

## 基于胚抢救技术的枳雀×枳杂交群体创建及鉴定

李 昂<sup>1a</sup>, 戴 冬<sup>1a</sup>, 赵 立<sup>1a</sup>, 韦壮敏<sup>1</sup>, 丁德宽<sup>2</sup>,  
袁晓慧<sup>3</sup>, 叶俊丽<sup>1</sup>, 谢宗周<sup>1</sup>, 邓秀新<sup>1</sup>, 柴利军<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>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;

<sup>2</sup>城固县果业技术指导站, 陕西城固 723200; <sup>3</sup>龙陵恒冠泰达农业发展有限公司, 云南龙陵 678300)

**摘要:**【目的】新资源获得是开展育种的前提和基础, 通过两种砧木杂交, 创造出聚合两种砧木优良性状的新型砧木资源材料。【方法】以枳雀为母本、枳为父本进行杂交实验, 结合胚抢救技术获得子一代植株, 利用形态学观察及SSR分子标记技术对子一代进行鉴定。【结果】三年胚抢救实验共接种3 146粒种子, 获得胚抢救幼苗1250株, 成苗率为39.73%。其中通过形态学鉴定出41株杂种植苗, 共筛选出8对SSR引物来对父本母本进行区分, 其中的CS014R-CS014F、CS065R-CS065F引物组合可以准确地鉴定出杂种植后代, 通过SSR分子标记鉴定出20株有性杂种植株。所获得的61株杂种植资源为将来深入开展柑橘砧木育种研究工作奠定了材料基础。【结论】以多胚性柑橘为母本的杂交组合获得的成熟种子, 难以通过直接播种的方式获得杂种植苗。将胚拯救与分子鉴定相结合, 通过SSR分析, 找到可靠的SSR引物对鉴定杂交后代, 为柑橘砧木育种的进一步研究奠定了物质基础。

**关键词:**柑橘; 枳雀; 枳; 胚抢救; 杂种植群

中图分类号:S666

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2019)04-0430-08

## Creation and identification hybrid population from Zhique × Trifoliate orange based on embryo rescue technology

LI Ang<sup>1a</sup>, DAI Dong<sup>1a</sup>, ZHAO Li<sup>1a</sup>, WEI Zhuangmin<sup>1</sup>, DING Dekuan<sup>2</sup>, YUAN Xiaohui<sup>3</sup>, YE Junli<sup>1</sup>, XIE Zongzhou<sup>1</sup>, DENG Xiuxin<sup>1</sup>, CHAI Lijun<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education/Key Laboratory of Horticultural Crop Biology and Genetic Improvement (Central Region), MOA, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China; <sup>2</sup>Chenggu Fruit Industry Technical Guidance Station, Chenggu 723200, Shaanxi, China; <sup>3</sup>Longling Hengguan Taida Agricultural Development Co. LTD, Longling 678300, Yunnan, China)

**Abstract:**【Objective】The research and utilization of resistant rootstock resources of *Citrus* in China started relatively late, and the breeding rootstock is still relatively delayed in comparison with that in the developed countries. In order to obtain hybrid offspring population of Zhique(*Citrus wilsonii* Tanaka) Raf.) and Trifoliate orange[*Poncirus trifoliata* (L.) Raf], we conducted this study. Trifoliate orange is used as a kind of citrus rootstock widely in China. It has good affinity and general resistance. But the major defect is the insufficiency of iron absorption. Zhique is a kind of local citrus rootstock resource reported in Chenggu county, Shanxi province recently. It has good ability in using iron. In order to fully combine the beneficial properties, we carried out hybridization combined with embryo rescue technique to obtain hybrid offspring.【Methods】The species Zhique was planted in Chenggu county, Shanxi province. In this experiment, the Zhique's plants, leaves, flowers, fruits and other materials used for morpho-

收稿日期:2018-09-21

接受日期:2019-01-15

基金项目:国家现代农业(柑橘)产业技术体系(CARS-27);园艺作物种质资源研究与遗传改良(团队)项目(31521092);龙陵恒冠泰达农业发展有限公司,邓秀新院士工作站(2017IC035)

作者简介:李昂,男,在读硕士研究生,研究方向为种质资源研究。Tel:15927375567,E-mail:liang0510@webmail.hzau.edu.cn  
a为共同第一作者,同等贡献。

