

# 沙田柚 (2x) × 柑橘异源体细胞杂种 NS (4x) 的三倍体后代遗传分析

宋健坤, 朱世平, 谭美莲, 郭文武, 邓秀新\*

(华中农业大学园艺林学学院, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 用两对 SSR 引物 TAA1 和 TAA3 对以二倍体沙田柚为母本, 体细胞杂种 NS (Nova 橘柚 + Succari 甜橙) 为父本, 通过有性杂交和胚挽救获得的 79 株三倍体后代群体的带型和分离情况进行了分析。结果发现 TAA1 引物和 TAA3 引物在后代群体中分别扩增出 5 种带型和 4 种带型, 子代带型分别符合 4:1:1:5:1 和 2:2:1:1 的分离比例, 与根据孟德尔遗传规律推导的双二倍体的分离比例相吻合, 初步表明柑橘异源四倍体体细胞杂种减数分裂行为类似于双二倍体。

**关键词:** 柑橘; 异源四倍体体细胞杂种; SSR 标记; 遗传分析; 三倍体后代; 双二倍体

**中图分类号:** S 666

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 06-1021-06

## Genetic Analysis of Triploid Progenies from Shatian Pummelo (2x) × Citrus Allotetraploid Somatic Hybrid NS (4x)

SONG Jian-kun, ZHU Shi-ping, TAN Mei-lian, GUO Wen-wu, and DENG Xiu-xin\*

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology (Ministry of Education), College of Horticulture & Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Two pairs of SSR (simple sequence repeat) primers TAA1 and TAA3 were used to detect the band patterns and segregation ratios among the 79 triploid progenies derived from the sexual cross between diploid *Citrus grandis* (L.) Osbeck ‘Shatian’ pummelo and somatic hybrid NS [ (*C. reticulata* Blanco × *C. paradisi* Macf.) ‘Nova’ tangelo + *C. sinensis* (L.) Osbeck ‘Succari’ sweet orange] by embryo rescue technology. Five and four band patterns were generated from the TAA1 and TAA3 primers at the ratio of 4:1:1:5:1 and 2:2:1:1 respectively, as was in good accordance with the segregation ratio of amphidiploid deduced by the law of Mendel. The results preliminarily indicated that the meiosis behavior of citrus allotetraploid somatic hybrid was similar to that of the amphidiploid.

**Key words:** citrus; allotetraploid somatic hybrid; SSR marker; genetic analysis; triploid progeny; amphidiploid

无籽是柑橘的一项优良品质。三倍体由于减数分裂不正常, 导致花粉和胚囊高度不育, 从而产生无核果实。柑橘多数品种具有单性结实能力, 因此, 培育三倍体成为获得无核品种的一条有效途

收稿日期: 2012-01-04; 修回日期: 2012-05-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30921002); 国家 ‘863’ 计划课题 (2011AA100205)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xxdeng@mail.hzau.edu.cn)

径。利用细胞工程产生的柑橘异源四倍体体细胞杂种与二倍体杂交培育三倍体是近 10 多年来国际柑橘育种的重要趋势, 深入研究体细胞杂种的性状遗传规律有助于更好地利用体细胞杂种作为亲本与二倍体杂交来获得三倍体柑橘植株, 为今后的育种工作提供指导。

自然界中天然存在的四倍体亲本比较少, 柑橘体细胞融合技术的发展为三倍体育种提供了大量的四倍体亲本, 并且这些体细胞杂种一般都有较高的育性 (Kobayashi et al., 1991, 1995)。因此, 用体细胞杂种与二倍体杂交获得三倍体的工作已经在很多国家开展, 如美国佛罗里达大学已经获得了 2 000 多株三倍体柑橘植株, 有的已经表现出无籽并且品质优良 (Grosser & Gmitter, 2011)。目前, 对体细胞杂种与二倍体杂交后代遗传规律的研究还比较少, 这可能是因为四倍体与二倍体杂交, 其后代的分离情况非常复杂, 特别是异源四倍体作亲本时后代的分离情况更加复杂。如 Scarano 等 (2003) 用四倍体的 ‘Femminello’ 柠檬的胞质杂种与一个二倍体的 ‘Femminello’ 柠檬品种 [*Citrus limon* (L.) Burm. F.] 杂交, 用 SSR 对后代进行鉴定, 后代中出现了 4 种分离的基因型, 由于后代只有 6 株三倍体, 群体很小, 无法进行统计分析, 尚未得出结论。体细胞杂种是由两个二倍体细胞融合而来的, 一般来说, 在新创造的异源四倍体体细胞杂种中来自双亲的核基因不会发生遗传分离与重组, 双亲中由显性基因及共显性基因控制的性状一般会在体细胞杂种中表达 (Guo et al., 2002)。Yi 和 Deng (2007) 用 RAPD 分子标记对柑橘二倍体与异源四倍体体细胞杂种杂交后代的遗传规律进行了研究, 认为以有性后代群体为分析对象, 不仅父本与母本的特异标记数是随机传递给后代的, 并且父本融合双亲的特异标记也是随机传递给后代的, 总体上遵循 1:1 的分配规律。

