

# 梨橙有性多倍体发掘及遗传鉴定

崔璐璐<sup>1</sup>, 党江波<sup>1</sup>, 韩国辉<sup>2</sup>, 郭启高<sup>1</sup>, 向素琼<sup>1</sup>, 梁国鲁<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 南方山地园艺学教育部重点实验室 / 西南大学南方山地作物逆境生物学国家级培育基地 / 西南大学农业科学研究院 /

西南大学园艺园林学院, 重庆 400715; <sup>2</sup> 重庆市农业科学院果树研究所, 重庆 401329)

**摘要:** 多倍体植株具有少核、有效成分含量高、树形矮化、抗逆性强等特点, 在大田作物和果树育种中均有应用。梨橙是我国自主选育的优质甜橙品种, 种子单胚, 也有少量多胚种子出现。至今未见关于梨橙多倍体及梨橙单胚种子杂种性的报道。本研究以梨橙为材料, 开展多倍体发掘和遗传鉴定研究。流式细胞术筛选与染色体显微观察相结合, 对其自然产生的单胚种子萌发植株进行筛选, 获得了三倍体 2 株、四倍体 1 株; InDel 标记分析证实这些多倍体均为有性胚产生, 其纯合位点比例较高, 可能产生于第二次减数分裂核复原 (SDR, second meiotic division restitution) 以及减数分裂后加倍 (PMD, post-meiotic genome doubling); 多胚 / 单胚分子标记 (MITE-P2) 分析表明, 梨橙基因组 DNA 扩增出了清晰的短片段和模糊的长条带, 可能与其能产生多胚种子有关; 而 3 株多倍体后代均只扩增出了清晰的短条带, 该 3 株多倍体可能不能产生多胚种子。本研究表明: 梨橙后代中多倍体比例较高, 通过梨橙单胚种子可获得有性多倍体, 自梨橙后代获得单胚四倍体是可能的。本研究为以梨橙为亲本培育多倍体以及单胚四倍体筛选提供了重要参考。

**关键词:** 梨橙; 多倍体; InDel; 单胚; 多胚

## Exploitation and Genetic Characterization of Sexual Polyploids from Licheng

CUI Lu-lu<sup>1</sup>, DANG Jiang-bo<sup>1</sup>, HAN Guo-hui<sup>2</sup>, GUO Qi-gao<sup>1</sup>, XIANG Su-qiong<sup>1</sup>, LIANG Guo-lu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Ministry of Education Key Laboratory of Horticultural Science for Southern Mountains Regions/Southwest University National Cultivation Base of Crop Adversity Biology for Southern Mountains Regions/Southwest University Academy of Agricultural Sciences/College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715; <sup>2</sup> Fruit Research Institute, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329)

**Abstract:** With characteristics of few seeds and high content of effective components in the fruit, dwarf habit, and strong stress resistance, polyploid plants plays an important role in crop and fruit tree breeding. Licheng is a high-quality variety bred independently in China, which produces fruits with mostly monoembryonic seeds and a few polyembryonic seeds. So far, there are no reports about the polyploidy of this variety and the heterozygosity of its monoembryonic seeds. In this study, the screening, and genetic identification and analysis of polyploidy were carried out using Licheng as material. Two triploid and one tetraploid plants were selected by flow cytometry and chromosome microscopy from seedlings grown from naturally produced monoembryo seeds. Through the analysis of polyploidy by InDel markers, it was confirmed that these polyploids were grown

收稿日期: 2020-12-22 修回日期: 2021-01-10 网络出版日期: 2021-02-03

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20201222004>

第一作者研究方向为细胞遗传, E-mail: 1124574626@qq.com

通信作者: 向素琼, 研究方向为果树遗传育种, E-mail: xiangsq@swu.edu.cn

梁国鲁, 研究方向为种质资源与遗传育种, E-mail: lianggl@swu.edu.cn

**基金项目:** 重庆博士后基金特别资助项目 (XmT2018056); 重庆市科委社会民生科技创新专项 (cstc2016shmszx12080003); 重庆市基础与前沿研究计划项目 (cstc2016jcyjA0046); 国家自然科学基金项目 (31272138)

**Foundation projects:** Special Projects Supported by Chongqing Postdoctoral Foundation (XmT2018056), Technology Innovation Fund of Chongqing (cstc2016shmszx12080003), Basic and Frontier Research Program Project of Chongqing (cstc2016jcyjA0046), National Natural Science Foundation of China (31272138)

from sexual embryos, and the proportion of homozygous loci was high, which may be caused by second meiotic division restitution (SDR) and post-meiotic genome doubling (PMD). Polyembryonic/monoembryonic molecular marker (MITE-P2) analysis showed that the clear short fragments and fuzzy long bands obtained from the genomic DNA amplification of Licheng may be related to its ability to produce polyembryonic seeds, while the clear short bands only, obtained from the genomic DNA amplification of the three polyploid progenies, may be due to their inability to produce polyembryonic seeds. This study indicated that the proportion of polyploids in the progeny of Licheng was high, with sexual polyploids obtainable from the monoembryonic seeds of Licheng, and monoembryo tetraploids obtainable from the progeny of Licheng, which provides an important reference for breeding of polyploids and monoembryonic tetraploids with Licheng as the parent.

