OPA-07)对已完成倍性检查的 2 棵植株进行杂种特性分析。2 个引物都能将长寿金柑和丹西红橘区分开, 从引物 OPA-04 的扩增带型图中可以看出, 2 棵植株都具有双亲的特征带, 其带型为双亲之和(图版-3), 表明这 2 棵植株具有融合亲本的遗传物质, 为杂种起源; 它们的杂种特性为引物 OPA-07 的扩增带型进一步证实, 在其扩增带型图中, 2 棵植株也都具有双亲的特征带(图版-4), 但丹西红橘有 2 条特征带在再生植株中未出现。

结合细胞学和 RAPD 分析的结果, 可以看出所分析的 2 棵植株是长寿金柑和丹西红橘的属间四倍体体细胞杂种。

3 讨论

长寿金柑具有多胚特性,丹西红橘也是高度多胚品种,由于无性胚的干扰,通过有性杂交很难得到二者间真正的杂种。本研究通过原生质体融合技术成功地获得它们的体细胞杂种,进一步说明体细胞杂交在柑橘遗传改良上具有很大的应用潜力。柑橘异源四倍体体细胞杂种在育种上的应用之一是作为父本用于倍性育种,与单胚二倍体品种杂交,以培育三倍体无籽品种^[5]。本研究获得的异源四倍体体细胞杂种为这一工作的开展提供了可供选择和利用的父本材料。

RPAD 标记是鉴定体细胞杂种的有效手段,本研究应用此技术也成功地鉴定了融合再生植株的杂种特性。在所试用的 2 个引物中,再生植株之间带型一致,基本上都是双亲之和,只在 OPA-07 引物中有一定的区别,这一现象在以往也已有所报道,可能是杂种植株中亲本基因组 DNA 发生重组,使与引物结合的位点发生变化所致^[2]。

参考文献:

- [1] 刘继红,胡春根,邓秀新. 澳洲指橘与柑橘属间原生质体电融合再生二倍体体细胞杂种(英文)[J]. 植物学报. 1999, 41(11): 1177~ 1182.
- [2] 李文彬,梁红健,孙勇如,等. RAPD 鉴定栽培稻与野生稻体细胞杂种[J]. 生物工程学报. 1996, 12(4): 390~ 393.
- [3] Grosser J W, Mourao-Fo F A A, Gmitter F G Jr, et al. Allotetraploid hybrids between citrus and seven related genera produced by somatic hybridization[J]. Theor. Appl. Genet. 1996, 92: 577~ 582.
- [4] Grosser J W, Gmitter F G Jr. Protoplast fusion and citrus improvement[J]. Plant Breed Rev. 1990, 8: 339~ 374.
- [5] Oiyama I, Kobayashi S, Yoshinaga K, et al. Use of pollen from a somatic hybrid between *Citrus* and *Poncirus* in the production of triploid[J]. Hort Sci. 1991, 26(8): 1082.

欢迎订阅 欢迎投稿

《中国农业科学》是中国农业科学院主办的国家级综合性农牧业科学学术刊物,是国内外重要数据库和文摘刊物收录文献源的重点核心期刊。主要刊登我国农牧业科学在应用基础和高新技术研究方面的学术论文,重要科研成果的专题报告,各学科研究的新进展和综合评述等。读者对象是国内外农牧业科研工作者、院校师生及农业生产领导干部。本刊为双月刊,国内外公开发行,16开,112页,每期定价15元,2000年编辑出版增刊1期。全年共出版7期,定价105元。国内统一刊号:CN 11-1328/S,邮发代号:2-138,国外代号:BM 43。漏订者可直接与编辑部联系补购。本刊还热忱欢迎广大科研单位及有关企业在我刊刊登广告,广告经营许可证:京海工商广字第0256号。

《中国农业科学》精选论文集(1999年英文版)由本刊编辑委员会编辑,2000年2月由中国农业科技出版社出版。16开本,20余万字,每册定价10元。另外,编辑部还有1999年增刊少量,为了使您的资料保存完整,请从速购买,每册10元(免收邮费)。本刊编辑部负责发行邮购。订阅者请汇款至《中国农业科学》编辑部购买。

地址 100081 北京白石桥路30号

电话 (010)68919808 68976244