\*通信作者 Author for correspondence. Tel:13006338843,E-mail:chailijun@mail.hzau.edu.cn

logical description were all collected from a tree which was estimated more than 40 years old. Zhique was used as female parent and Trifoliate orange was used as male parent. The pollen of Trifoliate orange was collected in HZAU Germplasm Resources Nursery during morning. After the collection, the pollen was dried in dryer with no light at 27-29 °C. We stored the pollen in 1.5 mL centrifuge tubes at 4 °C when they were fully dried. We used acetic acid magenta to test the activity before the pollination and bagged the flowers after pollination. The hybrid fruits were picked 80-85 days after the pollination. The fruits were stored in 4 °C refrigerator before the embryo rescue was done. The embryos were inoculated on the shooting medium (MT+KT 0.5 mg · L<sup>-1</sup>+BA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>) under illumination culture until the bud grew up. The shoots were moved on rooting medium(l/2 MT+IBA 0.1 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>+Activated Carbon 0.5 mg · L<sup>-1</sup>) until the root grew up. After subculture the plants were transferred into water for 1 month adaptation. Finally we put the well adapted seedlings into small pots with nutritive soil, and moved the pots in greenhouse. There were 1 133 progeny seedlings survival in the end, some of them were identified with morphology of the male parent, but the rest had to be identified by molecular markers. 8 of the primer pairs of the 10 possible SSR primer pairs were able to be used for the identification of the true hybrid seedlings.【Results】 61 hybrid offspring were obtained. Among them 41 of the hybrid plants were identified with the trifoliate morphologic characteristics. Another 20 hybrid plants were identified by SSR molecular marker primer pair CS014R-CS014F and CS065R-CS065F. The hybrid rate was 4.1%. 【Conclusion】 Hybrid offsprings derived from the cross between Zhique and Trifoliate orange were successfully identified by means of morphology and SSR marker selection from the seedlings obtained with embryo rescue which created the materials for the further study of citrus rootstock breeding.

**Key words:** Citrus; Zhique; Trifoliate orange; Embryo rescue; Hybrid population

我国是柑橘起源中心之一,栽培、野生及半野生种质资源类型丰富,目前在生产和砧木育种中占主导类型的砧木——枳[Poncirus trifoliata (L.) Raf.]就起源于中国<sup>[1]</sup>。枳砧因其嫁接亲和性好,综合抗性优良,兼具柑橘衰退病、根腐病、流胶病抗性以及非生物抗性<sup>[2-3]</sup>,如耐低温胁迫等性状,被中国、日本等世界上多个柑橘生产大国广泛应用。然而在长期的生产过程中发现,枳对盐、碱及缺素型土壤的适应能力比较弱,特别是在四川省部分地区<sup>[4]</sup>以及陝西城固等碱性土壤的柑橘生产区,枳作为砧木,缺铁黄化现象尤为严重<sup>[5]</sup>。枳雀是陝西城固县一古老地方柑橘资源,在当地因其适应性强,树势生长旺盛,易于实生繁殖,特别是与枳砧相比,在碱性土壤条件下,以枳雀为砧木,植株表现出极强的抗缺铁黄化性状<sup>[3]</sup>。在当地作为优良的砧木类型得到了大范围的推广和利用。

柑橘砧木资源的发掘与利用水平是衡量一个国家柑橘产业发展状况的重要指标。但我国开展柑橘砧木选育的工作相对比较晚,尤其是在抗性砧木资源的研究与利用方面,与发达国家相比还

处于一个比较滞后的阶段。澳大利亚、南非和西班牙等国,利用枳作为杂交亲本,创制的卡里佐枳橙、特洛亚枳橙等新型砧木已经开始大面积应用<sup>[6]</sup>。

新资源获得是开展育种的前提和基础,在我国的生产和研究中,柑橘栽培长期以枳为主导砧木。但近年来的生产实践表明,枳砧的一些弱点制约着柑橘产量和品质的提升,因此进行优良砧木的选择也成为我国柑橘产业发展的重要组成部分。其中一种常见的方式就是对现有的优良砧木进行杂交<sup>[7]</sup>。以多胚性柑橘为母本的杂交组合获得的成熟种子,难以通过直接播种的方式获得杂种苗。许多品种存在多胚现象,对于多胚柑橘种质资源的利用,胚抢救结合分子标记鉴定将是柑橘杂交中必不可少的技术手段。枳雀作为柑橘砧木资源,相关的应用与研究工作才刚刚起步,其独特的抗性潜能仍未被充分发掘和利用<sup>[8]</sup>,本研究以枳雀为母本,枳壳为父本,利用成熟的胚抢救技术结合分子标记分析手段<sup>[9]</sup>,构建杂种群体,以期创造出聚合两种砧木优良性状的新型砧木资源材料。

