

桃远缘杂种的获得及杂种胚抢救技术

刘文¹, 陈学森^{1*}, 刘冠军², 吴燕¹

(¹ 山东农业大学果树生物学实验室, 山东泰安 271018; ² 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东泰安 271018)

摘要: 以桃为母本, 与经过处理的李、杏花粉进行远缘杂交, 成功地对杂种幼胚进行了胚抢救, 并对部分杂种进行了分子鉴定。研究表明, 在以‘雨花露’为母本的杂交组合中, 杂种胚的败育发生于授粉后第7周, 而以‘中华寿桃’为母本的杂交组合中, 杂种胚的败育开始于授粉后第8周; 以早熟桃品种‘雨花露’为母本的杂种胚 PF (胚长/种子长) 值为 0.5 时幼胚萌发率仅为 6.7%, 而以晚熟品种‘中华寿桃’为母本的杂种胚 PF 值为 0.5 时幼胚萌发率却大于 50%; 适宜场强的静电场处理父本花粉后可显著提高杂种胚培苗多丛芽诱导增殖效率, 而父本花粉经过 ⁶⁰Co 射线照射后得到的胚培苗, 多丛芽诱导效果较差, 组培苗长势较弱; 在胚抢救技术体系中, 杂种胚最佳萌发及生长培养基为 $1/2MS + 6-BA\ 4\ mg \cdot L^{-1} + BA\ 0.5\ mg \cdot L^{-1}$, 胚萌发及分化率达 90%; 最佳多丛芽诱导及增殖培养基为 $MS + 6-BA\ 1.0\ mg \cdot L^{-1} + BA\ 1.0\ mg \cdot L^{-1}$, 最佳生根培养基为 $MS + IAA\ 0.5\ mg \cdot L^{-1} + NAA\ 0.2\ mg \cdot L^{-1}$; SSR 技术对杂种鉴定结果表明, 所获杂种为真杂种。

关键词: 桃; 李; 杏; 远缘杂交; 胚抢救; SSR

中图分类号: S 662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 01-0029-06

Interspecific Hybridization of *Prunus persica* with *P. ameniaca* and *P. salicina* Using Embryo Rescue

LIU Wen¹, CHEN Xue-sen^{1*}, LIU Guan-jun², and WU Yan¹

(¹ Fruit Biology Laboratory, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; ² College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: Some interspecific hybrids were obtained after hybridization of *Prunus persica* with treated pollens from *P. ameniaca* and *P. salicina*, then the hybrid embryos were successfully rescued, and a molecular identification was made in part of the hybrids. The results showed that the hybrid embryo abortion started from the 7th or 8th week after pollination in cross when used the Yuhualu or Zhonghua Shoutao as the female parent. The cultivars with different durations for fruit development and the ages of hybrid embryos have great effects on the rate of embryo germination and growth. At the same age (when the PF value was around 0.5), the late peach cultivar Zhonghua Shoutao acquired more than 50% of embryo germination rate, but the early peach cultivar Yuhualu gave only 6.7% of it. Treatment of male parent pollen in the electrostatic field at an appropriate dosage improved the efficiency of bud inducement and multiplication, but treatment with ⁶⁰Co - ray reduced the efficiency and produced weak buds. For rescuing the hybrid embryos, it is concluded that the medium $1/2MS + 6-BA\ 4\ mg \cdot L^{-1} + BA\ 0.5\ mg \cdot L^{-1}$ can increase the embryo germination rate up to 90%, the $MS + 6-BA\ 1.0\ mg \cdot L^{-1} + BA\ 1.0\ mg \cdot L^{-1}$ is the best medium for bud induction and multiplication, and the $MS + IAA\ 0.5\ mg \cdot L^{-1} + NAA\ 0.2\ mg \cdot L^{-1}$ is the best rooting medium. SSR identification proves that the hybrids obtained by the embryo rescuing system are true ones.

