DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2015.09.006

天然四倍体红江橙与其二倍体的植株形态学和遗传组成比较[①]

王 莹， 李晓林， 梁国鲁， 向素琼

西南大学 园艺园林学院，重庆 400715

摘要： 对天然四倍体红江橙与其二倍体的植株形态学和基因组遗传组成进行了比较. 天然四倍体红江橙植株表现出与二倍体明显不同的植株形态特征，尤其是：生长较缓慢，树冠较小，树高与干周为二倍体的 0.89 和 0.83 倍；春梢长度仅为二倍体的 0.7 倍，春梢成熟叶片叶形指数减小，为二倍体的 0.87 倍，叶片厚度增加明显，为二倍体的 1.36 倍、对天然红江橙四倍体基因组遗传组成的 GISH 与 SSR 分析显示，天然四倍体红江橙是由二倍体加倍而来的同源四倍体，但又与二倍体基因组的遗传组成存在 DNA 水平上的变异.

关 键 词： 红江橙；四倍体；基因组原位杂交 (GISH)；简单重复序列 (SSR)

中图分类号：S666 **文献标志码：A** **文章编号：** 1673-9868(2015)09-0037-05

红江橙(*Citrus sinensis* cv. Hongjiangcheng)栽培品种为二倍体，它发现于广东省红江农场，因此得名. 红江橙是一个早结、丰产、品质优良的甜橙类品种，也是我国能与国外优良甜橙媲美的少数橙类品种之一. 但是红江橙平均每个果实约有 20 粒种子的状况严重影响其可食性和商品性[1]，所以，其育种的主要目标就是减少红江橙的种子数. 虽然目前通过芽变选种获得了一些无核(少核)选系[2]，但大多数选系后来被证明是不可遗传或者产量不够高和品质不够优良[3-5]，因此至今也没有出现大面积无核(少核)红江橙用于商业生产. 由于四倍体材料的育性降低可能使种子数减少，同时四倍体也可以作为培育三倍体无核品种的育种亲本. 因此，本研究对获得的天然四倍体红江橙，比较其与二倍体红江橙的植株形态学特征差异，同时采用具有高多态性与共显性优点的简单重复序列(simple sequence repeat，SSR)分子标记和基因组原位杂交(Genome *in situ* hybridization，GISH)技术初步比较二者的遗传组成，为今后四倍体材料的利用积累资料.

1 材料与方法

1.1 植物材料与植株形态学观察

天然四倍体红江橙(2n=4x=36)为从红江橙实生苗中筛选获得，以同期栽植的红江橙二倍体(2n=

① 收稿日期：2014-11-19
基金项目：国家自然科学基金(31272138)；国家科技支撑计划(2013BAD02B02)；中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2012B019)资助.
作者简介：王 莹(1990-)，女，山东菏泽人，硕士研究生，主要从事果树遗传育种与现代生物技术研究.
通信作者：向素琼，研究员.

2x=18)植株为对照，观察 5 年生天然四倍体生长状况，选择发育时期相同的植株，测量其高度、干周、当年春梢长度及春梢成熟叶片的长度、宽度和厚度，春梢长度和叶片每株各测 30 个求平均值. 二倍体植株取 5 株求平均值.