RAPD 标记是显性标记, 有时候会发生部分遗传信息的丢失, 而用共显性的分子标记如 SSR, 在对杂交后代的研究中能获得更多的遗传信息, 因此, 更适合用于杂交后代的遗传研究。本课题组曾在 2002 年用柑橘异源四倍体体细胞杂种 NS 作父本, 与中国特有的地方品种沙田柚杂交, 获得了 100 多株三倍体植株 (宋健坤 等, 2005)。本试验中用共显性分子标记 SSR 对这个杂交群体部分植株的遗传规律进行了研究, 希望能对体细胞杂种后代的遗传规律有一个初步认识, 同时弄清楚柑橘异源四倍体体细胞杂种的减数分裂行为是否与双二倍体类似, 为以后的育种工作提供指导。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

2002 年通过有性杂交和胚挽救技术获得了 79 株柑橘三倍体后代, 将这些三倍体植株以及它们的母本二倍体沙田柚 [*Citrus grandis* (L.) Osbeck ‘Shatian’] 和父本四倍体体细胞杂种 NS {Nova 橘柚 [ (*C. reticulata* Blanco × *C. paradisi* Macf.) ‘Nova’ ] + Succari 甜橙 [*C. sinensis* (L.) Osbeck ‘Succari’ ]} 作为材料, 进行遗传分析。

### 1.2 DNA 的提取与 SSR 扩增

DNA 的提取方法参考 Cheng 等 (2003) 的方法。

SSR 分析参照 Kijas 等 (1997) 和 Pang 等 (2003) 的方法并适当修改。PCR 扩增采用 20  $\mu$ L 反应体系, 包括 80 ng 模板 DNA, 1  $\times$  反应缓冲液, 200  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP, 1.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 1 U *Taq* 酶 (Promega 公司生产), 0.1  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 正向引物, 0.1  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 反向引物, 灭菌的超纯水。在 PTC-200 PCR 仪 (MJ. Research Inc., USA) 中进行扩增反应。具体步骤为: 94  $^{\circ}$ C 变性 5 min; 紧跟着 30 个循环: 94  $^{\circ}$ C 1 min, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min; 最后 72  $^{\circ}$ C 5 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。扩增产物先在 1% 琼脂糖胶上检测扩增效果, 扩增出来后, 将扩增产物加热煮沸变性, 在 6% (质量体积比) 聚丙烯酰胺凝

胶上电泳 1.5 h, 变性胶显色参照 Promega 公司的说明书进行银染。

表 1 SSR 引物的序列

Table 1 Simple sequence repeat primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')	备注 Comments	参考文献 Reference
TAA1	a-GACAACATCAACAACAGCAAGAGC b-AAGAAGAAGAGCCCCATTAGC	核引物 Nuclear primer	Kijas et al., 1997
TAA3	a-AGAGAAGAAACATTTGCGGAGC b-GAGATGGGACTTGGTTCATCACG	核引物 Nuclear primer	Kijas et al., 1997

### 1.3 遗传分离比例的适合性测验

用  $\chi^2$  来测验所得实际结果是否与孟德尔遗传的分离比例相符。当  $\chi^2 < \chi^2_{0.05,v}$  说明分离比例与理论值符合,  $\chi^2 > \chi^2_{0.05,v}$  说明分离比例与理论值不符合 (盖钧镒, 2000)。

