

柑橘育种新技术综述

吴初超, 赵小龙

(广西柑桔研究所, 广西 桂林 541004)

摘要:柑橘是世界第一大水果,世界三大贸易农产品之一,其新品种的选育一直是育种工作者奋斗的目标。文章介绍了在生物技术快速发展的今天,广大科研工作者在柑橘育种上应用的新技术,包括组织培养育种技术,体细胞杂交技术,转基因育种技术等。

关键词:柑橘; 育种; 组织培养; 体细胞杂交; 转基因

柑橘常规育种方法主要有引种、芽变育种、杂交育种、实生选种和诱变育种等。柑橘大多数的品种具有多胚性(polyembryony),而世界消费追求无籽性状。因此,现在柑橘多数栽培品种存在不同程度的性器官败育。这导致了柑橘品种选育中,芽变选种占了很大的比重,特别是脐橙和温州蜜柑,新品种的获得基本上都是靠芽变选种与实生选种途径。由于引种简单易行,倍受柑橘育种家的青睐,引种也在柑橘品种选育当中占了很重要的位置。20世纪初,美国开展杂交育种,随后,世界各国科研工作者也一直在进行柑橘杂交育种的工作,其亲本选择主要集中在单胚性品种当中。而诱变育种应用则相对较少。但就以上几种柑橘育种方法而言,由于柑橘存在童期长、远缘不亲和、性器官败育等问题,再加上育种目标的不可确定性,使得以上几种育种方法难以满足现代经济社会柑橘产业品种发展的要求。如何快速得到既定目标柑橘品种并很快应用于生产,已经成为柑橘育种学家亟待解决的问题。随着组织培养技术与生物技术的日益突破,柑橘育种技术得到了飞速发展,其中包括组织培养技术育种,体细胞杂交育种,遗传转化育种等。

1 组织培养育种

果树组织培养(Tissue Culture)是指从果树作物上取出器官、组织、细胞或原生质体等材料,在无菌的条件下利用人工培养基对其进行培养,使之生存并维持其结构和功能的方法和技术。

1.1 体细胞变异育种

种质材料在离体保存前后遗传相对稳定是离体保存的基本要求。但是,在实际保存过程中,植物的离

体保存种质都存在一定的比例变异,这些变异对种质资源保存是不利的,但对育种来讲其中一些变异可能是有利的。柑橘离体种质资源保存包括腋芽、茎尖、叶、根、单细胞、原生质体、愈伤组织等。所以可以利用离体材料再生达到育种目的。如张俊娥等在柑橘愈伤组织再生过程中观测到一定数量变异^[1]。

1.2 胚抢救育种

有别于其它作物,柑橘及其近缘属大多数种和品种的珠心胚现象,导致了杂交育种中合子胚的退化和败育严重。在柑橘育种的过程中,为了克服多胚性的干扰,可以利用胚的离体培养技术,进行离体胚的抢救。与此同时,多胚性柑橘品种杂种苗比率一般很低。对多胚性强的品种来说,受精几乎完全退化,所以利用胚抢救技术可以大大提高杂种苗比率。

柑橘的珠心胚具有和母体一样的遗传特性,利用珠心胚可以进行无病毒苗的繁殖。同时,珠心胚也存在无性分离的“芽变”,通过实生苗的选种可以获得原品种的新生系或是更优良的品种,故珠心胚在柑橘育苗上具有很重要的意义。世界柑橘育种如今向无籽方向发展,利用二倍体和四倍体进行杂交获得三倍体植株是最为有效的途径。但是2x和4x进行杂交的过程中,合子胚一般是早期败育的,因此只有利用幼胚的培养技术,才可以达到三倍体育种的目的。

2 体细胞杂交育种

体细胞杂交技术即原生质体融合技术。植物原生质体由于无细胞壁,不仅是进行细胞学、遗传学、病理学、生理学等基础研究的好材料,而且也是进行作物改良的理想材料。它可以在一定程度上克服常规育种

的某些局限性,扩大植物变异范围。在果树育种过程中,柑橘原生质体融合是最成功的,现在已经得到了多个融合组合品种。但研究表明,融合杂种多难以直接成为商业接穗品种,但其作为砧木改良具有一定的潜力。近年来,主要针对以下几个方面开展研究。