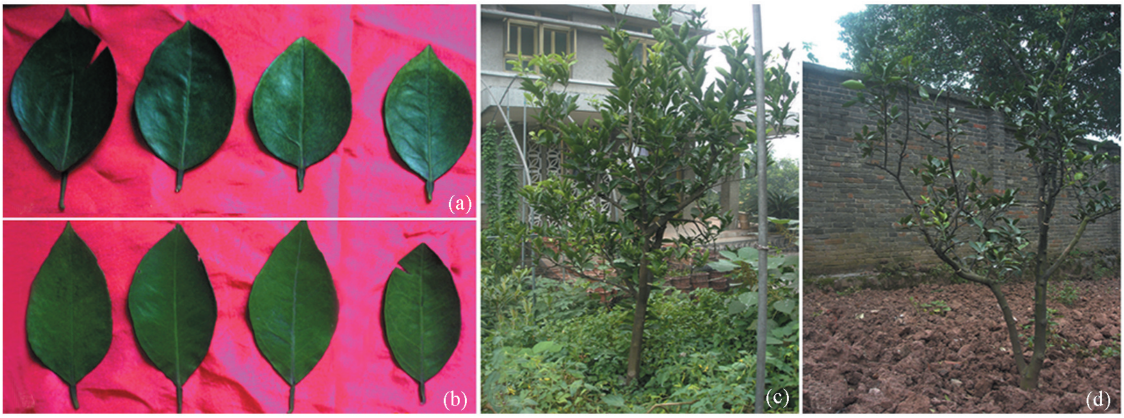
1.2　天然四倍体红江橙与二倍体的 GISH 与 SSR 分析

基因组 DNA 的提取采用改良 CTAB 法并加以改进[6-7]. SSR 引物来自于文献[8－9]，引物序列委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成. SSR 扩增体系采用 20 μL 反应体系，PCR 扩增程序及电泳检测参考文献[10]进行. GISH 分析中的染色体制备参考文献[11]的去壁低渗火焰干燥法，探针为二倍体的红江橙基因组 DNA 进行地高辛(DIG)标记，GISH 杂交流程参考文献[12].

2　结果与分析

2.1　天然四倍体红江橙与二倍体植株形态学比较

天然四倍体红江橙植株与二倍体相比表现出明显不同的植株形态特征，主要表现为：生长较为缓慢，树冠较小(图 1(d))，树高与干周分别为二倍体的 0.89 和 0.83 倍(表 1)；春梢较二倍体短但抽发更密集，长度仅为二倍体的 0.7 倍，春梢成熟叶片色泽较二倍体更浓绿，宽度变宽，叶形指数减小，为二倍体的 0.87 倍(图 1(a)-(b))；尤其是叶片厚度增加明显，天然四倍体叶片厚度范围为 0.35～0.40 mm，平均为 0.38 mm；二倍体叶片的厚度范围为 0.25～0.30 mm，平均为 0.28 mm，四倍体叶片厚度为二倍体的 1.36 倍.



(a) 天然四倍体叶片；(b) 二倍体叶片；(c) 二倍体植株；(d) 四倍体植株.

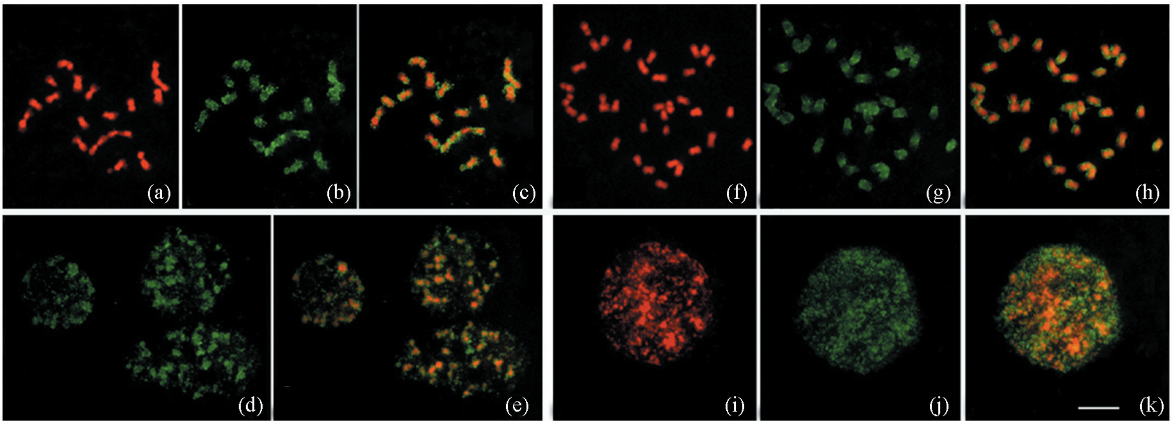
图 1　天然四倍体红江橙与二倍体植株树体与叶片比较

表 1　天然四倍体红江橙与二倍体植株树体与叶片比较

倍性类型	树高/m	干 周/cm	春梢长度/cm	春梢成熟叶片 厚度/mm	长度/cm	宽度/cm	叶形指数(长/宽)
天然四倍体	1.93	15.50	7.30	0.38	7.47	4.23	1.76
二倍体	2.16	18.70	10.50	0.28	8.10	4.00	2.02