## 2 结果与分析

### 2.1 TAA1 引物扩增结果分析

用 TAA1 引物对沙田柚 × NS 组合的双亲和 79 个子代群体的扩增结果显示, TAA1 引物在双亲上共扩增出 3 条带: TAA1-1、TAA1-2 和 TAA1-3。TAA1-1 带为母本沙田柚所特有, TAA1-3 带为父本 NS 所特有, TAA1-2 为双方共有的带; 后代 79 个子代在这 3 条带上出现了不同程度的分离组合, 一共出现了 5 种类型的带型, 分别为  $\equiv \equiv \equiv \equiv \equiv$ , 如图 1 中 2、9、1、3 和 20 单株 (箭头) 所示, 数量分别为 28、4、9、35 和 3 株。

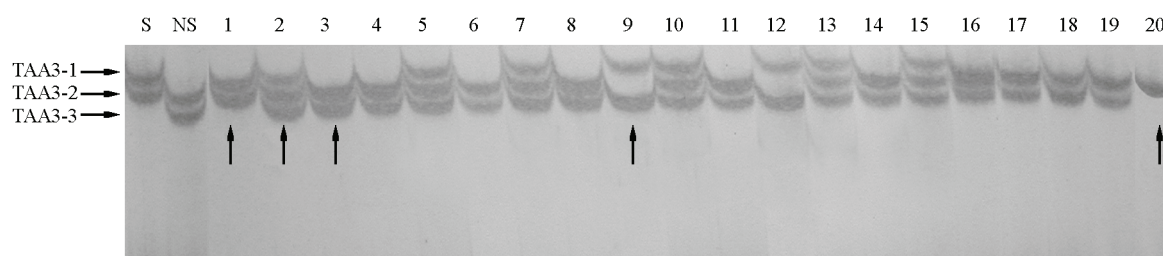


图 1 TAA1 引物对沙田柚 × NS 组合部分扩增结果

S: 沙田柚; NS: 体细胞杂种; 1~20: 子代。箭头所示为 5 种带型。

Fig. 1 The partial SSR results of Shatian pummelo × NS amplified by TAA1

S: Shatian pummelo; NS: Somatic hybrid; 1 - 20: Progenies. Five band patterns were showed by arrows.

根据这 3 条带的变化规律可以看出, 3 条带属于同一个基因座位。SSR 是共显性的分子标记, 显性和隐性基因都会在带型上表现出来, 从图 1 可以看出父、母本具有一条相同的带, 并各有一条不同的特征带, 推测父、母本可能具有一个相同的隐性基因位点, 母本沙田柚具有一个显性基因位点, 由于 NS 是由两个二倍体融合而来的, 它除了具有一个隐性基因位点外, 还有另外一个与母本不同的显性基因位点, 类似于复等位基因。如果假定 TAA1-1 带由显性的  $A_1$  基因产生, TAA1-2 带由隐性  $a$  基因产生, TAA1-3 带由另外的显性  $A_2$  基因产生, 那么根据父、母本的带型可以推测父、母本在这个座位上的基因型可能为:  $A_1a$  (母本沙田柚) ×  $aaA_2A_2$  (父本 NS)。杂交时二倍体的母本

可以形成两种类型的配子，配子比为  $1 A_1 : 1 a$ ；四倍体父本的分离情况比较复杂，如果 4 条同源染色体在第一次减数分裂后期两两分离，染色体随机组合，则可以产生 3 种类型的配子，配子比为  $4 A_2a : 1 A_2A_2 : 1 aa$ 。二者杂交可以产生 6 种不同的基因型，基因型的比例为： $4 A_1A_2a : 1 A_1A_2A_2 : 1 A_1aa : 4 A_2aa : 1 A_2A_2a : 1 aaa$ ，因为基因型  $A_2aa$  和  $A_2A_2a$  具有相同的表现型，因此这 6 种基因型就表现为 5 种带型，分别为： $\equiv$  ( $A_1A_2a$ )， $\equiv$  ( $A_1A_2A_2$ )， $\equiv$  ( $A_1aa$ )， $\equiv$  ( $A_2aa + A_2A_2a$ )， $\equiv$  ( $aaa$ )，杂交后代带型的理论比值应为： $4 : 1 : 1 : 5 : 1$ ，而 79 个子代在这 5 种带型上实际数量比为  $28 : 4 : 9 : 35 : 3$ 。假设子代的分离比符合所推断的理论比值，进行分离比例的适合性测验得到  $\chi^2 = 4.09 < \chi^2_{0.05} = 9.49$  ( $v = 4$ )，说明后代群体在这个位点上的带型的确是按  $4 : 1 : 1 : 5 : 1$  的比例分离的，因此对父、母本基因型的推断是正确的。