2.1 砧木的抗性育种

现有砧木都因存在某一方面的缺陷而限制了应用范围,甚至因某些不足给柑橘产业造成毁灭性的灾害。柑橘原生质体融合策略之一就是具有互补抗性的双亲融合在一起,以期得到抗性互补的体细胞杂种。柑桔生产大国巴西、美国和中国都制定了相应的柑橘育种计划。针对酸橙不耐柑橘衰退病(*Citrus tristeza virus*, CTV)的缺点,美国目前已成功地得到了抗CTV的酸橙+柠檬和酸橙+橙橙杂种^[2]。另外,还得到了抗寒、耐盐、抗柑橘裂皮病(CEV)以及矮化等优良性状的四倍体体细胞杂种,这些杂种作为砧木评价正在进行中^[3]。来檬是巴西柑橘产区的主要砧木,嫁接其上的接穗品种具有早实及品质优良的特点,但其易感柑橘枯萎病(*Citrus blight disease*), Mendes-da 等(2000)^[4]用兰普(Rangpur)来檬与对枯萎病有抗性的 Caipira 甜橙和印度酸橘融合,获得了具有抗性的体细胞杂种,成为很有潜力的候选砧木。另外,柑橘近缘种是一个巨大的抗性资源库,Guo 和 Deng(1998)^[5]成功地得到柑橘与九里香族间体细胞杂种,如果表现正常,则可作为砧木在黄龙病疫区加以推广。柑橘与其它近缘属植物(如黄皮、澳洲指橘、豪壳刺、酒饼勒等)之间的融合也获得了成功。

2.2 培育三倍体品种

1980年和1985年,Soost 等用同源四倍体葡萄柚与酸柚杂交培育出了“Oroblance”和“Melgold”两个三倍体品种。而体细胞杂种花粉可育,且比同源四倍体花粉育性高、开花早,这就为体细胞杂种作为父本进一步选择优良类型提供了可能。Jia 等(1993)以伏令夏橙+Key 来檬和哈姆林甜橙+飞龙枳的体细胞杂种作为父本,将其花粉授于单胚二倍体品种,离体培养后获得的植株大部分是三倍体。此外,以异源四倍体体细胞杂种的花粉为柚等单胚品种授粉,在当代即可获得无籽果实。

综上所述,原生质体融合技术除去作为砧木和三倍体的育种材料外,还可以利用父母双亲的性状进行无核与风味改良等方面的育种。如华中农业大学正在

进行的利用温州蜜柑等无核品种和其它有籽品种如椪柑、甜橙类进行融合,以期获得无核的柑橘新品种。

3 遗传转化育种

遗传转化育种指的是利用基因工程的手段直接导入外源目标基因的一种育种技术。柑橘遗传转化的第一篇报道来自Kobayashi 和 Uchimiya^[6],通过PEG介导法获得转标记基因的特洛塔甜橙原生质体,但并未获得再生植株。之后,遗传转化技术在柑橘育种上得到快速的发展。Moore 等^[7]首次应用根癌农杆菌进行柑橘实生苗上胚轴切段的转化,成功地获得转标记基因的卡里佐枳橙植株。在此后近15年的时间里,柑橘的遗传转化研究取得了长足的发展。转基因所涉及的种类有枳属和柑橘属,属内杂种橘柚和属间杂种枳橙也已成功实现转化,金柑属转基因则少见报道。柑橘属中柚类、甜橙、酸橙、柠檬和来檬类等都有成功的报道,其中甜橙类的转化最为普遍,而宽皮柑橘类的报道较少。在柑橘遗传转化当中,转化基因类型包括筛选标记基因、报告基因、以及具有农艺性状的一些基因,如抗病虫基因、抗逆相关基因、改善果实品质相关基因以及缩短童期相关基因等。

3.1 筛选基因与报告基因

在转化基因类型当中,筛选标记基因和报告基因主要是用来加速得到转基因植物,如利用 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)或绿色荧光蛋白(GFP)的特性,可以早期发现转基因植株或是细胞杂种,大大提高了育种进程。如蔡小东等(2006)利用转GFP 柑橘进行细胞融合,大大缩短了获得体细胞杂种的时间。

3.2 抗病虫相关基因

CTV 是世界各柑橘产区普遍发生的一种病害,在许多酸橙做砧木的柑橘产区造成严重危害,如阿根廷、巴西、美国等。为了防治此病的危害,相关基因已经在柑橘上得到克隆。近些年,已经获得转CTV-CP、p23、p25 以及其非编码区和RNA 依赖RNA 聚合酶基因等。这些转基因植株均在不同程度上表现出了抗病毒的能力。同样,利用柞蚕抗菌肽具有广谱杀菌功能,对柑橘黄龙病细菌及溃疡病细菌具有很强的抑菌效应。陈善春等^[8]将抗菌肽D 基因转化锦橙、新会橙和沙田柚,获得了再生植株,其对溃疡病的抗性研究正在进行之中。为解决黄龙病的危害,郑启发等^[9]也将柞蚕抗菌肽基因成功转入沙田柚。