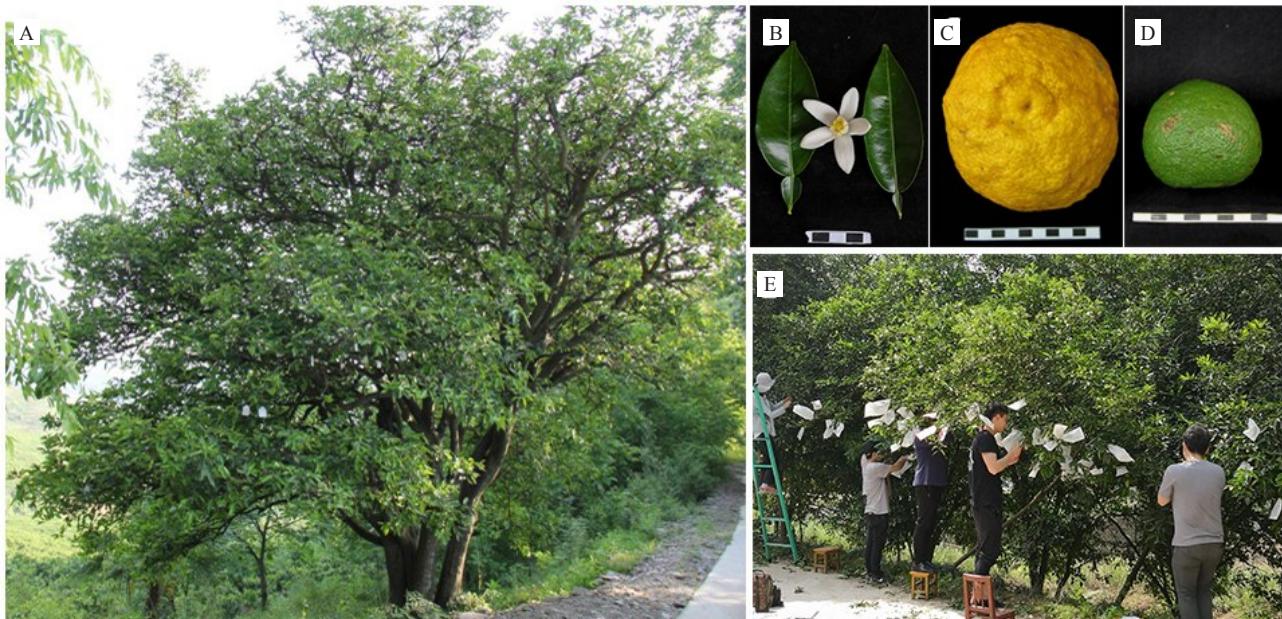
## 1 材料和方法

### 1.1 枳雀形态学观察

实验用枳雀材料定植于陕西省城固县,植株树

龄据估计超过40 a(年),本实验中形态学描述所用枳雀植株、叶片、花朵及果实等材料均采自该植株(图1),具体方法可参照李航<sup>[10]</sup>的报道。

### 1.2 枳花粉收集及杂交授粉



A. 植株;B. 花与叶片;C. 枳雀果实 D. 杂交果实;E. 授粉。

A. Plants; B. Flower & leaves; C. Zhique's fruit; D. Hybrid fruit; E. Artificial pollination.

图1 枳雀资源形态学特征  
Fig. 1 Morphological features of Zhique germplasm

分别于2016年5月1日、2017年5月9日、2018年5月3日在陕西城固县,以枳雀为母本,枳为父本,进行杂交授粉实验。枳花粉收集方法如下:当年4月份,在华中农业大学资源圃,于上午采集含苞未放花朵,将其置于27~29 °C烘箱中(整个过程需避光操作),让花粉自然散开,完全干燥后,用1.5 mL离心管分装并存于4 °C冰箱中留存备用,在授粉前需要用醋酸洋红染色测定花粉的活性,确保花粉质量可靠<sup>[10]</sup>。

### 1.3 杂交后代的胚培养

在授粉后80~85 d,将授粉果实采摘收集,放置于4 °C冰箱临时保存。将果实内的种子取出并进行统计,然后在超净工作台上进行表面消毒,剥去种皮,用手术刀将种子尾部(与胚相对的一端,一般较圆)划一小口,然后将种子插于生芽培养基(MT+KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>),放置于光培养室培养1~2个月,待成芽后,移至固体生根培养基(l/2 MT+IBA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+活性炭0.5 mg·L<sup>-1</sup>)上继代,诱导生根。