## 2.2 TAA3 引物扩增结果分析

用另外一对 SSR 引物 TAA3 对沙田柚  $\times$  NS 组合同样的群体进行了扩增，结果发现母本沙田柚只扩出 1 条带 TAA3-3，父本 NS 具有 3 条带：TAA3-1、TAA3-2 和 TAA3-3，其中 TAA3-1 和 TAA3-2 为父本所特有，TAA3-3 是双亲共有的带；后代的 79 个单株在 NS 的特征带 TAA3-1 和 TAA3-2 上也出现了分离，一共表现为 4 种带型，分别为  $\equiv$   $\equiv$   $\equiv$   $\equiv$ ，如图 2 中 15、2、9 和 21 单株（箭头）所示，数量分别是 14、25、29 和 11 株。

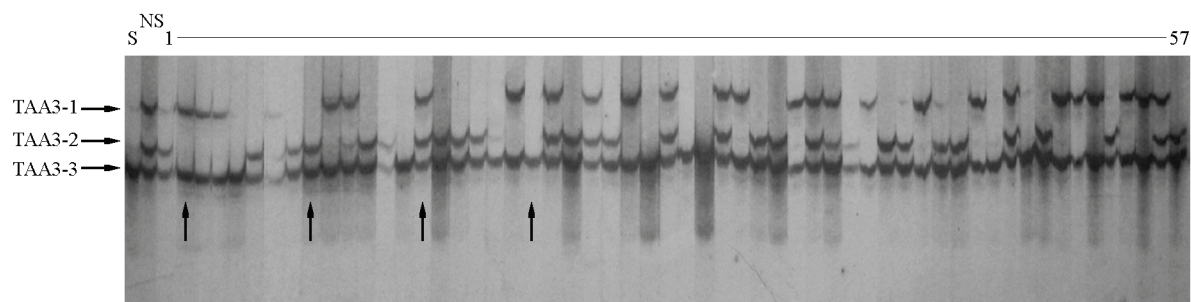


图 2 TAA3 引物对沙田柚  $\times$  NS 组合同样部分 SSR 扩增结果

S: 沙田柚; NS: 体细胞杂种; 1~57: 子代。箭头所示为 4 种带型。

Fig. 2 The partial SSR results of Shatian pummelo  $\times$  NS amplified by TAA3

S: Shatian pummelo; NS: Somatic hybrid; 1 - 57: Progenies.

Four band patterns were showed by arrows.

从图 2 可以看出，体细胞杂种 NS 相对母本具有两条特征带，鉴于 NS 是两个体细胞融合来的，推测这两条特征带应该是由体细胞杂种中两个二倍体基因组中的显性基因分别产生的。如果将父、母本共有的带 TAA3-3 设定为由隐性基因  $a$  产生，TAA3-1 由显性基因  $A_1$  产生，TAA3-2 由显性基因  $A_2$  产生，杂交组合基因型应该为： $aa$  (母本沙田柚)  $\times$   $A_1A_2aa$  (父本 NS)。父本  $A_1A_2aa$  减数分裂时如果是两两分离，随机组合，则可以产生 4 种配子，配子比为： $2 A_1a : 2 A_2a : 1 A_1A_2 : 1 aa$ ；母本  $aa$  可以产生 1 种配子： $a$ 。二者杂交可以产生 4 种基因型，基因型的比例为： $2 A_1aa : 2 A_2aa : 1 A_1A_2a : 1 aaa$ ，这 4 种基因型对应的带型应该为： $\equiv$  ( $A_1aa$ )， $\equiv$  ( $A_2aa$ )， $\equiv$  ( $A_1A_2a$ )， $\equiv$  ( $aaa$ )，理论分离比例是  $2 : 2 : 1 : 1$ ，而 79 个子代在这 4 种带型上的实际数量比是  $25 : 29 : 14 : 11$ 。假设子代的分离比符合所推断的理论比值，进行分离比例的适合性  $\chi^2$  测验得到  $\chi^2 = 0.75$ ，远远小于  $\chi^2_{0.05} = 7.81$  ( $v = 3$ )，说明后代在这个基因座位上的分离比例与理论上的分离比例吻合度很高，也说明对杂交组合基因型的解释是正确的。