**Key words:** Licheng; polyploid; InDel; monoembryony; polyembryony

多倍体具有大花大果、少核、有效成分含量高、树形矮化、抗逆性强等特点,在作物育种中起重要作用,果树中也多有应用<sup>[1-2]</sup>。近年来,柑橘多倍体育种及研究取得了较大进展,尤其是大量同源、异源多倍体的筛选与创制,为柑橘新品种选育和基础研究提供了丰富的材料。然而,单胚类型的柑橘多倍体较少,这对柑橘的多倍体育种有一定的负面影响。梨橙为 20 世纪 70 年代我国育种家自本土品种锦橙中选育的优质甜橙品种,可产生单胚种子<sup>[3]</sup>。单胚性状为隐性遗传,理论上梨橙自交后代存在产生单胚类型多倍体的可能,但目前还未见关于梨橙多倍体的报道。实际观测中发现,梨橙也可产生少量的多胚种子,其胚性的基因型至今未得到鉴定。该品种单胚种子是有性胚发育还是仅存的无性胚发育,需要进行鉴定。后代胚性的基因型是单胚型还是多胚型,也需要进行分析。

InDel (Insertion/Deletion) 标记是基于基因组同源序列上发生的不同大小核苷酸片段的插入或缺失的突变而开发的分子标记<sup>[4-6]</sup>。具有基因组内分布广、密度高、变异稳定、可重复性好、价格低廉等优点<sup>[7-8]</sup>。目前, InDel 标记在水稻<sup>[9]</sup>、绿豆<sup>[10]</sup>、花生<sup>[11]</sup>、茄子<sup>[12]</sup>、苹果<sup>[13]</sup>、猕猴桃<sup>[14]</sup>、中国樱桃<sup>[15]</sup>等作物中均有应用,主要用于多态性分析、亚种分化、基因图位克隆等,也可以用于杂种鉴定。单胚种子、多胚种子在柑橘中均可见,不同品种单胚、多胚种子的比例存在差异。据中国农业科学院柑橘研究所<sup>[16]</sup>调查发现,柚类、瓯橘、鸳鸯柑、红桔广柑、克里曼丁橘产生的种子全为单胚,柠檬类、宜昌橙类以及部分宽皮柑橘品种产生的单胚种子比例为 9.39% (蟹橙)~99.17% (圆红香柑)。Wang 等<sup>[17]</sup>对多胚和单胚类型柑橘进行了深入分析,发现了与柑橘多胚关联度最高的基因 (*CitRWP*),并开发了能准确鉴定

多胚/单胚基因型的分子标记。

本研究以梨橙 ( $2n=2x=18$ ) 为材料,应用流式细胞术筛选和染色体显微观察法于其单胚种子萌发的实生后代中筛选多倍体,进而应用 InDel 分子标记及多胚/单胚分子标记对后代进行分析,以明确多倍体的产生途径 (有性/无性),并初步了解梨橙多倍体后代的胚性基因型。本研究为以梨橙为主要材料创制和筛选柑橘多倍体材料提供重要参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究所用梨橙取自重庆市农科院果树研究所江津柑橘种质资源圃集中种植的梨橙。用于多倍体筛选和分析的材料为梨橙自然结果的单胚种子萌发的后代 (简称梨橙单胚种子萌发后代)。为避免后代中存在其他品种花粉授粉发育而成的材料,取材时取种植区域中央果实,这些植株与其他品种的距离在 30 m 以上,与相邻品种有 3 行植株的距离。为对梨橙及其后代的胚性基因型进行分析,特选取单胚品种沙田柚、多胚品种伏令夏橙为对照。

### 1.2 梨橙单胚种子萌发后代多倍体筛选

**1.2.1 流式细胞术筛选** 参照梁森林等<sup>[18]</sup>的方法稍加改进:以梨橙为对照,用流式细胞仪 (CyFlow Cube 6, Partec, Germany) 对梨橙单胚种子萌发后代进行倍性分析,剪取待测植株上部即将成熟的叶片,洗净叶片表面肉眼可见的杂质。称取对照及待测样品各约 100 mg 幼叶于塑料平皿中,加入缓冲液 100  $\mu\text{L}$ <sup>[19]</sup>,用锋利刀片将材料迅速切碎,再加入 900  $\mu\text{L}$  缓冲液,轻微振荡混匀。混悬液过 30  $\mu\text{m}$  网筛,滤液收集沉积细胞,加入 DAPI 染色液: 50  $\mu\text{L}$  (5  $\mu\text{g/mL}$ ),用仪器配套样品管收集,4 $^{\circ}\text{C}$  避光染色 10 min 后上机检测。

**1.2.2 染色体显微观察** 以经流式细胞术检测后判定为多倍体的植株为材料,取幼嫩根尖或秋梢茎尖,采用去壁低渗-火焰干燥法<sup>[20]</sup>制片。混合酶液(3%纤维素酶+1% 离析酶)中酶解 1.5 h,清水清洗后固定,涂片,酒精灯火焰干燥。5% 吉姆萨染色后镜检。

### 1.3 分子标记分析

**1.3.1 InDel 标记分析** (1)PCR 扩增及电泳检测 采用改良 CTAB 法<sup>[21]</sup>进行基因组 DNA 的提取。PCR 扩增体系和程序参照韩国辉等<sup>[22]</sup>。PCR 扩增体系为 20  $\mu$ L,其中包括:1  $\mu$ L DNA 模板,各 0.5  $\mu$ L 正、反向引物,2.0  $\mu$ L 10 $\times$  PCR buffer (Mg<sup>2+</sup>), 0.3  $\mu$ L dNTP 混合液,0.2  $\mu$ L Taq DNA 聚合酶。以

上试剂均来自 TAKARA 生物科技有限公司(大连)。扩增程序为:94  $^{\circ}$ C 预变性 2.5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火 30 s(根据不同引物设置退火温度),72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min,16  $^{\circ}$ C 保存。

6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶分离扩增产物,230 V 电压下电泳 50 min,银染显色后,放置在白光板上拍照保存<sup>[23]</sup>。

引物为前期开发的梨橙 InDel 标记,共计 37 对,该标记均能检测出梨橙的等位变异(详见 <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20201222004>,附图 1),具体信息见表 1。