### 1.4 植株移栽

待培养室中的试管苗诱导生根后,即可移栽到小塑料杯中炼苗1个月,而后转至大营养钵中,放置于温室,定期浇水,具体过程可参照谭美莲<sup>[9]</sup>的方法。

### 1.5 杂种鉴定

形态鉴定,由于枳雀为单身复叶,枳为三出复叶,枳的三叶性状具有显性遗传的特点,所以对由枳作父本杂交所得的后代植株,可通过观察其叶片是否表现为三叶而判断其是否为杂种后代。一般初步认为后代叶形表现为三出复叶者为杂种子代。为进一步确定杂种子代的真实性,对部分三叶植株及未表现三叶的植株,使用SSR分子标记做检测,本试验共使用多态性较好的引物8对<sup>[11]</sup>,具体过程可参照谭美莲<sup>[9]</sup>的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 枳雀性状描述

枳雀是一种小乔木,树直立,枝干上刺多且长,

树冠多见圆头形或伞形。枳雀的叶为单身复叶,顶生小叶为卵圆形,翼叶为倒卵形,顶生小叶比翼叶大。叶基楔形,叶全缘,叶尖渐尖至急尖且无凹口。花为完全花,雌雄蕊同期成熟,正常可育,盛花期在4月下旬。果实近球形,果皮较厚且分光滑和粗糙两种类型,中心柱充实。果基微凹,果顶圆且有印圈。胚类型为多胚,多胚种子比例为50%~80%(图1)。

## 2.2 杂交后代的获得

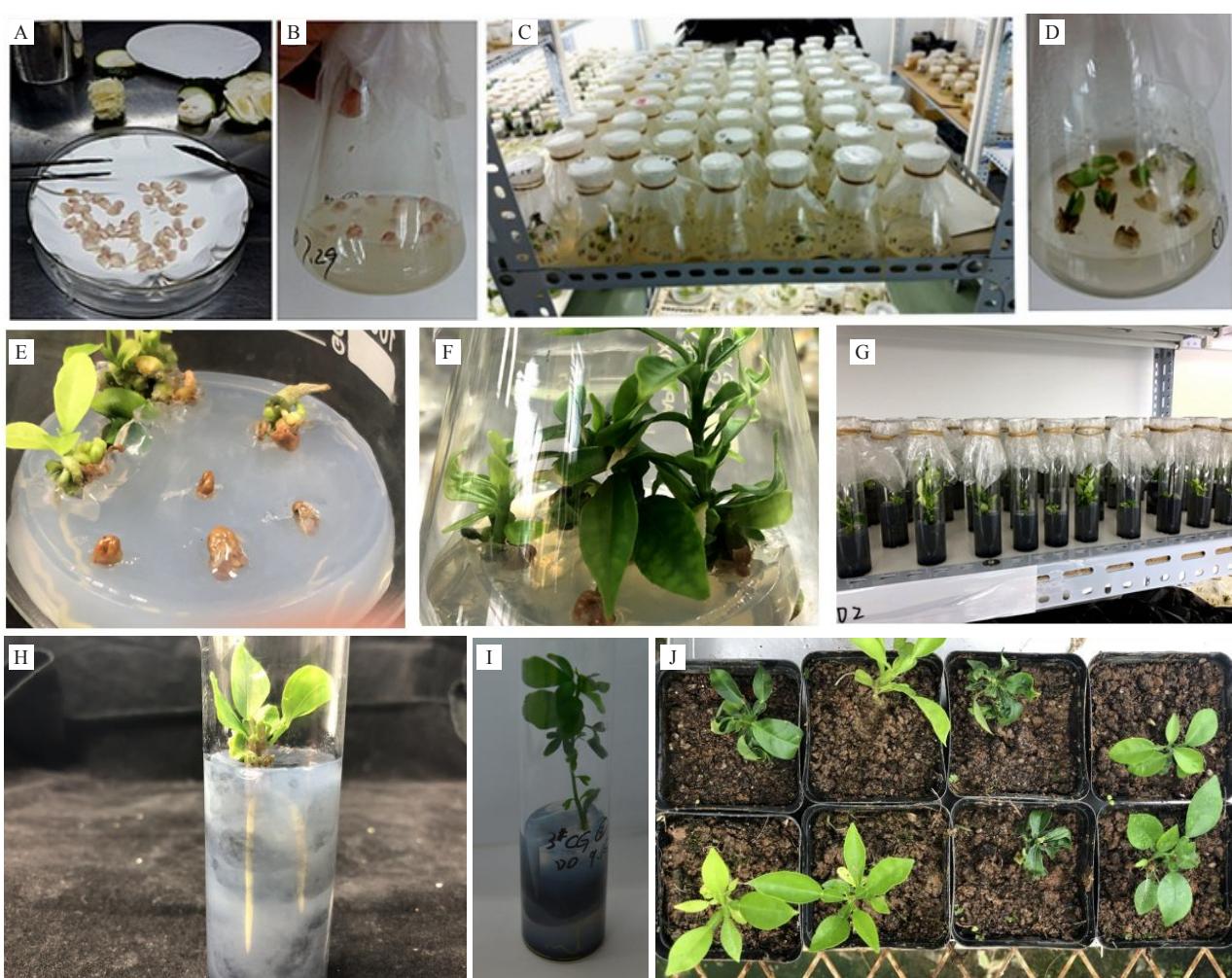
以枳为父本,枳雀为母本,杂交授粉640朵花,获得杂交果实180个,坐果率为28.1%(表1)。授粉