### 3 讨论

二倍体沙田柚与四倍体体细胞杂种 NS 杂交, 其后代的分离规律相当复杂, 在本试验中杂交后代分别出现了近 4:1:1:5:1 和 2:2:1:1 的分离比例, 这种分离比例与父母本的基因型密切相关。试验中推测父母本在 TAA1 和 TAA3 两对引物扩增位点上的基因组合分别是  $A_1a$  (母本沙田柚) ×  $aaA_2A_2$  (父本 NS) 和  $aa$  (母本沙田柚) ×  $A_1A_2aa$  (父本 NS)。由于父本是两个二倍体细胞融合来的, 体细胞杂种实际上是两个基因组的复合体, 父本在 TAA1 位点上的基因型也可以表示为: ( $aa + A_2A_2$ ), 在 TAA3 位点上为 ( $A_1a + A_2a$ )。而且在 TAA1 位点上, 父本显性基因  $A_2$  与母本沙田柚的显性基因明显不同, 推测  $A_2$  应该是由融合亲本中与沙田柚亲缘关系较远的亲本基因组提供的, 至于具体是哪个融合亲本提供需要通过对 ‘Nova’ 橘柚、‘Succari’ 甜橙和沙田柚的亲缘关系进行详细研究才能确定。在 TAA3 位点上 ‘Nova’ 与 ‘Succari’ 虽然显性位点不同, 但它们都具有相同的隐性位点, 因此, 表现为一种类似复等位基因的关系, 遗传规律符合传统的孟德尔遗传规律。

对于同源四倍体减数分裂的时候, 4 套染色体除了形成 2/2 配对外, 也有可能形成 3/1 联会, 这样杂交后代基因的分离情况就非常复杂。本试验对杂种后代分离比例的推导是以 NS 染色体 2/2 分离为前提的, 从两对引物的扩增结果可以看出, 杂种后代的分离比例与推导的理论比例都比较吻合, 说明体细胞杂种 NS 在第一次减数分裂后期, 4 套染色体的确是两两分离, 随机组合的。Soltis 等 (2003) 认为, 体细胞杂种两个亲本间的亲缘关系较远时, 异源四倍体表现出更多的双二倍体 (Diploid-like) 的特征构型, 具有二倍体化 (Diploidization) 的趋势。本试验中体细胞杂种 NS 的两个融合亲本 ‘Nova’ 橘柚和 ‘Succari’ 甜橙的亲缘关系也比较远, 同源程度比较低, 因此, NS 在减数分裂的时候, 有可能是两个融合亲本的染色体各自联会, 形成二价体, 然后两两分离, 类似于双二倍体的行为。在其他柑橘体细胞杂种中也发现过这种情况, Chen 等 (2004) 通过对柑橘属间异源四倍体体细胞杂种印度酸橘 + 阿根廷枳 (*C. reticulata* ‘Cleopatra’ + *P. trifoliata* ‘Argentine’) 减数分裂行为观察, 发现该组合的染色体同源配对构型存在较高比例的二价体, 少有单价体或多价体出现, 认为该例组合具有类似二倍体的特征构型, 这可能与双亲基因组的同源性相对较低, 来自双亲的同源染色体能够各自准确配对有关。本试验中还发现, 体细胞杂种 NS 的授粉在各个组合都比较成功, 说明 NS 花粉的活力比较高, 这也说明 NS 在减数分裂时 4 套染色体可能是两两分离的, 这样形成的花粉才会有较高的育性。由于本研究目前只用了少量的标记, 柑橘二倍体有 9 对染色体, 显然两对标记还不能排除正好是在某一对染色体上, 或位于不同的染色体, 而这一对 (或两对) 染色体联会正常, 2/2 联会, 其他 8 对或者 7 对染色体是否也是这样联会, 还不能做出结论。未来需要分别找出在 9 对染色体上有代表性的分子标记, 分别研究才可以得出结论。

Yi 和 Deng (2007) 用 RAPD 标记对父母本特异标记在三倍体群体中的传递规律进行了研究, 认为: 柑橘二倍体与异源四倍体体细胞杂种杂交, 以有性后代群体为分析对象, 不仅父本与母本的特异标记数是随机传递给后代的, 而且父本融合双亲的特异标记也是随机传递给后代的, 亲本标记数在后代中的传递与倍性无关。在本试验中, 对父、母本的每一条特征带进行单独研究, 发现特征带在后代中的传递与父、母本的基因型密切相关。例如, 试验中先期推测 TAA1 位点上父本的特征带 TAA1-3 是由纯合的  $A_2A_2$  基因提供的, 统计发现在 79 个后代植株中有 67 株出现了这条带, 12 株没有, 大体符合 5:1 的比例; 而在 TAA3 扩增的带型中, 父本的两条特征带都是分别由 1 个显性基因提供的, 它们在后代中都只有 50% 的传递率。说明这种传递规律与父、母本的基因型密切相关。