表 1 37 个 InDel 位点及 PCR 扩增引物

Table 1 37 InDel loci and PCR primers

引物编号 Prime No.	位置 Location	参考基因组序列 Reference genome sequence	梨橙序列 Licheng sequence	上游引物 Forward prime	下游引物 Reverse primer
chr1-2	3638793	CGCCGTTCTTTGCC AAAAGAGCA	C	ACACTTCAGCCCTT TTCGAG	CTTGAAGCCGTGC GAATCAG
chr1-3	4149024	GAGGAAGAGATTC GGATAATGA	G	AGGAGGAAACGGA CCAATTG	TCTATTGCCAGAG TCAGAAGA
chr1-9	17163484	T	TAGTGATCCTAGC AATCTTTTG	ACCACAGACCAAC AAGCTCT	CTGTGGGTACTGA CATCGCA
chr1-12	20908971	GCAGAAGCTGGA CCCCAACAAAC	G	GGCAAACGGACAC AAAAGCT	GCCCATGGAAGC AGAGAAAG
chr1-13	24506768	CGCGATCAACGCCAGC AGTTCGATGAATCTGA CCAGCAACCTCAAATTA	C	GTCCTTCTCGCGCC AACTAT	AGATTATCGGA CTGCTGGC
chr1-15	26941701	AATGTATCTCTTGA AAACATCTCTTGTT	A	TCGTTGGAGACCTC TTGAGC	ACGGGAGGGAAC AAAAGTTAC
chr1-16	27193680	GAAGCTGTACTCCAGCT GGGACCCGAATCCTGA	G	ATCAGGAAGGTGTG GTCTGC	CTCAGACCTTCCC AGCCCTA
chr2-4	8582487	T	TTTTTAGCAGCAC ATTACAAAAG	TCTCTCGACGATTT GGCTGC	TTGCATGGCTGTG TGTGAAA
chr2-8	16568682	CGAGCTTGCGATAA TCATCTTGAGAA	C	AGCTTCTCATCGTT CGGCAT	AGACTGATTGGGA GACGGCC
chr2-9	18824807	GAATCAACAGAAA TATTACGAACAGC	G	CTTGACCGGCATG AGAGTGA	CAACAGTTGGCAA GTACGCT
chr2-21	30587915	TTGCTTGGAATTGT GTTATGAATCCTGTGATAG	T	TCCTTCCACGTGC ACCAAAT	AAGGATGAGCAAA TTTGGGT
chr3-1	2299960	ACCTGGTGAGTAG CCCAT	A	CCCCAAGGCTACC AATACC	CAATCTCTGTGGC AGTGG
chr3-13	19760834	TGTAAGAAAGAAAGCA ACATCACATGAGTTC TAACTTATAAACAGACAC	T	GGTGACCCAGAA AGCTACT	CCTGATTGGTGAG CTTGCTT
chr4-1	877477	TGAAGATGAAGAA GAAGAAGAA	T	GCGAGTTGTTAAG CTTGTTGGA	ACGAAAGAAAACA TGGCTTCGA
chr4-4	3185246	ACTGCTTGCGCCACAT	A	GGTGCCACTAGAC AAGGACA	GGAATTGAGTGCAT CCTAGAT

表 1(续)

引物编号 Prime No.	位置 Location	参考基因组序列 Reference genome sequence	梨橙序列 Licheng sequence	上游引物 Forward prime	下游引物 Reverse primer
chr4-7	4556280	TCAGAGCCACCAGCCA	T	GGTAAGCCCCTTC GGAAACA	AACTTGTAGTCTTG GCCGGC
chr4-9	5906298	A	AATGATGAACATG AAG	AGGTAGTGGCCAA GGTGTTG	AGTTTCATGCAGTC ACTTCCA
chr4-10	6249144	TCGCTGTTCCTCC GCTTCCGC	T	CTCGGCGGATTCT TCTTCAA	ATCGCCCGTGAAC GCATG
chr4-12	7412831	T	TGATACAACCTGCC TTGTG	ACTTCTCAGCAGT TCCCTCA	CCACTCAGGTTACA ACTTATCA
chr5-1	2604743	T	TCAGATAAACAA CAGATGCAA	GGCCTCCAGAAAC CGCATT	TCCTGGTCATCATC ATTGCCA
chr5-2	2855406	C	CGACAGAGACAG AGACAGA	GCTCAAGAAGAA GCCTAGCGA	TCTGTCCCTGTCTC GGTCTC
chr5-3	4041137	ATGACCATCACC ATCTTTC	A	CCGCTGGCTAACA AATCACC	CTTTGTTGTTTTCG GGCGGT
chr5-5	4429326	G	GTTTGATTACTGTCA CAGATAATTAACAA	CACTCACAGCTTT CCCACGA	TCCATCCCTAACCA AAGCCT
chr5-6	5547657	TGATGAGGAGGA GGAGGAG	T	AACTGATGAGGAC TCGGGGA	CACTCACACTGCTT GAAATTGA
chr5-13	25831030	GAAGCACACGAG AACTAAGGAATAT	G	TGTTCCCTGGATTC ATAAGACT	GCTGCAATGCTCGT AATTATT
chr5-15	27316132	C	CTGGTGGAGGAAG AACTCCAGGGGG GGT	GCAGCTGGTGGAG AAGAAGA	GGGATGGAGAAAG TTCGGCA
chr5-16	28252979	AAATGATTCTT GGATGTG	A	CGGCAATTCATCTC GTTTTGGA	GAAGCCCATCCCAG TCCAAG
chr5-19	29678005	CATAGATAGAGGC AGTACCGTCACAA ACAAGCT	C	AGTGGCCGTTGAA GCAAATG	TCATCAAGCCCTGC AAATTACA
chr5-22	31922587	GCGTACTTCCG TTGCTCC	G	GCTGTTGGTAGTA TGCTAAGCC	CCCCGCTTCTTGGC ATATCT
chr5-25	35348710	CCGGGGCCCGATTC TAGGGCTTCGGAGG	C	AGCGTGACGATCA GAGAATC	CTCCGCCAGATGAC GTAGC
chr5-26	35405110	ATATTCCAAACCT AACCT	A	TCCAAAACCTTAA CCCTAACCC	CGTCACCATAGTTG CCGGAT
chr9-2	2646400	A	ATTAAAAATATCC TCAGAAGAC	ACCTTCTGTTTGAT TGCTCTAT	CAAAGTCAGGAGC AGGCGTA
chr9-3	2952372	T	TGGTGTTATTCCA ATTTTA	ACCTCTGCACAAG TTCCAAGT	GCAACGTGGCCTT TGACTTT
chr9-4	3230138	T	TGGACATGGACG GACAC	ACGCAGAGGGTTT GAAGAGG	ACCAAAACCTTAA AGCAGCACA
chr9-8	5716319	ATTTGTTGTGCTT TTCGAGC	A	TCGAGAGGCAAA GCAAGAACA	ACCGACGACACAC ACACTTG
chr9-14	13013303	A	ATATTTAAAAGAA AAGCTACAGTTGG	GTGAAGTACTGAT CAGCGAGA	ACAAATCCACCAA CACTCTT
chr9-15	13141512	A	AATGGTCATGTTG ATGAAGGTAGGG AATTTG	GCGTGGGAAATTT ACAGTCTCT	TCCACGTACCCCTT TTCCTT