2.2　天然四倍体红江橙与二倍体的 GISH 分析

以红江橙二倍体的基因组 DNA 为探针，对自身染色体进行 GISH 结果(图 2(a)-(c))显示所有 18 条染色体每条上均有杂交信号且基本分布于整条染色体上，但信号亮度并不完全一致. 间期细胞核中也如此(图 2(d)，(e)). 而以红江橙二倍体为探针，对天然四倍体红江橙染色体的 GISH 结果(图 2(f)-(k))，信号亮度比二倍体自身 GISH 要稍暗，但也基本每条染色体上都有覆盖整条染色体的信号，可以认为天然四倍体是由二倍体红江橙加倍而来的同源四倍体.

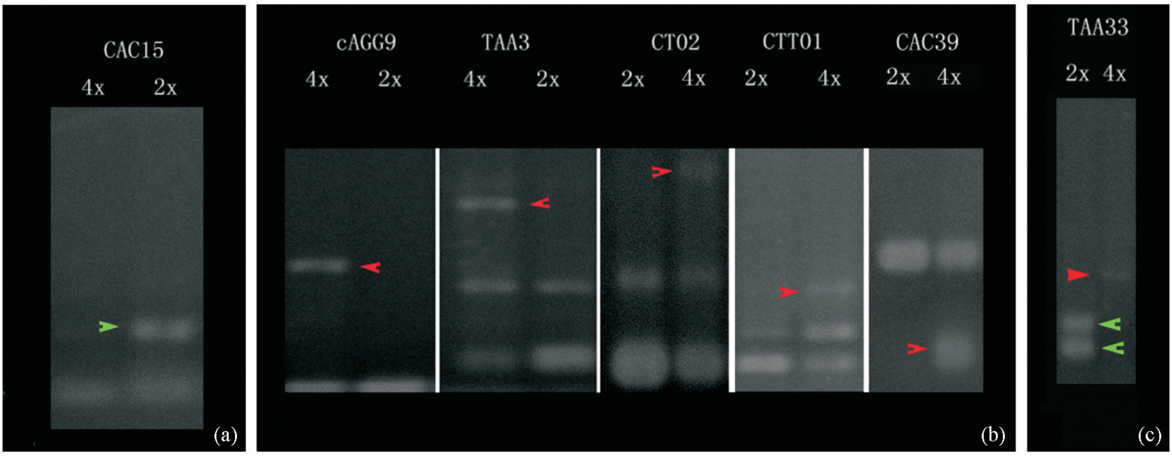


(a)-(e)：红江橙二倍体的自身 GISH；(f)-(k)：红江橙天然四倍体的 GISH；(a)，(f)，(i)：PI 衬染；(b)，(d)，(g)，(j)：杂交信号；(c)，(e)，(h)，(k)：信号合成图. (k)中标尺适用于所有图片，表示 5 μm.

图 2　红江橙二倍体(2n=2x=18)和天然四倍体(2n=4x=36)的 GISH 结果

2.3　天然四倍体红江橙与二倍体的 SSR 分析比较

21 对 SSR 引物对天然四倍体红江橙与二倍体的 SSR 分析结果表明，13 对引物扩增带纹与二倍体完全一致，8 对引物扩增带纹表现有差异. 与二倍体相比，天然四倍体红江橙的扩增带纹差异主要表现为 3 种情况：2 对引物扩增时出现了带纹缺失(图 3(a)，绿色箭头指示)；5 对引物扩增时出现了新增带纹(图 3(b)，红色箭头指示)；既发生带纹缺失又新增带纹的有 1 对引物(图 3(c)，红色箭头示新增带纹，绿色箭头示带纹缺失). 21 对 SSR 引物对天然四倍体红江橙与二倍体的 SSR 分析结果表明天然红江橙四倍体与二倍体的基因组在很大程度上呈现相似性，但也出现了 DNA 的变异，并不是二倍体红江橙的简单加倍.