Key words: *Prunus persica* L.; *Prunus salicina* Lindl.; *Prunus ameniaca* Lam.; Interspecific hybridization; Embryo rescue; SSR

收稿日期: 2006 - 04 - 01; 修回日期: 2006 - 10 - 17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471196)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: chenxs@sdau.edu.cn)

在核果类果树中, 桃 (*Pnusus persica* L.) 的品种全部为自交亲和的, 而杏 (*P. ameniaca* Lam.) 和李 (*P. salicina* Lindl) 绝大多数品种是自交不亲和的。为了探讨桃自交亲和基因的遗传, 并培育自交亲和的李、杏新种质, 在已有研究工作的基础上, 以桃为母本与用静电场和 ^{60}Co 射线照射等方法处理过的李、杏花粉进行杂交, 对杂种幼胚进行了胚抢救, 研究并建立了桃胚抢救技术体系, 并对杂种胚培苗进行了分子鉴定。

1 材料与方法

1.1 杂交授粉

试验于 2003 ~ 2004 年在山东农业大学果树生物学实验室、泰安市南许果园及山东农业大学泰安横岭果树育种基地进行。母本为 ‘中华寿桃’ 及 ‘雨花露’ 桃, 父本为 ‘新世纪’ 杏、‘莫尔特尼’ 李和 ‘总统’ 李。根据父母本花期, 分别进行温室催花或采集田间大蕾期的花粉, 室温 (20) 条件下阴干, 置于干燥器中在 1 ~ 2 冰箱中保存备用。父本花粉分别使用高压静电场、 ^{60}Co 射线照射处理 (图 1)。授粉前测定各父本花粉的离体萌芽率。授粉后 1 ~ 10 周调查各杂交组合中杂种胚发育情况, 每周调查一次, 以种胚的发育情况为指标, 确定杂种胚败育及胚抢救的时期。

1.2 远缘杂种胚抢救技术体系的建立

以部分杂种桃幼胚为试材, 以 MS、1/2MS、Tukey 为基本培养基, 附加不同浓度的植物生长调节剂, 35 g · L⁻¹ 蔗糖, 6.5 g · L⁻¹ 琼脂, pH 调至 5.8, 进行预备试验, 筛选出适合胚萌发及生长的培养基。将杂种果实在 70% 酒精中浸泡 30 s, 再用 10% 次氯酸钠灭菌 8 ~ 10 min, 取出种胚接种于试管中。光照 2 000 lx, 12 h · d⁻¹, 温度 (25 ± 2) 。将胚培新梢接种在 MS 附加不同浓度的 6-BA、IAA 及 BA 的培养基上, 进行胚培苗的多丛芽诱导与再增殖培养。将真叶数大于 5, 高度大于 2 cm 的杂种多丛芽新梢接种在 MS 附加不同浓度 IAA 及 NAA 的培养基上, 进行生根培养。

1.3 胚培养杂种幼苗的分子鉴定

采用 CTAB 法提取胚培杂种幼苗和它们亲本的幼叶的基因组 DNA, 电泳法检测 DNA 浓度和质量。8 对多态性理想的 SSR 引物均筛选自桃基因组和 BAC 文库 (Streiff et al, 1998; Sosinski et al, 2000; Dirlewanger et al, 2002)。

2 结果与分析

2.1 静电场和 ^{60}Co 射线处理对父本花粉离体萌芽率的影响

由图 1 可知, 与 射线处理相比, 多数强度的电场处理可显著促进花粉萌芽率, 其中以 333.33 和 434.78 kV · m⁻¹ 处理效果明显, 这表明一定剂量的静电场处理可帮助克服受精前障碍。但 射线处理, 尤其是处理强度高于 150 Gy 剂量的射线对父本花粉的离体萌芽未产生明显正效应。

2.2 杂种胚败育时期的确定

授粉后 1 ~ 3 周杂交果大量脱落, 表现为受精前杂交不亲和; 授粉后 4 ~ 5 周杂交果数目变化较小且果个略有增大, 但剥开后未见种胚, 仅见受源花粉刺激而产生的膨大子房; 授粉后 6 ~ 10 周杂