(2) InDel 标记分析 扩增条带统计:长片段记录为 A、短片段记录为 B,同时具有长片段则记录为 AB。

1.3.2 多胚/单胚分子标记分析 以伏令夏橙(多胚)、沙田柚(单胚)为对照,选取 Wang 等<sup>[17]</sup>发布的柑橘多胚/单胚分子标记(MITE-P2),对梨橙以及获得的多倍体材料进行胚性基因型分析。

2 结果与分析

2.1 梨橙实生后代的倍性鉴定

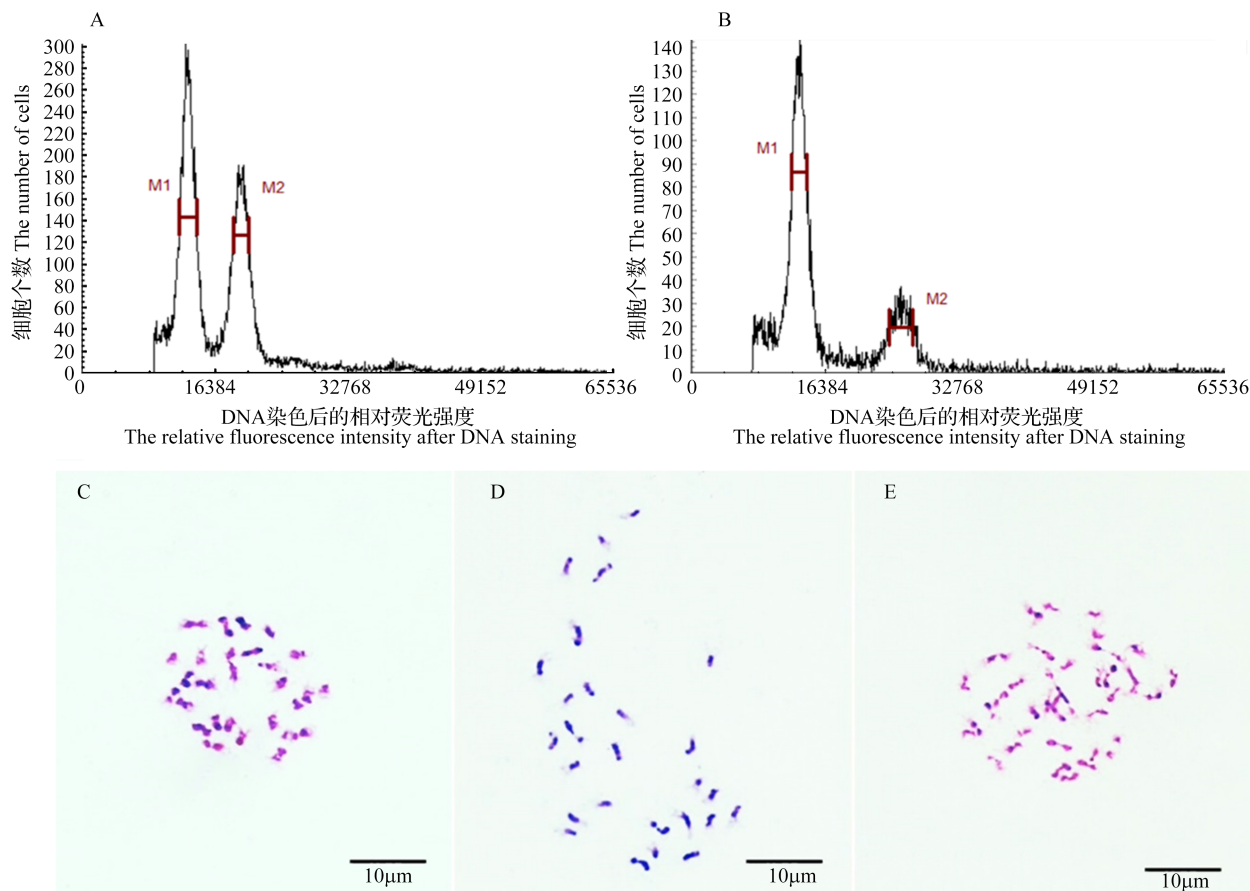
以梨橙(2n=2x=18)为对照,利用流式细胞仪对 64 株梨橙单胚种子萌发的后代进行倍性检测,检测结果显示,2 株材料的荧光峰值为对照的 1.5 倍,其编号分别为 4<sup>#</sup>、66<sup>#</sup>;1 株的荧光峰值为对照的 2 倍,其编号为 15<sup>#</sup>;其余材料的荧光

峰值与对照重叠。可以初步判定,4<sup>#</sup>、66<sup>#</sup>为三倍体,15<sup>#</sup>为四倍体(表 2、图 1),其余材料均为二倍体。

表 2 梨橙单胚种子萌发的多倍体后代的流式分析  
Table 2 Analysis on polyploid progenies from single embryo seeds of Licheng by flow cytometry

材料 Material	G1 期 DNA 含量平均值 Mean G1	DNA 相对含量 Relative content of DNA	样品倍性 Ploidy
4 <sup>#</sup>	13205/20183	142.01	3x
66 <sup>#</sup>	13115/19680	152.84	3x
15 <sup>#</sup>	13199/25655	202.75	4x