绿色箭头示四倍体缺失带纹，红色箭头示四倍体新增带纹. (a) CAC15 引物扩增时 4x 发生带纹缺失；(b) cAGG9，TAA3，CT02，CTT01，CAC39 五对引物扩增时 4x 出现新增带纹；(c) TAA33 引物在扩增时既发生带纹缺失又出现新增带纹.

图 3　红江橙二倍体和天然四倍体部分引物的 SSR 带纹

3　讨　论

柑橘种子的多少，直接关系到鲜食的方便性和影响果汁加工程序以及果汁的风味，因此无核或少核特性是柑橘育种中关注的重要性状之一. 长久以来，多倍体一直被认为是可以改良作物品种的一种重要方式[13]，并且随着倍性增加，许多植物种类会出现生长速率的下降[14]、二倍体的树体高度和树冠均明显大于四倍体、四倍体的叶片更厚更宽[15]的现象. 本文的天然四倍体红江橙也是表现出这种生长趋势与叶片特征.

但四倍体的产量通常较二倍体低，因此一般认为不太具商业生产潜力. 通常四倍体的用途是作为亲本来培育无核三倍体品种. 柑橘上现已释放的三倍体商业品种有“Oroblanco”，“melogold”，“Tacle”，“winola”等. 以往柑橘天然多倍体的来源研究一般认为从二倍体多胚品种中发现的天然四倍体是由珠心细胞加倍而来的，也就是说，是母本加倍的同源四倍体. 本文的红江橙为一多胚甜橙品种，GISH 分析结果基本可表明天然四倍体红江橙是二倍体加倍而来的同源四倍体. 关于对同源四倍体柑橘遗传组成分析的研究，洪柳等人[16]对从多胚品种椪柑中获得的7株四倍体与其相应的二倍体进行了SSR比较分析，在结果中显示所选用的引物未见差异，认为这7株四倍体全部是由四倍体珠心细胞发育而来的同源四倍体. 而在本文对多胚品种的红江橙天然四倍体进行SSR分析时，却又发现与其二倍体之间存在带纹差异. 这与汪卫星等人对四倍体红江橙的45S rDNA的FISH分析认为是同源四倍体但也可能发生了染色体的断裂或易位的结果基本一致[17]. 而这种DNA水平的差异在其他同源四倍体的分析中也得到证实[18-19]，导致这种不同结果出现的原因可能是多胚品种的天然四倍体虽都认为来源于珠心细胞的染色体加倍，但在天然实生苗群体中，有的在加倍过程中仅为简单的加倍，有的还发生了DNA序列上的变化，这也表明天然实生苗中的同源多倍体也是含有丰富变异的材料，可为培育植物新品种提供丰富的育种资源.

参考文献：

[1] 杨生发，黄辉白. 红江橙生产与出口的危机、根源与对策 [J]. 中国南方果树，1996，25(4)：18－19.

[2] 张青闪，何永睿，文尚华，等. 红江橙无核(少核)选系的细胞遗传学初步研究 [J]. 西南农业大学学报：自然科学版，2006，28(6)：937－940.

[3] 唐小浪，李志强，吴绍彝，等. 通过重复照射培育无核红橙新品系 [J]. 中国柑桔，1993，22(4)：18－19.

[4] 叶自行，许建楷，罗志达，等. 无核红江橙选育初报 [J]. 中国南方果树，1993，22(2)：21.

[5] 黄建昌，潘文力，廖宗楷，等. 花都无核红江橙的选育研究 [J]. 仲恺农业技术学院学报，1995，8(1)：58－62.

[6] 熊光明，梁国鲁，阎　勇，等. 适于AFLP分析用的柑橘DNA提取方法 [J]. 果树学报，2002，19(4)：267－268.