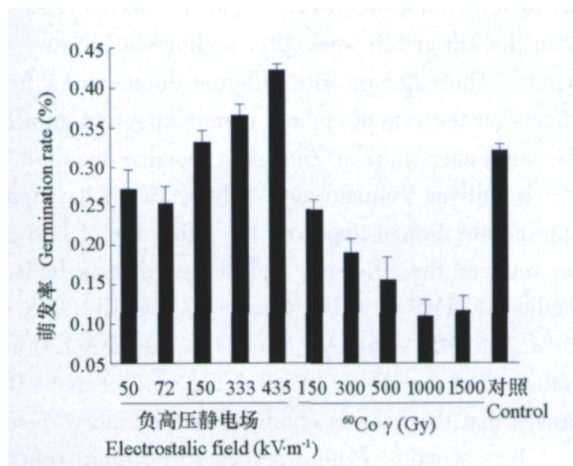


图 1 不同处理剂量下 ‘新世纪’ 花粉的离体萌芽率

Fig 1 The pollen germination rate in vitro of Xinshiji apricot treated with different dosages

交果又大量脱落，表现受精后杂交不亲和，切开后可见变褐且浆糊状的胚乳，而自然授粉得到的果实中有正常发育的幼胚与乳白色的胚乳。在‘雨花露’为母本的杂交组合中，从第7周开始出现胚乳变褐以及幼胚退化现象，而‘中华寿桃’为母本的组合中，胚乳变褐及幼胚退化的时间开始于第8周。

2.3 母本品种及其胚龄对杂种胚萌发的影响

由表1可以看出，胚龄越长，PF值（胚长/种子长）越大，胚萌发及生长率越高。但PF值相同时，果实发育期不同的品种，其胚萌发及生长率差异甚大。上述结果表明，果实发育期的长短及其胚龄的大小对远缘杂种幼胚萌发及生长率影响很大。

2.4 父本花粉处理对杂种胚培苗多丛芽诱导与增殖的影响

杂种幼胚（父本花粉经过不同处理）经过萌发生长培养后，接种在适宜植物生长调节剂浓度的培养基上进行多丛芽诱导与增殖，连续培养3代，每世代取20个芽记录增殖的多丛芽总数量，计算其平均增殖效率。对‘中华寿桃’杂种的调查结果见表2，花粉经过电场处理后得到的杂种胚培苗，多丛芽诱导数明显多于对照和⁶⁰Co射线照射处理，且芽体长势好，其中以父本为新世纪的杂种多丛芽诱导增殖效率最高；而父本花粉经过⁶⁰Co射线照射后得到的杂种胚培苗，多丛芽诱导及增殖情况较差，丛芽数少，生长畸形或退化为愈伤组织（图版，1~3）。

2.5 胚抢救技术的建立

2.5.1 杂种胚萌发及生长 基本培养基对杂种胚的萌发及生长影响很大，在1/2MS培养基上胚的萌发率最高（70.12%），且胚梢生长健壮，叶片数多；在MS培养基上萌发率为57.5%；而在Tukey培养基上萌发率仅为35.0%，接种后10d才见胚膨大变绿，13d后见真叶，胚梢长势较弱，部分叶片卷曲（图版，4~6）。由此可知，1/2MS培养基是桃远缘杂种胚萌发及生长的适宜培养基。

由表3可以看出，细胞分裂素（6-BA）对桃远缘杂种幼胚萌发率影响很大，且6-BA浓度越大，

表1 果实发育期不同的品种及其胚龄对杂种胚萌发及生长的影响

Table 1 Effect of peach cultivars with different durations for fruit development and the embryo age on embryo germination and growth

母本 Female parents	胚龄 Embryo age (week)	PF	胚萌发率 Germination rate (%)
中华寿桃	5	0	0
Zhonghua	6	0	0
Shoutao	8	0.0~0.3	15.5
	10	0.3~0.5	58.6
	12	0.5~0.8	86.2
	13	0.8	100.0
雨花露 Yuhualu	5	0	0
	6	0	0
	7	0.0~0.3	0
	8	0.3~0.5	6.7
	9	0.5~0.8	52
	10	0.8~1.0	80