后84 d将果采下,立即寄回实验室进行胚抢救处理(图2)。三年胚抢救实验共接种3 146粒种子,获得胚抢救幼苗1 250株,成苗率为39.73%。

表1 杂交实验坐果率

Table 1 Fruit setting rate in hybridization experiment

授粉日期 Pollination date	授粉花朵数 Number of pollinated flowers	坐果数 Number of fruit setting	坐果率 Fruit setting rate/%
2016-05-01	240	49	20.4
2017-05-09	230	51	22.1
2018-05-03	170	80	47.1



A. 授粉果实中种子;B. 将种子播种于MT培养基中;C. 将种子置于光培养室中培养;D. 培养2 d后生长情况;E. 未能萌发的种子;F. 培养45 d后生长情况;G. 生根培养基继代培养;H. 继代45 d后生长情况;I. 三出复叶杂种后代;J. 营养钵移栽小苗。

A. Seeds from pollination fruits; B. The seeds sowing in MT medium; C. Cultivation of seeds in a light culture chamber; D. Growth after cultured two days; E. Seeds that fail to survive; F. Growth after cultured 45 days; G. Cultured in root medium; H. Growth after cultured in root medium for 45 days; I. Hybrid progeny of trifoliolate leaves; J. Transplanting seedling in the soil.

图2 胚抢救流程

Fig. 2 Process of embryo rescue

### 2.3 以枳作父本的杂交后代的形态及分子鉴定

根据枳的三叶显性遗传特征,笔者观察了以枳雀为母本、枳为父本杂交所获得后代1 250株,发现

其中具有父本枳的三出复叶特征植株41株(图3、图4)。

再对单出复叶植株进行SSR分子标记鉴定。首



A. 三出复叶的杂种后代;B. 单身复叶的杂种后代。

A. Hybrid progeny of single compound leaves; B. Hybrid progeny of trifoliolate leaves.

图3 两种类型的杂种后代

Fig. 3 Two types of hybrid progeny



A. 类似于枳(父本)叶片;B. 类似于枳雀(母本)叶片。

A. Leaf morphology of male parent-like; B. Leaf morphology of female parent-like.

图4 胚抢救材料叶片形态

Fig. 4 Leaf morphology type of materials from embryo rescue

先从10对可能的引物中进行共显性筛选,应用父本有特异性条带的引物,对杂交后代进行SSR标记鉴定。根据条带图像发现除CP6和CP17对父母本区分不显著之外,其余的8对引物均对父本、母本有较为显著的区别,因此笔者使用了这8种引物(表2)对杂交后代进行分析。

当后代中出现了父本特异性条带即可判断为真子代。如图5-A所示,采用CS065引物组合对杂交子代进行鉴定时,子代(带★号)出现了父本的特异性条带;图5-B采用CS014引物组合对杂交子代进行鉴定时,子代(带★号)出现了父本的特异性条

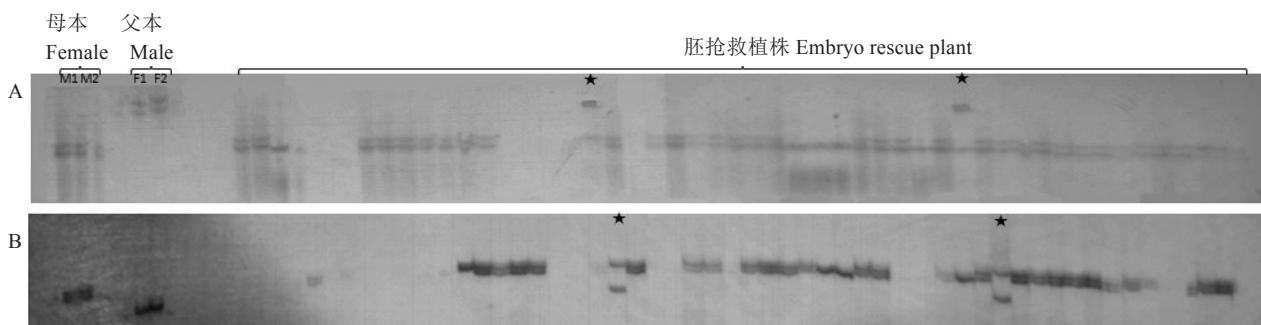
带。由此可以确定这4株植株单出复叶植株虽不具有父本的三出复叶特征,但仍为有性杂交后代。通过引物组合CS065、CS014共鉴定出20株单身复叶的杂交后代(表3)。