经染色体显微观察和染色体计数确认,4<sup>#</sup>和 66<sup>#</sup>的染色体数目均为 27,为三倍体材料;15<sup>#</sup>的染色体数目为 36 条,为四倍体材料。



A: 66<sup>#</sup> 流式细胞仪检测结果; B: 15<sup>#</sup> 流式细胞仪检测结果; M1: 对照材料梨橙(2x)的峰值; M2: 待测样品的峰值  
A: 66<sup>#</sup> the results of flow cytometry, B: 15<sup>#</sup> the results of flow cytometry, M1: Peak value of the control material Licheng (2x),  
M2: Peak value of the tested sample, C: 4<sup>#</sup>, 2n=3x=27, D: 66<sup>#</sup>, 2n=3x=27, E: 15<sup>#</sup>, 2n=4x=36

图 1 多倍体后代鉴定结果  
Fig.1 Results of identification of polyploid progeny



流式细胞仪鉴定结果与染色体制片计数鉴定结果一致,确定 64 株梨橙单胚后代中有 2 株三倍体(图 2A、B),1 株四倍体(图 2C),61 株二倍体。多倍体比例为 4.69%。



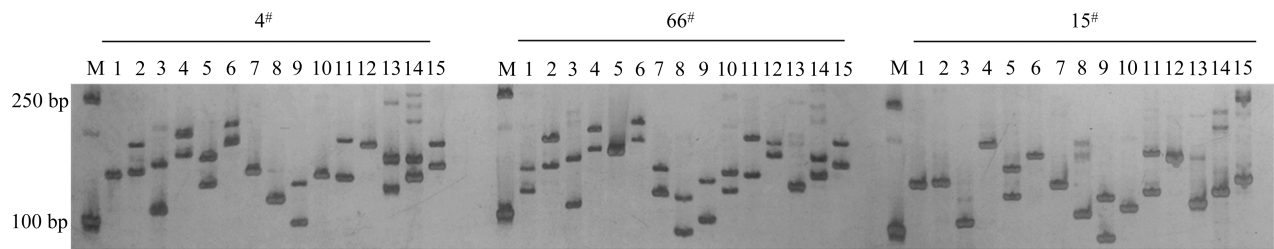
A: 三倍体 4<sup>#</sup>; B: 三倍体 66<sup>#</sup>; C: 四倍体 15<sup>#</sup>  
A: Triploid 4<sup>#</sup>, B: Triploid 66<sup>#</sup>, C: Tetraploid 15<sup>#</sup>

图 2 鉴定获得的多倍体  
Fig.2 Identified polyploids

2.2 多倍体 InDel 分子标记扩增结果

对 InDel 标记的分子检测结果进行统计分析,37 对引物在 3 个多倍体基因组 DNA 中扩增出 3 种带型,即 A 型、B 型和 AB 型,不同材料中纯合、杂合位点的数量不同(图 3、表 3)。其中 4<sup>#</sup> 扩增出 A 型纯合位点 9 个,B 型纯合位点 4 个,AB 型杂合位点 24 个,纯合位点的比例为 35.14%;66<sup>#</sup> 扩增出 A 型纯合位点 5 个,B 型纯合位点 5 个,AB 型杂合位点 27 个,纯合位点比例达到 27.03%;15<sup>#</sup> 扩增出 A 型纯合位点 9 个,B 型纯合位点 14 个,AB 型杂合位点 14 个,纯合位点比例达到 62.16%。

可见,不同多倍体材料中均出现了不同比例的纯合位点,且均有一定数量的位点发生了分离。



M: Marker; 胶图上方上排数字 4<sup>#</sup>、66<sup>#</sup>、15<sup>#</sup> 为样品编号;下排数字为 M 后 15 个孔道,分别表示 15 个 InDel 标记  
M: Marker, the numbers 4<sup>#</sup>、66<sup>#</sup> and 15<sup>#</sup> on the top of the glue map are the sample numbers, the number in the lower row is 15 wells after M, which respectively represent 15 indel marks, 1: chr1-9, 2: chr1-12, 3: chr1-13, 4: chr1-15, 5: chr1-16, 6: chr2-4, 7: chr2-8, 8: chr2-9, 9: chr2-21, 10: chr3-1, 11: chr3-13, 12: chr4-12, 13: chr5-19, 14: chr5-22, 15: chr5-25

图 3 多倍体植株基因组 DNA InDel 标记 PCR 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱  
Fig.3 Polyacrylamide gel electrophoretogram of PCR products amplified by InDel markers from genomic DNA of the polyploid plants

表 3 37 对 InDel 引物对多倍体的分型  
Table 3 Genotyping of the polyploid by 37 pairs of InDel markers

引物编号 Primer No.	梨橙 Licheng	多倍体 Polyploid			引物编号 Primer No.	梨橙 Licheng	多倍体 Polyploid		
		4 <sup>#</sup> ( 3x )	66 <sup>#</sup> ( 3x )	15 <sup>#</sup> ( 4x )			4 <sup>#</sup> ( 3x )	66 <sup>#</sup> ( 3x )	15 <sup>#</sup> ( 4x )
chr1-2	AB	AB	A	A	chr2-21	AB	AB	AB	AB
chr1-3	AB	AB	B	A	chr3-1	AB	A	AB	B
chr1-9	AB	A	AB	A	chr3-13	AB	AB	AB	AB
chr1-12	AB	AB	AB	B	chr4-1	AB	AB	AB	AB
chr1-13	AB	AB	AB	B	chr4-4	AB	AB	AB	B
chr1-15	AB	AB	AB	A	chr4-7	AB	B	AB	B
chr1-16	AB	AB	A	AB	chr4-9	AB	A	AB	A
chr2-4	AB	AB	AB	B	chr4-10	AB	AB	AB	B
chr2-8	AB	A	AB	A	chr4-12	AB	A	AB	A
chr2-9	AB	A	AB	A	chr5-1	AB	AB	AB	AB