表2 三世代的平均增殖效率

Table 2 The average coefficient multiplication of three generations

处理 Treatments	父本 Female parents			
	‘新世纪 杏 Xinshiji apricot	‘总统 李 President plum	‘莫尔特尼 李 Morettini plum	
电场 Electrostatic field	7.6	5.0	6.3	
⁶⁰ Co	4.1	2.8	4.0	
对照 Control	6.6	3.5	4.5	

表3 不同6-BA、IBA和IAA组合对远缘杂种胚萌发及生长的影响

Table 3 Effect of 6-BA, IBA and IAA combinations on peach embryo germination and growth

处理 Treatments(mg·L ⁻¹)			萌发率 Germination rate (%)	真叶数 Number of true leaves	苗高 Average height (cm)
6-BA	BA	IAA			
1	0.5	0	50	5.3	1.00
2	0.5	0	60	17.4	1.12
3	0.5	0	70	12.1	1.56
4	0.5	0	90	16.0	1.85
1	0	0.5	30	4.4	0.89
2	0	0.5	60	6.5	1.20
3	0	0.5	60	10	1.74
4	0	0.5	80	12	1.70

注：真叶数=总真叶数/接种总数。

Note: Number of true leaves = total number of true leaves/number of explants

杂种胚萌发率越高，当 6-BA 浓度为 $4\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，杂种胚萌发率最高（90%），而 6-BA 浓度对胚培养的生长状态（真叶数及苗高）影响不大。本试验筛选出 6-BA $4\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 BA $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为桃远缘杂种幼胚萌发及生长的最佳植物生长调节剂配比。

2.5.2 杂种胚培养多丛芽诱导与增殖培养 由表 4 可以看出，较低浓度的 6-BA 和生长素，对诱导多丛芽的培养效果较差，增殖系数低，产生的多丛芽很少，芽体长势一般；高浓度的 6-BA 和生长素，对再生多丛芽的效果很好。本试验筛选出 6-BA $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组合进行多丛芽的诱导增殖培养。

2.5.3 杂种胚培养苗的生根培养 如表 5 所示，IAA $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组合对桃远缘杂种的生根效果最为理想，根形态好，侧根多（图版，7）。而以 NAA 单独诱导生根，仅生成基部膨大粗短的寄生根，且根量少，无侧根。

表 4 不同 6-BA、IBA 和 IAA 对比对杂种胚培养多丛芽诱导及增殖的影响

Table 4 Effect of 6-BA, IBA and IAA combinations on bud inducement and multiplication in hybrids

处理 Treatments($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			增殖系数 Coefficient of multiplication	平均生长量 Average height (cm)
6-BA	BA	IAA		
0.5	1	0	4.5	1.20
1.0	1	0	8.0	3.55
1.5	1	0	6.2	2.87
2.0	1	0	8.5	2.50
0.5	0	1	3.9	1.56
1.0	0	1	7.6	2.98
1.5	0	1	5.2	2.50
2.0	0	1	7.1	2.60

表 5 IAA、NAA 对杂种苗生根的影响

Table 5 Effect of IAA and NAA combinations on shoot rooting of peach hybrid

处理 Treatments ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		增殖系数 Coefficient of multiplication	平均生长量 Average height (cm)
IAA	NAA		
1.0	0	3	6.7
1.5	0	5	7.0
0	1.0	3	4.5
0	1.5	2	2.3
0.5	0.2	8	8.0
0.5	0.5	5	7.6

2.6 杂种胚培养苗的分子鉴定

对杂种胚培养苗进行 SSR 检测结果为，在‘中华寿桃’ × ‘新世纪’杏的杂交组合中，杂种拥有母本的 5 条特异带，同时拥有父本的 2 条特异带；在‘中华寿桃’ × ‘总统’李和‘中华寿桃’ × ‘莫尔特尼’李的杂交组合中，杂种同样继承了父母的特异带（图 2），由此可以确定杂种的真实性。