### 3 讨 论

虽然柑橘类植物遗传背景高度杂合,且许多品种还存在多胚现象,但有性杂交仍然是基因交流的必经之路。早期的柑橘育种都尽量选择单胚品种作为亲本,但随着多胚种质资源优良特性的显现,多胚的柑橘种质资源将会在柑橘育种中发挥越来越重要的作用。

表 2 8 对具有多态性的 SSR 引物序列  
Table 2 The information of 8 pairs of polymorphism SSR primer

引物编号 Primer code	引物序列(5'—3') Primer sequence	碱基数 Number of base pairs/bp
CS065-Forward	CCTCTCTCCCCAGAACCTCCT	20
CS065-Reverse	TTGAGTTTGATTGAAGCTTG	22
CS068- Forward	ACCTTGTCCGGCACTGATAC	20
CS068- Reverse	AGATTCCCACAACGTCTCCA	20
CS051- Forward	AAGCCAGAAGGCAAGCATTA	20
CS051- Reverse	GGTTTGCAGCTGATATTGAT	20
CS014- Forward	GAAGAAGATGGCTGCTCACC	20
CS014- Reverse	TTCATCATCCTGCCAAGACA	20
CS009- Forward	AAAAATGGGAGTGAGCAGGA	20
CS009- Reverse	TAATGCAGCCGGAAGAAAGT	20
CP4- Forward	GCTATCCGCAAGGTAAAGT	20
CP4- Reverse	TTGAGGTACGGGTTCAAAT	20
CP5- Forward	TGATCCCACAAACAAAGGAA	20
CP5- Reverse	TTTGAGTCTGGGGAAAAGGA	20
CP15- Forward	ATGGAGGTCATCGATTTCAGC	20
CP15- Reverse	AGTCCAGACACAGCACGGTA	20



A. SSR 引物 CS065 扩增结果, M1, M2 代表在母本枳雀中扩增两次重复结果; F1, F2 代表在父本枳中扩增两次重复结果; B. 引物组合 CS014 扩增结果;★表示子代中兼具父母本特征条带。

A. The amplification results of SSR primers CS065, M1, M2 represent two independent repeat amplification results in maternal; F1, F2 represent two independent repeat amplification results in male parent; B. The amplification results of SSR primers CS014; ★ means true hybrid containing both parents characteristic bands.

图 5 以枳作父本的杂交后代 SSR 鉴定  
Fig. 5 Hybrid offspring identification by using SSR markers

表 3 形态学和 SSR 分子标记鉴定结果  
Table 3 The identification result by the phenotypic trait trifoliate leaves and SSR marker analysis

胚抢救时间 Embryo rescue time	胚抢救种子数 Seed number of embryo rescue	成苗数 Number of seedlings	后代最终成活数 Ultimate Number of identified alive	形态学鉴定杂种数 Number of hybrids identified by phenotypic trait trifoliate leaves	SSR 分子标记 鉴定后代数 Number of plant by using SSR marker analysis	SSR 分子标记 鉴定杂种数 Number of hybrids identified by using SSR marker analysis	杂种植苗总数 Total number of hybrids
2016-07	593	185	40	20	20	4	24
2017-08	1 293	528	501	0	501	16	16
2018-07	1 260	537	-	21	-	-	21

的作用。对于多胚柑橘种质资源的利用,胚抢救结合分子标记鉴定将是柑橘杂交中必不可少的技术手段。除了采用 SSR 分子标记之外,杂交子代的分子标记鉴定还有 SRAP、ISSR 等方式。SSR 标记又称

作微卫星 DNA(Microsatellite DNA),是指以少数几个核苷酸(通常 2~4 个)为单位多次串联重复的 DNA 序列,以 SSR 位点的多态性为基础的遗传标记,具有多态性高、随机分布、可通过 PCR 迅速测