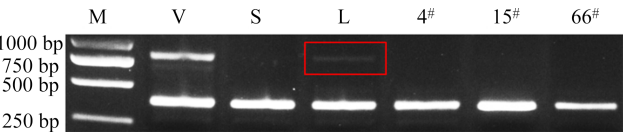
表 3(续)

引物编号 Primer No.	梨橙 Licheng	多倍体 Polyploid			引物编号 Primer No.	梨橙 Licheng	多倍体 Polyploid		
		4 <sup>#</sup> (3x)	66 <sup>#</sup> (3x)	15 <sup>#</sup> (4x)			4 <sup>#</sup> (3x)	66 <sup>#</sup> (3x)	15 <sup>#</sup> (4x)
chr5-2	AB	AB	A	AB	chr5-26	AB	B	AB	B
chr5-3	AB	AB	AB	AB	chr9-2	AB	A	AB	AB
chr5-5	AB	AB	AB	AB	chr9-3	AB	AB	AB	AB
chr5-6	AB	AB	AB	AB	chr9-4	AB	AB	B	AB
chr5-13	AB	B	B	B	chr9-8	AB	B	A	AB
chr5-15	AB	AB	A	A	chr9-14	AB	A	AB	AB
chr5-16	AB	AB	B	B	chr9-15	AB	A	AB	B
chr5-19	AB	AB	B	B	A 型位点数量 Number of A type band loci	/	9	5	9
chr5-22	AB	AB	AB	B	B 型位点数量 Number of B type band loci	/	4	5	14
chr5-25	AB	AB	AB	B	AB 型位点数量 Number of AB type band loci	37	24	27	14

长片段记为 A,短片段记为 B,两条带型记为 AB  
The long segment is marked as A, the short segment is marked as B, the two-band type is marked as AB

2.3 单 / 多胚标记扩增结果

以分子标记 MITE-P2 对伏令夏橙、沙田柚、梨橙以及本次筛选获得的多倍体的基因组 DNA 进行扩增,结果显示,伏令夏橙可扩增出长短两条清晰的带,沙田柚仅能扩增出 1 条短带,梨橙则可扩增出一条清晰短带和模糊的长带(图 4),这可能与梨橙的多胚种子的产生有关。梨橙单胚种子萌发后代 4<sup>#</sup>、15<sup>#</sup> 和 66<sup>#</sup> 均仅扩增出清晰的短片段,未见长片段出现,可能这 3 株多倍体后代产生的种子全为单胚。



M: Marker; V: 伏令夏橙, S: 沙田柚, L: 梨橙, 4<sup>#</sup>: 4 号样品, 15<sup>#</sup>: 15 号样品; 66<sup>#</sup>: 66 号样品。红色方框所示为梨橙基因组 DNA 扩增出的模糊长带  
M: Marker, V: *Citrus sinensis* ‘Valencia’, S: *Citrus grandis* ‘Shatian’, L: *Citrus sinensis* Licheng, 4<sup>#</sup>: Sample No. 4, 15<sup>#</sup>: Sample No. 15, 66<sup>#</sup>: Sample No. 66. The red box indicates the fuzzy long segment amplified by marker MITE-P2 from the genomic DNA of Licheng

图 4 标记 MITE-P2 对不同柑橘材料的扩增结果  
Fig.4 Amplification of different citrus materials by MITE-P2

3 讨论

3.1 梨橙有性多倍体的发生

梨橙可以产生单胚种子,也可以产生多胚种子。分子标记结果显示, MITE-P2 标记对梨橙基因组进行扩增,可以扩增出较模糊的长条带。这可能与梨橙的多胚种子的产生有关,有待后续深入研究。本研究所用 InDel 标记在梨橙基因组中均能扩增出杂合位点,而后代中出现了 A 或 B 类纯合位点,说明等位点发生了分离,这也证实了获得的多倍体是有性胚,而非无性胚。37 对多态性引物对后代进行检测,后代中并未出现新的位点,且有 28 个位点在后代中均发生了分离,这与取样时取中间区域的果实有关,中间区域不容易有其他品种授粉,故材料均为自交产生。

有性生殖过程中产生的多倍体与 2n 配子密切相关,柑橘特别是单胚柑橘类型中发现较多<sup>[24-25]</sup>,且已成为柑橘多倍体获得的主要途径之一<sup>[26]</sup>。2n 配子可在减数分裂的多个时期发生,主要可以分为第 1 次分裂期前加倍 (PRD, pre-meiotic doubling)、第 1 次减数分裂核复原 (FDR, first meiotic division restitution)、第 2 次减数分裂核复原 (SDR, second meiotic division restitution) 以及第 2 次减数分裂后

加倍 (PMD, post-meiotic genome doubling)。PRD、FDR 均会增加  $2n$  配子的杂合度, 其中 FDR 可能会使后代出现亲本的全部杂合位点; SDR 和 PMD 产生的  $2n$  配子传递的杂合性低, 由此产生的后代有较大比例的位点为纯合位点<sup>[27]</sup>。本研究的多倍体的纯合位点的比例较高,  $2n$  配子的纯合位点比例会更高, 可能产生于 SDR 和 PMD。

### 3.2 梨橙有性多倍体的应用前景

多倍体具有较多优良性状, 如器官巨大、有效成分含量高、植株矮化、无核或少核、抗(耐)性较强等<sup>[1-2]</sup>。较多柑橘品种也有多倍体被开发并应用, 如三倍体柑橘品种 Safor 无籽, 且其固酸比明显高于亲本<sup>[28]</sup>; 三倍体柑橘品种 Garbí 除无籽外, 还有晚熟等特点<sup>[29]</sup>; 梁武军等<sup>[30]</sup>通过胚抢救与流式细胞仪倍性检测技术, 获得了 10 个柑橘品种的四倍体、四倍体新种质。周锐等<sup>[31]</sup>也建立了一种初选准确率节省时间的新方法, 发掘了多胚性柑橘四倍体。梨橙为我国自主知识产权的甜橙品种, 至今未见多倍体的开发及应用。梨橙虽然少籽, 但其衍生的多倍体的品质、熟期以及其他性状可能会有所差异。该品种自然条件下可产生有性多倍体, 且比例较高 (4.69%), 作母本与有籽品种杂交, 也可能获得多倍体。这为较多有籽品种的无核化提供了一个较为有效的途径。并且自然发生的三倍体有效缩短了育种周期, 避免了培育四倍体的过程; 也避免了胚乳培养移栽成活困难, 与砧木嫁接亲和性差等问题<sup>[31]</sup>。