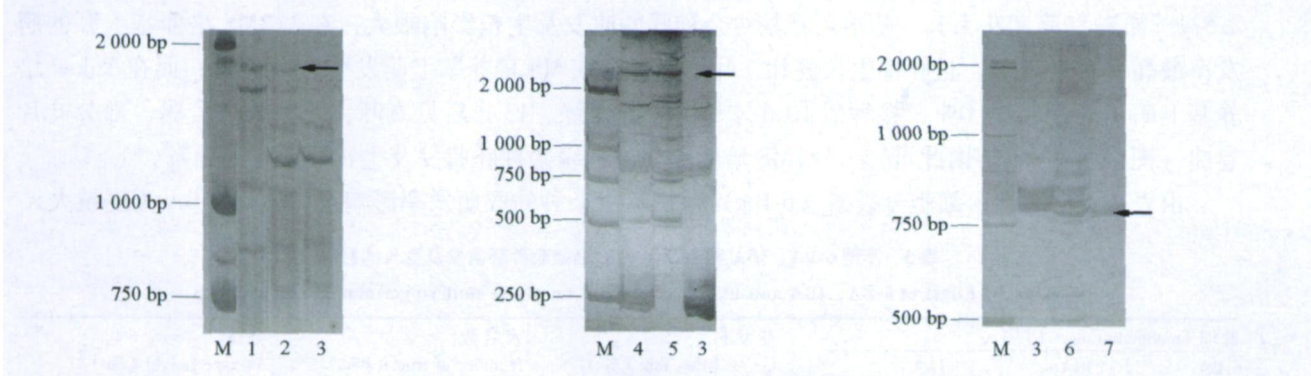


图 2 杂种胚培养苗的 SSR 分子鉴定

M. DL 2000; 1. ‘新世纪’杏; 2. ‘中华寿桃’ × ‘新世纪’杏; 3. ‘中华寿桃’; 4. ‘中华寿桃’ × ‘总统’李; 5. ‘总统’李; 6. ‘中华寿桃’ × ‘莫尔特尼’李; 7. ‘莫尔特尼’李。

Fig 2 Molecular identification of hybrid peach shoots with SSR

M. DL2000; 1. Xinshiji apricot; 2. Zhonghua Shoutao peach × Xinshiji apricot; 3. Zhonghua Shoutao peach; 4. Zhonghua Shoutao peach × President plum; 5. President plum; 6. Zhonghua Shoutao peach × Morettini plum; 7. Morettini plum.

3 讨论

3.1 果实发育期及胚龄对胚萌发、生长的影响

核果类果树的早熟或极早熟品种, 由于果实发育期短, 胚发育不完全, 常规层积播种很难成苗, 而胚培养或胚抢救技术的产生在育种中发挥了重要作用。

有研究表明, 胚龄是影响胚培养成功的关键因素之一 (Alberto et al, 1994)。Yang等 (2004) 研究结果表明, 胚龄对李、杏远缘杂种胚培养影响较大, 适当延长杂种胚抢救时间可有效提高杂种萌芽率。

本试验发现, 胚龄 (PF值) 相同时, 果实发育期不同的品种, 其胚萌发及生长率差异甚大。此外, 在杂种胚的发育过程中, 败育现象一直潜在, 胚抢救的时期应在败育开始直到果实成熟, 并尽量将时间延后 (PF > 0.5), 这样可以在更大范围内以更高的成功率挽救杂种胚。

3.2 培养基及低温处理对杂种幼胚萌发及生长的影响

远缘杂种胚培养成功与否, 与培养基及添加植物生长调节剂的种类、浓度有关 (Hirsch et al, 2001; Roy et al, 2004)。本试验中, 杂种幼胚接种在 1/2MS培养基上萌发生长表现较好, 与前人试验结论 (朱际君等, 1983; 陈学森等, 1996) 基本一致。