定、技术难度低、重复性好、引物公开易使用、具有大量等位差异等优点<sup>[10]</sup>。本研究采用枳为父本、枳雀为母本,使用胚抢救技术获得了杂交后代群体,通过SSR分子标记鉴定,筛选出了能够用于鉴定枳壳与枳雀有性杂交后代的引物组合8对。但在电泳凝胶扩增实验中发现仅有CS014R-CS014F、CS065R-CS065F这2对引物对能有效鉴定子代,此外,实验发现鉴定的真杂种子代在某一个引物中表现出父本特异性条带,在另一个引物中却未表现出父本条带的现象,原因可能是SSR标记为共显性标记<sup>[11]</sup>,而柑橘类的亲本高度杂合,根据孟德尔基因自由分离定律,在杂交时产生基因分离所致。

胚抢救作为多胚柑橘种质资源杂交育种的重要步骤,其成功率至关重要。合子胚的早期离体培养受多种因素影响,包括胚抢救的材料类型、培养基类型、幼胚离体培养时期等。胚抢救效果与培养材料有很大关系,以活体内胚为最佳<sup>[12]</sup>;MS、MT、White等培养基都可用来离体培养柑橘合子胚<sup>[13]</sup>。研究中在3 146粒种子中只获得胚抢救幼苗1 250株,成苗率很低,分析其原因为:一是授粉获得果实的种子发芽率很低;在其他课题催芽实验中,同样发现枳雀种子发芽率较低,仅有35%~45%,可以佐证并不是胚抢救实验技术出现问题;二是枳雀果实受到柑橘大食蝇侵蚀,其幼虫致使部分种子内部腐烂,失去发芽能力,在播种时未能发现;三是在播种及继代实验操作过程中会有一部分种子或幼苗污染,不能正常发芽。

以多胚性柑橘为母本的杂交组合获得的成熟种子,难以通过直接播种的方式获得杂种苗。因此,想要更高效地获得杂交后代,胚抢救是一种行之有效的方法。为避免珠心胚的干扰,胚抢救的时期就显得尤为重要:既要让合子胚长到一定大小,避免离体培养过程中因胚太小而受到损伤以及所需环境、营养条件太复杂导致培养失败,又要防止种子成熟导致合子胚退化或者败育。杂交组合不同,柑橘合子胚发育进程不一样,合子胚的最佳分离时期也不尽相同。如王家福等<sup>[14]</sup>在以柚×枳、雪柑×枳、芦柑×柚等6个杂交组合为材料研究柑橘胚胎发育时发现,授粉后50 d合子发育到球形胚时期,胚囊尚未被珠心胚入侵,此时最适于合子胚的离体培养;谭美莲<sup>[9]</sup>配制温州蜜柑×枳和红橘×枳杂交组合,分别于授粉后80、85、90 d将种胚进行胚抢救,实验结果证明授

粉后80 d是这两个组合最佳的胚抢救时期。错过胚抢救的最佳时期,珠心胚侵入胚囊速度很快,杂种率下降很快。在王家福等<sup>[15]</sup>的研究中,武夷橙×苏柑的杂交组合授粉50 d后离体培养后代杂种率达到100%,之后杂种率呈现降低趋势,到60 d时仅有20.0%,说明50 d是该组合的最佳胚抢救时期。本研究中果实采集时间为授粉后84 d,杂种率为4.8%,对比于前人实验,杂种率明显偏低,推测是果实采集时间过晚导致珠心胚入侵合子胚,合子胚存活较少,杂种率很低。除此之外,授粉成功率、坐果率、种子发芽率等都是本研究中影响杂种后代获得率的因素。

本实验通过形态学和分子标记共同鉴定出杂交后代61株。但是最终的株数较少,为进一步扩大枳雀×枳杂交群体的数量,在后续研究中可以开展以下工作:(1)从授粉后60 d开始,以5 d为间隔采集杂交果实进行胚抢救并鉴定,同时结合石蜡切片观察胚胎发育进程,确定枳雀×枳杂交组合的最佳胚抢救时期,提高杂种率。(2)增加授粉数量,获得更多的杂交果实。(3)增加SSR分子标记的引物数或结合InDel标记等分子标记手段,提高鉴定的精度,减少遗漏。