在多倍体后代中, 存在四倍体, 目前能产生单胚种子的四倍体柑橘品种非常少<sup>[32]</sup>, 因此本研究为丰富能产生单胚种子的四倍体柑橘种质资源提供了可能性, 且该梨橙产生的四倍体的基因组 DNA 经 MITE-P2 分子标记扩增, 未见类似梨橙扩增出的模糊长带, 可能该四倍体产生的种子全为单胚。

### 参考文献

- [1] 党江波, 宋琴, 李彩, 郭启高, 梁国鲁. 园艺植物中三倍体的应用现状及育种前景分析. 园艺学报, 2018, 45(9): 1813-1830  
Dang J B, Song Q, Li C, Guo Q G, Liang G L. Application status and breeding prospects of triploid in horticultural plant. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45(9): 1813-1830
- [2] 党江波, 梁国鲁, 李彩, 吴岷, 郭启高, 梁森林, 王鹏. 果树多倍体砧木的研究现状与展望. 园艺学报, 2019, 46(9): 1701-1710  
Dang J B, Liang G L, Li C, Wu D, Guo Q G, Liang S L, Wang P. Polyploid rootstock of fruit tree: research status and prospects. Acta Horticulturae Sinica, 2019, 46(9): 1701-1710
- [3] 廖聪学, 程昌凤, 郭树民, 刘昌文, 吴纯清. 优质大果甜橙新品种 - 梨橙. 园艺学报, 2002, 29(4): 395
- [4] Liao C X, Cheng C F, Guo S M, Liu C W, Wu C Q. A large and high quality sweet orange variety 'Licheng'. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29(4): 395
- [5] Britten R J, Rowen L, Williams J, Cameron R A. Majority of divergence between closely related DNA samples is due to indels. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(8): 4661-4665
- [6] Weber J L, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C F, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 2002, 71(4): 854-862
- [7] Alkan C, Coe B P, Eichler E E. Genome structural variation discovery and genotyping. Nature Reviews Genetics, 2011, 12(3): 363-376
- [8] Jander G, Norris S R, Rounsley S D, Bush D F, Levin I M, Last R L. Arabidopsis map-based cloning in the post-genome era. Plant Physiol, 2002, 129(2): 440-450
- [9] Varshney R K, Nayak S N, May G D, Jackson S A. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. Trends in Biotechnology, 2009, 27(9): 522-530
- [10] Li L, Mao D. Deployment of cold tolerance loci from *Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. 'Nipponbare' in a high-yielding indica rice cultivar '93-11'. Plant Breeding, 2018, 137(4): 553-560
- [11] 李群三, 陈景斌, 顾和平, 袁星星, 陈新, 崔瑾. 基于 InDel 标记的国内绿豆品种遗传多样性分析及指纹图谱构建. 植物遗传资源学报, 2019, 20(1): 122-128  
Li Q S, Chen J B, Gu H P, Yuan X X, Chen X, Cui J. Genetic diversity and fingerprint analysis of mungbean varieties from China based on InDel markers. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(1): 122-128
- [12] 王娟, 刘宇, 李春娟, 闫彩霞, 赵小波, 单世华. 基于简化基因组的花生 InDel 标记开发和功能解析. 植物遗传资源学报, 2019, 20(1): 179-187  
Wang J, Liu Y, Li C J, Yan C X, Zhao X B, Shan S H. Development and functional analysis of peanut Insertion and Deletion (InDel) markers based on Genotyping-by-Sequencing (GBS). Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(1): 179-187
- [13] 吉康娜, 邰俊杰, 林丹妮, 颜爽爽, 田时炳, 曹必好, 邱正坤. 基于茄子基因组重测序的 InDel 标记开发及应用. 植物遗传资源学报, 2019, 20(5): 1278-1288  
Ji K N, Zhi J J, Lin D N, Yan S S, Tian S B, Cao B H, Qiu Z K. Development and application of eggplant InDel markers based on whole genome Re-sequencing Datasets. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(5): 1278-1288
- [14] 刘源霞, 兰进好, 柏素花, 孙晓红, 刘春晓, 张玉刚, 戴洪义. 苹果抗炭疽菌叶枯病基因 SNP 和 InDel 标记的 HRM 筛选. 园艺学报, 2017, 44(2): 215-222  
Liu Y X, Lan J H, Bai S H, Sun X H, Liu C X, Zhang Y G, Dai H Y. Screening of SNP and InDel markers to glomerella leaf spot resistance gene locus in apple using HRM technology. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(2): 215-222
- [15] 孙世航, 林苗苗, 齐秀娟, 孙雷明, 钟云鹏, 方金豹. 应用 InDel 标记进行软枣猕猴桃杂交子代真实性鉴定. 果树学报, 2018, 35(1): 32-37  
Sun S H, Lin M M, Qi X J, Sun L M, Zhong Y P, Fang J B. Application of InDel markers on progeny identification in