核果类果树的幼胚培养成功的另外一个关键因素就是胚的低温处理。研究表明, 桃胚培养时需要在 2~4℃ 低温下处理种胚 70 d 才能打破休眠 (Wang et al, 2004)。本试验中, 桃远缘杂种在 2~4℃ 低温下处理 30 d 后将胚接种在萌发培养基上, 附加了较高浓度 ($4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 6-BA 促进幼胚萌发, 并得到了较高的萌发率 (90%), 这与杂种幼胚低温处理时间不够 (< 70 d), 未能彻底解除休眠有很大关系。

3.3 父本花粉处理对杂种胚培苗多丛芽诱导增殖的影响

本试验中发现电场不仅可以提高花粉离体萌芽率, 在一定程度上克服远缘杂交不亲和性, 而且这一效应也反应在受精后的胚性生长上。

有研究报道, 用一定剂量的 ^{60}Co 射线处理水稻和小麦等农作物花粉, 提高了杂交亲和性 (庞伯良和万贤国, 1998; 李桂英等, 2003)。但我们发现本试验所用的辐射剂量无论对花粉还是对杂种的胚性生长都未产生促进作用, 而且杂种胚培苗长势较弱, 多丛芽诱导及增殖情况较对照差, 因此电场及辐射处理所引起的遗传、生理及分子机制有待进一步研究。

References

- Alberto C Q P, Pinto Q, Suzanne M, David H. 1994. Growth of immature peach embryos in response to media, ovule support method, and ovule perforation. *Horticultural Science*, 29: 1081 - 1083.
- Chen Xue-sen, Zhang Yan-min, Zhang Lian-zhong. 1996. Breeding of very early ripening apricot. *Acta Horticulturae Sinica*, 23 (1): 3 - 5. (in Chinese)
- 陈学森, 张艳敏, 张连忠. 1996. 特早熟杏的育种. *园艺学报*, 23 (1): 3 - 5.
- Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana M J, Izat C, Zanetto A, Arus P, Laigret F. 2002. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 105: 127 - 138.
- Hirsch A M, Testolin R, Brown S, Chat J, Fortune D, Bureau J M, De Nay D. 2001. Embryo rescue from interspecific crosses in the genus *Actinidia* (kiwifruit). *Plant Cell Rep.*, 20: 508 - 516.
- Li Gui-ying, Wang Lin-qing, Shi Jin-guo. 2003. Dual effect of low dose of irradiation on wheat \times *Leymus angustus*: enhancement and damage. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 17 (3): 184 - 186. (in Chinese)
- 李桂英, 王琳清, 施巾帼. 2003. 低剂量辐射对小麦与窄颖草属间杂交的促进与损伤双重效应. *核农学报*, 17 (3): 184 - 186.
- Pang Bo-liang, Wan Xian-guo. 1998. Mutagenic effects of Ar^+ , FR laser and gamma-ray radiation on rice. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*,

12 (1): 12 - 15. (in Chinese)

庞伯良, 万贤国. 1998 射线与激光复合处理对水稻的诱变效果及其应用. 核农学报, 12 (1): 12 - 15.

Roy A K, Malaviya D R, Kaushal P, Kumar B, Tivari I A. 2004. Interspecific hybridization of *Trifolium alexandrinum* with *T. constantinopolitanum* using embryo rescue. Plant Cell Rep., 22: 705 - 710.

Sosinski B, Gannavarapu M, Hager L D, Beck L E, King G J, Ryder C D, Rajapakse S, Baird W V, Ballard R E, Abbott A G. 2000. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. Theor Appl Genet., 101: 421 - 428.