## 参考文献 References:

- [1] 朱世平,陈娇,马岩岩,闫树堂,钟广炎.柑橘砧木评价及应用研究进展[J].园艺学报,2013,40(9):1669-1678.  
ZHU Shiping, CHEN Jiao, MA Yanyan, YAN Shutang, ZHONG Guangyan. Advances in evaluation and application of Citrus Rootstocks[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40 (9):1669-1678.
- [2] FRIEDERIKE B, MARÍA J A, JOSEP A J, ALBERTO U. Replacement of CTV-susceptible sour orange rootstock by CTV-tolerant ones may have triggered outbreaks of *Tetranychus urticae* in Spanish citrus[J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2010, 137(1):93-98.
- [3] GMITTER F G, XIAO S Y, HUANG S, HU X L, GARNSEY S M, DENG Z. A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region[J]. Theoretical & Applied Genetics, 1996, 92(6): 688-695.
- [4] O'BANNON J H, FORD H W. Resistance in citrus rootstocks to *Radopholus similis* and *Tylenchulus semipenetrans* (Nematoda) [C]. Proceedings of the International Society of Citriculture, 1978: 544-549.
- [5] JI Q H, LI Y T, WANG Y Q. Research Progress on Citrus iron deficiency chlorosis in calcareous soil[J]. Journal of Sichuan Ag-

- ricultural University, 1998, 16(3):365-369.
- [6] FU L N, CHAI L J, DING D K, PAN Z Y, PENG S A. A Novel Citrus rootstock tolerant to iron deficiency in calcareous soil[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2016, 141(2): 112-118.
- [7] 朱世平,陈娇,刘小丰,曹立,陆智明,赵晓春,15种柑橘砧木出苗期耐盐碱性评价[J].西南大学学报(自然科学版),2014,36(6):47-52.  
ZHU Shiping, CHEN Jiao, LIU Xiaofeng, CAO Li, LU Zhiming, ZHAO Xiaochun. Evaluation of salt tolerance and alkalinity of 15 Citrus Rootstocks at Seedling Stage[J]. Journal of Southwestern University (Natural Science Edition), 2014, 36(6):47-52.
- [8] 李航,杨晓明,丁德宽,王小丽,谢宗周,叶俊丽,彭抒昂,邓秀新,柴利军.基于cpSSR和nSSR标记的地方柑橘资源枳雀'亲本分析[J].果树学报,2018,35(10): 265-274.  
LI Hang, YANG Xiaoming, DING Dekuan, WANG Xiaoli, XIE Zongzhou, YE Junli, PENG Shuang, DENG Xiuxin, CHAI Lijun. Parentage analysis of indigenous citrus species 'Zhi Que' based on nuclear and chloroplast SSR markers[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35 (10): 265-274.
- [9] 谭美莲.柑橘有性杂种群体的获得及分子遗传连锁框架图的构建[D].武汉:华中农业大学,2007.  
TAN Meilian. Creation of sexual hybrid populations and construction of molecular genetic linkage framework map in citrus [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007.
- [10] 李航.宜昌橙及两个地方柑橘种的资源调查与评价[D].武汉:华中农业大学,2015.  
LI Hang. Resources investigation and evaluation of Yichang or-
- anges and two local citrus species[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015.
- [11] 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[J].果树学报,2018,35(1): 32-37.  
SUN Shihang, LIN Miaomiao, QI Xiujuan, SUN Leiming, ZHONG Yunpeng, FANG Jinbao. Authenticity identification of hybrid progeny of Actinidia kiwifruit by InDel markers[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(1):32-37.
- [12] 庄恩及,姚强.早熟和特早熟桃胚珠培养研究[J].园艺学报,1991,18(4): 303-308.  
ZHUANG Enji, YAO Qiang. Ovule culture of early maturing and very early maturing peach[J]. Acta Horticulturae Sinica, 1991, 18(4): 303-308.
- [13] 赵艳华,李春敏,吴雅琴.植物的胚抢救[J].河北农业科学,2003,7(b9): 55-58.  
ZHAO Yanhua, LI Chunmin, WU Yaqin. Embryo rescue of plants[J]. Hebei Agricultural Sciences, 2003, 7(b9): 55-58.
- [14] 王家福,陈振光.柑桔杂交的胚胎发育[J].福建农林大学学报(自然版),1992,21(3): 302-308.  
WANG Jiafu, CHEN Zhenguang. Embryonic development of Citrus hybrids[J]. Journal of Fujian Agriculture And Forestry University (Natural Version), 1992, 21(3): 302-308.
- [15] 王家福,陈振光.影响柑桔球形合子胚离体培养的若干因素[J].热带作物学报,1999,20(2): 27-30.  
WANG Jiafu, CHEN Zhenguang. Factors affecting the *in vitro* culture of spherical zygotic embryos of Citrus[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 1999, 20(2):27-30.