- Actinidia arguta*. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 35(1): 32-37
- [15] 王珏, 王燕, 张静, 陈涛, 王磊, 陈清, 汤浩茹, 王小蓉. 中国樱桃 InDel 标记开发及其在蔷薇科果树中通用性评价. 园艺学报, 2020, 47(1): 98-110  
Wang J, Wang Y, Zhang J, Chen T, Wang L, Chen Q, Tang H R, Wang X R. Development of insertion-deletion (InDel) markers based on whole-genome sequencing data in Chinese cherry and their transferability in rosaceae fruit trees. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(1): 98-110
- [16] 中国农业科学院柑橘研究所. 柑桔单胚类型的调查. 中国南方果树, 1975(4): 1-5  
Citrus Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences. Investigation on types of *Citrus* single embryo. South China Fruits, 1975(4): 1-5
- [17] Wang X, Xu Y T, Zhang S Q, Cao L, Huang Y, Cheng J F, Wu G Z, Tian S L, Chen C L, Liu Y, Yu H W, Yang X M, Lan H, Wang N, Wang L, Xu J D, Jiang X L, Xie Z Z, Tan M L, Larkin R M, Chen L L, Ma B G, Ruan Y J, Deng X X, Xu Q. Genomic analyses of primitive, wild and cultivated citrus provide insights into asexual reproduction. Nature Genetics, 2017, 49: 765-772
- [18] 梁森林, 党江波, 梁国鲁, 郭启高. 天然四倍体枇杷 'B431' 减数分裂观察及育性分析. 园艺学报, 2018, 45(10): 1895-1904  
Liang S L, Dang J B, Liang G L, Guo Q G. Meiosis observation and fertility analysis in natural tetraploid loquat of 'B431'. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45(10): 1895-1904
- [19] 党江波, 梁国鲁, 郭启高, 李晓林, 孙海艳, 何桥. 适于对多种植物进行倍性鉴定的缓冲液及制备、使用方法: CN106248561B, 2020-07-10  
Dang J B, Liang G L, Guo Q G, Li X L, Sun H Y, He Q. Buffer suitable for ploidy identification of various plants and preparation and use methods: CN106248561B, 2020-07-10
- [20] 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰. 植物有丝分裂染色体标本制作的新方法. 植物学报, 1979, 21(3): 297-298  
Chen R Y, Song W Q, Li X L. A new method for preparing mitotic chromosomes from plant. Journal of Integrative Plant Biology, 1979, 21(3): 297-298
- [21] 施维属, 潘腾飞, 钟凤林, 潘东明, 李开拓, 王江波, 郭志雄, 刘天亮. 柑橘基因组 DNA 快速提取及 ISSR-PCR 扩增体系优化. 生物技术通报, 2009(10): 109-113  
Shi W S, Pan T F, Zhong F L, Pan D M, Li K T, Wang J B, Guo Z X, Liu T L. Improvement of genomic DNA extraction method and optimization of ISSR-PCR amplification for citrus. Biotechnology Bulletin, 2009(10): 109-113
- [22] 韩国辉, 向素琼, 汪卫星, 魏旭, 何波, 李晓林, 梁国鲁. 沙田柚杂交后代群体的 SSR 鉴定与遗传多样性分析. 中国农业科学, 2010, 43(22): 4678-4686  
Han G H, Xiang S Q, Wang W X, Wei X, He B, Li X L, Liang G L. Identification and genetic diversity of hybrid progenies from Shatian pummelo by SSR. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(22): 4678-4686
- [23] 鲍思元. DNA 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的实验教学改革. 实验科学与技术, 2015, 13(2): 122-124  
Bao S Y. Improvement of DNA denaturing polyacrylamide gel electrophoresis in experiment teaching. Experiment Science and Technology, 2015, 13(2): 122-124
- [24] Chen C X, Lyon M T, O'Malley D, Federici C T, Gmitter J, Grosser J W, Chaparro J X, Roose M, Gmitter J F G. Origin and frequency of 2n gametes in *Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliata* and their reciprocal crosses. Plant Science, 2008, 174(1): 1-8
- [25] Aleza P, Juárez J, Cuenca J, Ollitrault P, Navarro L. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2x × 2x sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. Plant Cell Reports, 2010, 29(9): 1023-1034
- [26] Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Froelicher Y. Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. Plant Breeding Reviews, 2008, 30: 323-352
- [27] Houssem R, José C, Luis N, Patrick O, Pablo A. Unreduced megagametophyte production in lemon occurs via three meiotic mechanisms, predominantly second-division restitution. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1211
- [28] José C, Aleza P, José J, Pina J A, Navarro L. 'Safor' mandarin: a new citrus mid-late triploid hybrid. HortScience, 2010, 45(6): 977-980
- [29] Aleza P, Cuenca J, Juárez J, Pina J A, Navarro L. 'Garbí' mandarin: a new late-maturing triploid hybrid. HortScience, 2010, 45(1): 139-141
- [30] 梁武军, 解凯东, 郭大勇, 谢宗周, 徐强, 伊华林, 郭文武. 柑橘 10 个品种实生后代多倍体的发掘与 SSR 鉴定. 园艺学报, 2014, 41(3): 409-416  
Liang W J, Xie K D, Guo D Y, Xie Z Z, Xu Q, Yi H L, Guo W W. Spontaneous generation and SSR characterization of polyploids from ten citrus cultivars. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(3): 409-416
- [31] 周锐, 解凯东, 王伟, 彭珩, 谢善鹏, 胡益波, 伍小萌, 郭文武. 依据多倍体形态特征快速高效发掘柑橘四倍体. 园艺学报, 2020, 47(12): 2451-2458  
Zhou R, Xie K D, Wang W, Peng J, Xie S P, Hu Y B, Wu X M, Guo W W. Efficient identification of tetraploid plants from seedling populations of apomictic citrus genotypes based on morphological characteristics. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(12): 2451-2458
- [32] 解凯东, 王惠芹, 王晓培, 梁武军, 谢宗周, 伊华林, 邓秀新, Grosser Jude W, 郭文武. 单胚性二倍体为母本与异源四倍体杂交大规模创制柑橘三倍体. 中国农业科学, 2013, 46(21): 4550-4557  
Xie K D, Wang H Q, Wang X P, Liang W J, Xie Z Z, Yi H L, Deng Xi X, Grosser J W, Guo W W. Extensive citrus triploid breeding by crossing monoembryonic diploid females with allotetraploid male parents. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(21): 4550-4557