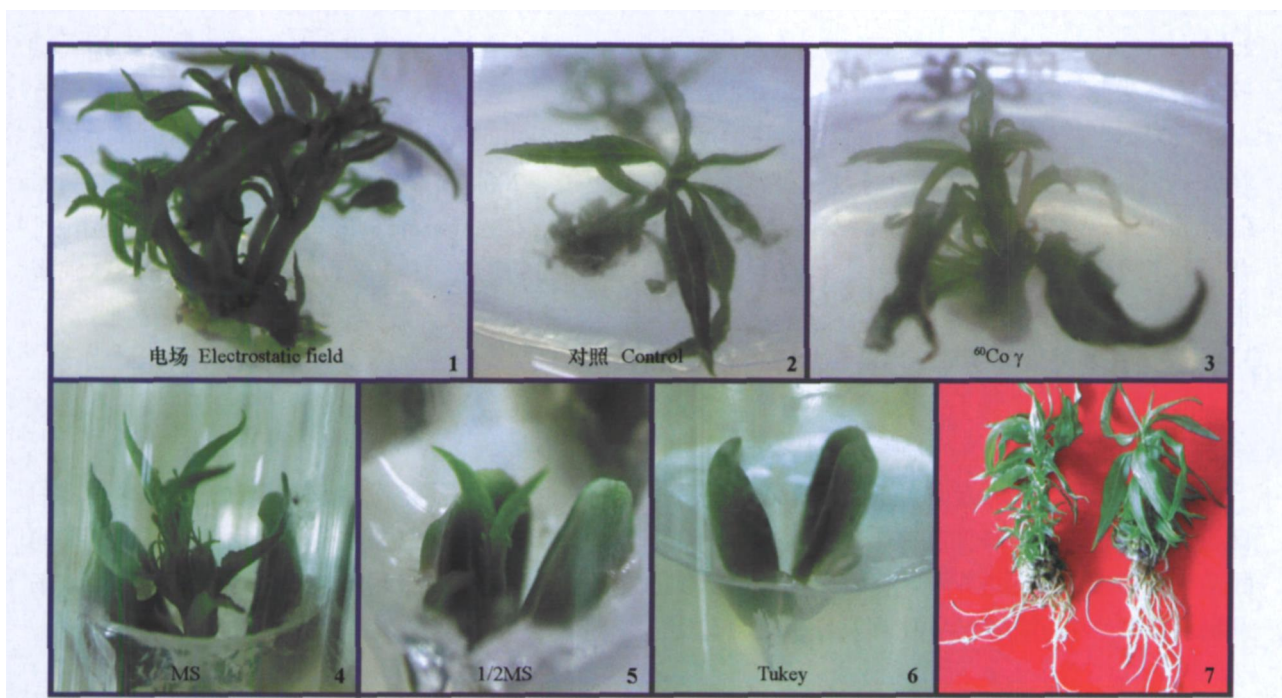
Streiff R, Labbe T, Bacilieri R, Steinkellner H, Glossl J, Kremer A. 1998. Within-population genetic structure in *Quercus robur* L., and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. Mol Ecol., 7: 317 - 328.

Wang Y Z, Sun H Y, Yang L. 2004. Progress of embryo culture in stone fruit breeding. Journal of Fruit Science, 21: 59 - 63.

Yang H H, Chen X S, Li Y H, Feng B C, Mu X J. 2004. Creating new germplasm by distant hybridization in stone fruits. Effects of different treatments on cross compatibility of distant hybridization in stone fruits. Agricultural Sciences in China, 3: 584 - 589.

Zhu Ji-jun, Huang He-ming, Wang Zu-hua. 1983. Study on embryo culture of early peach. Agricultural Sciences in Jiangsu, (9): 33 - 35. (in Chinese)

朱际君, 黄鹤鸣, 汪祖华. 1983. 桃早熟品种种胚培养技术研究. 江苏农业科学, (9): 33 - 35.



图版说明: 1~3. 不同处理对胚苗多丛芽诱导与增殖的影响; 4~6. 杂种胚在不同培养基上的生长状况; 7. 杂种胚培苗生根。

Explanation of plates: 1 - 3. Effect of pollen treatment on bud induction and multiplication; 4 - 6. The growth of hybrids on different medium; 7. Rooting of hybrid shoots MS + IAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.