3.3 抗逆相关基因

提高柑橘的抗逆性一直是柑橘育种的一个重要目标,柑橘自身抗逆性较差,加上栽培地域限制及逆境胁迫,造成柑橘产量的巨大损失。目前,柑橘在抗逆基因的转化方面已经有成功的报道,如将 $\Delta 1$ -吡咯啉-5-羧酸合成酶(p5cs)转入枳橙以提高其抗旱能力^[10]。其中转化p5cs基因的枳橙植株在水分逆境下持续15 d,会积累大量的脯氨酸,与未转化对照相比,表现出更高的渗透调节能力及光合效率。

3.4 改善果实品质相关基因

柑橘中与品质相关的基因大多由多基因控制,甚至为数量性状,因此由遗传转化手段对果实品种进行改良存在着一定困难。随着基因工程技术发展,一些关于果实品质的基因得到克隆并已经在果实品种改良中应用。目前对果实品质改良多集中在无核、色素合成与采后贮藏相关基因研究。

3.5 缩短童期相关基因

童期长是柑橘等木本植物育种效率低的最主要原因,所以有效缩短童期,能够加速柑橘遗传改良进程。Pena等^[11]将拟南芥中花分生组织特异基因APETALA1和LEAFY转入枳橙,并得到了1a内可以开花结果的转基因植株,这些转基因植株花正常可育,并在随后的几年中连续开花结果。这些早花植株可以用作其他基因转化受体材料或与其它品种进行杂交,获得的转基因植株或是杂交后代就可以表现出早花、早实的症状,便于在较短时间里分析果实品质及其他性状,从而加速育种进程。

虽然柑橘育种新技术得到了广泛发展,但是遗憾的是至今仍没有育出较好品种,而且转基因柑橘进行了20多年,仍没有一例品种或品系育成。同时传统育种手段仍占有重要地位。美国农业部自20世纪初开展杂交育种以来,就一直在开展杂交育种工作。日本通过杂交育种获得了天草,美国获得了诺瓦等优良品种。所以应该利用现有的生物技术手段与传统技术相结合,尽快育出柑橘产业需要的新品种。

参考文献

[1] 张俊娥. 柑橘愈伤组织DNA含量变异\体细胞胚胎发生及同源四倍体的诱导研究[M]. [博士学位论文]. 武汉:华中农业大学图书馆,2005.

- [2] Grosser JW, Gmitter FG Jr, Castle WS. Production and evaluation of citrus somatic hybrid rootstocks; progress report[J]. Proc Fla State Hort Soc, 1995, 108: 140-143.
- [3] Grosser JW, Chandler JL. Somatic hybridization of high yield, cold-hardy and disease resistant parents for citrus rootstock improvement [J]. J Hort Sci Biotech, 2000, 75(6): 641-644.
- [4] Mendes-da FJ, Moura F, Camargo LEA, Mendes HMJ. Caipira sweet orange + Tangpur lime: A somatic hybrid with potential for use as rootstock in the Brazilian citrus industry[J]. Genet Mol Bio, 2000, 23(3): 661-665.
- [5] Guo WW, Deng XX. Somatic hybrid plantlets regeneration between Citrus and its wild relative, *Murraya paniculata* [J]. Plant Cell Rep, 1998, 18: 297-300.
- [6] Kobayashi S, Uchimiya H. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer[J]. Jpn J Genet, 1989, 64: 91-97.
- [7] Moore G A, Jacono C C, Neidigh J, Lawrence S D, Cline K. Agrobacterium-mediated transformation of Citrus stem segments and regeneration of transgenic plants[J]. Plant Cell Rep, 1992, 11: 238-242.
- [8] 陈善春,张进仁,黄自然,高峰,陈凤珍,隆有庆. 根癌农杆菌介导柞蚕抗菌肽D基因转化柑橘的研究[J]. 中国农业科学, 1997, 30(3): 7-13.
- [9] 郑启发,陈大成,黄自然,胡桂兵. 人工合成柞蚕抗菌肽D基因转化沙田柚[J]. 华南农业大学学报, 1999, 20(1): 103-107.
- [10] Molinari H B C, Marur C J, Filho J C B, Kobayashi A K, Pileggi M, Junior R P L, Pereira L F P, Vieira L G E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing praline[J]. Plant Sci, 2004b, 167(6): 1375-1381.
- [11] Pena L, Martin-Trillo M, Juarez J, Pina J A, Navarro L, Martinez-Zapater J M. Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time [J]. Nature Biotech, 2001, 19: 263-267.