[7] 韩国辉，向素琼，魏　旭，等. 适于柚×橙杂交后代遗传分析的ISSR引物的筛选与应用 [J]. 西南大学学报：自然科学版，2011，33(4)：72－76.

[8] KIJAS J M H，THOMAS M R，FOWLER J C S，et al. Integration of Trinucleotide Microsatellites Into a Linkage Map of Citrus [J]. Theoretical and Applied Genetics，1997，94(5)：701－706.

[9] BARKLEY N A，ROOSE M L，KRUEGER R R，et al. Assessing Genetic Diversity and Population Structure in a Citrus Germplasm Collection Utilizing Simple Sequence Repeat Markers (SSRs) [J]. Theoretical and Applied Genetics，2006，112(8)：1519－1531.

[10] 张连峰，何　建，冯　焱，等. 金柑属及其近缘属植物亲缘关系的SSR分析 [J]. 果树学报，2006，23(3)：335－338.

[11] 陈瑞阳，宋文芹，李秀兰. 关于水稻染色体组型分析的研究 [J]. 遗传学报，1980，7(4)：361－365.

[12] 向素琼，梁国鲁，李晓林，等. 沙田柚多倍体的获得与基因组原位杂交(GISH)分析 [J]. 中国农业科学，2008，41(6)：1749－1754.

[13] LEE L S. Citrus Polyploidy-Origins and Potential for Cultivar Improvement [J]. Australian Journal of Agricultural Research，1988，39(4)：735－747.

[14] FRYXEIL P A. Mode of Reproduction of Higher Plants [J]. The Botanical Review，1957，23(3)：135－233.

[15] JASKANI M J，Khan M M，KHAN I A. Growth，Morphology and Fruit Comparison of Diploid and Tetraploid Kinnow Mandarin [J]. Pakistan Journal of Agricultural Sciences，2002，39：126－128.

[16] 洪　柳，刘永忠，邓秀新. 柑成熟种子胚培养获得四倍体植株 [J]. 园艺学报，2005，32(4)：688－690.

[17] 汪卫星，向素琼，陈　瑶，等. “红江橙”天然多倍体的45S rDNA荧光原位杂交分析 [J]. 园艺学报，2008，35(1)：103－106.

[18] 姜金仲，李　云，程金新. 植物同源四倍体生殖特性及 DNA 遗传结构的变异 [J]. 遗传，2006，28(9)：1185－1190.

[19] WEISS H，MALUSZYNSKA J. Chromosomal Rearrangement in Autotetraploid Plants of *Arabidopsis thaliana* [J]. Hereditas，2000，133(3)：255－261.

Morphological Comparison and Genetic Difference Between a Natural Tetraploid and the Diploid of *Citrus sinensis* cv. Hongjiangcheng

WANG　Ying，　LI Xiao-lin，　LIANG Guo-lu，　XIANG Su-qiong

School of Horticulture and Landscape Architecture，*Southwest University*，*Chongqing 400715*，*China*

Abstract：A comparison was made of the morphological characteristics and the genetic composition of the genome between the diploid and natural tetraploid of "Hongjiangcheng". Morphologically，the tetraploid was shown to be strikingly different from the diploid plants. It had poorer growth rate and smaller tree crown. The height and circumference of its trunk was 0. 89 and 0. 90 times those of the diploid，respectively. The length of vernal shoots of the tetraploid was 0. 7 times that of the diploid. The leaves of the tetraploid were broader and obviously thicker than those of the diploid. The leaf index and the leaf thickness of the tetraploid were 0. 87 and 1. 36 times those of the diploid. GISH (genome *in situ* hybridization) and SSR analyses of the genetic copmsotion of the genome showed that the teraploid plant was an autotetraploid，resulting from chrmosomome doubling of the female diploid and that some DNA variations occurred between the natural tetraploid and the diploid.

Key words：*Citrus sinensis*；tetraploid；genome *in situ* hybridization (GISH)；simple sequence repeat (SSR)

责任编辑　潘春燕