本试验中获得的三倍体都是三亲杂种, 根据 SSR 标记的分离情况可知杂种后代的性状会出现广泛的分离, 因此通过杂交育种来选育优良品种需要更大的群体。三倍体中, 有两套染色体是由父本

提供的, 因此, 后代的性状表现应该更接近于父本。如 Reforgiato 等 (2005) 对来自 22 个亲本组合的三倍体柑橘杂种的主要特征进行了分析, 发现三倍体杂种中虽然出现了分离与重组, 但其主要特征更接近四倍体亲本。这对三倍体育种有指导意义, 在杂交选育三倍体品种时, 应该选择优良的四倍体体细胞杂种作为亲本, 才有可能获得性状表现好的三倍体后代, 融合亲本的优良性状如果是由纯合的基因控制, 则更有希望在三倍体育种中发挥作用。

## References

- Chen C L, Guo W W, Yi H L, Deng X X. 2004. Cytogenetic analysis of two interspecific citrus allotetraploid somatic and their diploid fusion parents. *Plant Breeding*, 123: 332 - 337.
- Cheng Y J, Guo W W, Yi H L, Pang X M, Deng X X. 2003. An efficient protocol for genomic DNA extraction from citrus species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21: 1 - 7.
- Gai Jun-yi. 2000. Experimental statistics. Beijing: China Agriculture Press: 131. (in Chinese)
- 盖钧镒. 2000. 试验统计方法. 北京: 中国农业出版社: 131.
- Grosser J W, Gmitter F G Jr. 2011. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: Applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 104: 343 - 357.
- Guo W W, Cheng Y J, Deng X X. 2002. Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliata*. *Plant Cell Reports*, 20: 829 - 834.
- Kijas J M H, Thomas M R, Fowler J C S, Roose M L. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of citrus. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 701 - 706.
- Kobayashi S, Ohgawara T, Saito W, Nakamura Y, Shimizu J. 1995. Fruit characteristics and pollen fertility of citrus somatic hybrids. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 64: 283 - 289.
- Kobayashi S, Oiyama I, Yoshinaga K, Ohgawara T, Ishii S. 1991. Fertility in an intergeneri somatic hybrid plant of Rutaceae. *HortScience*, 26 (2): 207.
- Pang X M, Hu C G, Deng X X. 2003. Phylogenetic relationships among citrus and its relatives as revealed by SSR markers. *Acta Genetica Sinica*, 30 (1): 81 - 87.
- Reforgiato Recupero G, Russo G, Recupero S. 2005. New promising citrus triploid hybrids selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents. *HortScience*, 40 (3): 516 - 520.
- Scarano M T, Tusa N, Abbate L, Lucretti S, Nardi L, Ferrante S. 2003. Flow cytometry, SSR and modified AFLP markers for the identification of zygotic plantlets in backcross between 'Femminelo' lemon cybrids (2n and 4n) and a diploid clone of 'Femminelo' lemon (*Citrus limon* L. Burm. F.) tolerant to mal secco disease. *Plant Science*, 164: 1009 - 1017.
- Soltis D E, Soltis P S, Tate J A. 2003. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist*, 161: 173 - 191.
- Song Jian-kun, Guo Wen-wu, Yi Hua-lin, Liu Ji-hong, Chen Chun-li, Deng Xiu-xin. 2005. Creation of triploid citrus plants by crossing elite allotetraploid somatic hybrid pollen parents with diploid cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (4): 594 - 598. (in Chinese)
- 宋健坤, 郭文武, 伊华林, 刘继红, 陈春丽, 邓秀新. 2005. 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. *园艺学报*, 32 (4): 594 - 598.
- Yi H L, Deng X X. 2007. RAPD-based genetic analysis of offsprings from the sexual cross using allotetraploid citrus somatic hybrid as pollen parent. *Science in China*, 50 (3): 367 - 376.