

椪柑无核优系的细胞学研究

张雅菁 程玉芳 伊华林

华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 以椪柑无核优系(*Citrus reticulata* Blanco)及其母本江西靖安有核椪柑(*C. reticulata* Blanco)、鄂柑 1 号(*C. reticulata* Blanco)为材料,从花粉形态、授粉亲和性和合子胚发育等方面研究优系无核机制。结果表明:无核优系花粉母细胞减数分裂异常比例显著高于其母本,花粉粒形态和小孢子母细胞的解剖学结构与母本有明显不同;无核优系自花授粉后的花粉管可以正常抵达花柱基部,自交亲和;无核优系胚胎早期败育,授粉后 3 周是败育主要时期;无核优系自花或异花授粉都不会产生种籽。无核优系果实无核的主要原因是胚胎早期败育。

**关键词** 无核椪柑; 胚胎发育; 花粉生物学特性; 自交不亲和; 授粉  
**中图分类号** S 666.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)03-0006-06

椪柑原产中国,是中国柑橘产区传统栽培类型,分布广,栽培历史悠久,面积大。但我国不同产区主栽的椪柑品种种籽多,无核椪柑品种是生产、消费者追求的目标。前人选育了一批无籽椪柑优系,如南靖 14 号、桂林良丰无核<sup>[1]</sup>、溪南椪柑、黔阳无核等,其无核机制前人作过研究,有花粉不育<sup>[2]</sup>、胚囊败育<sup>[3]</sup>及胚囊早期败育或自交不亲和<sup>[4-5]</sup>等原因。近年,通过芽变选种在江西靖安椪柑中筛选出一个无籽优系,具有果大、丰产、树势开张的特点,本研究拟通过细胞学方法探讨无核优系无核的细胞学机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

椪柑无核优系(W)和鄂柑 1 号(CK2)定植于华中农业大学国家柑橘育种中心,江西靖安有核椪柑材料(CK1)取自江西靖安县。

1.2 花粉生物学特性及发育过程观察

花粉染色活力、花粉萌发率及花粉量的测定与统计方法见参考文献[6-7],花粉染色活力=染成红色花粉数/视野内花粉总数×100%;花粉萌芽率=已发芽的花粉数/花粉粒总数×100%。

花粉母细胞减数分裂观察参考杨晓伶等<sup>[8]</sup>的方

法;小孢子母细胞发育观察采用石蜡切片法<sup>[9]</sup>。

1.3 人工授粉

于 2011 年和 2012 年连续 2 a 选取树冠外围、生长势中强的结果枝上的花朵去雄、授粉、套袋,果实成熟后统计坐果率和种籽数,杂交组合为 W×W、W×CK1 和 W×CK2。

1.4 花粉管生长观察

分别在授粉后 4、8、16、24、32、48、56、72、120 h 采集花柱和子房在 FAA 固定液中固定 24 h,再转入 70%乙醇 4℃保存,切片制作参照文献[10]进行。

1.5 合子胚和子房发育过程的组织学观察

分别采集授粉后 1、2、3、5、6 周的 3 个杂交组合子房进行石蜡切片,在 ECLZPSE 90i 显微镜下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 花粉生物学特性及发育过程观察

1)花粉染色活力、花粉萌发率与花粉量。花粉染色统计结果(表 1)表明:无核优系染色活力为 20.13%,显著低于 CK1 (62.04%)和 CK2 (57.17%)。

花粉萌芽率观察(表 1)显示:无核优系的萌发

收稿日期: 2015-10-20  
基金项目: 国家现代农业(柑橘)产业技术体系专项(CARS-27); 国家科技支撑计划项目(2013BAD02B02); 广东省教育部产学研结合项目(2012B091100169)  
张雅菁, 硕士, 研究方向: 果树种质创新与遗传育种. E-mail: 547339434@qq.com  
通信作者: 伊华林, 博士, 教授, 研究方向: 柑橘遗传育种. E-mail: yihualin@mail.hzau.edu.cn

率极低,为 1.15%,而 CK1 和 CK2 的萌发率分别为 13.80%和 15.70%,差异不显著。

花粉量计数结果(表 1)说明,无核优系的单花药花粉量显著低于 2 个对照。

表 1 花粉活力与数量

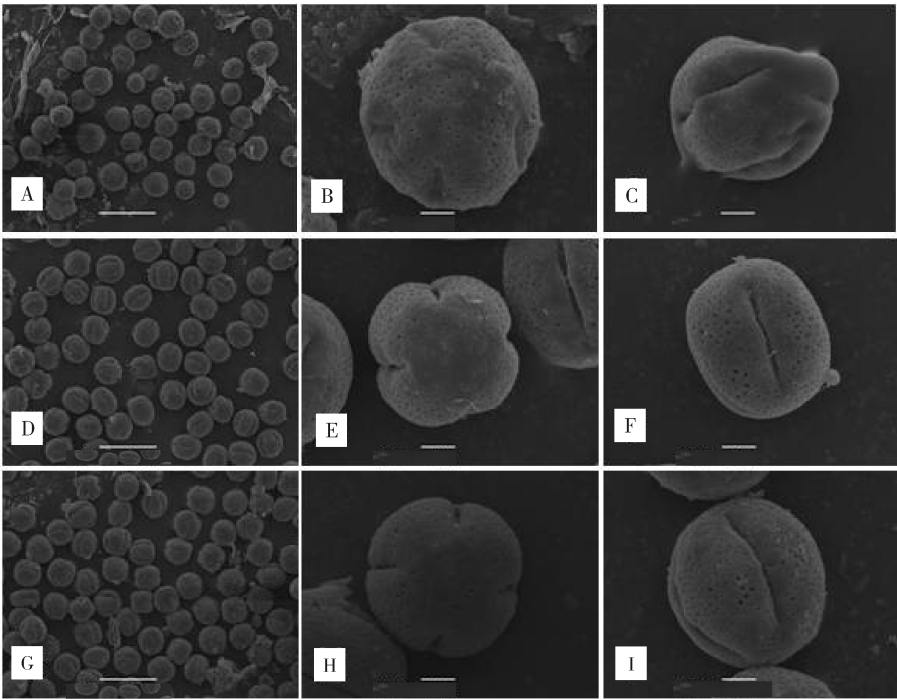
| Table 1 Observation of pollen viability and number |                                 |                                       |                                               |
|----------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 品种<br>Cultivar                                     | 花粉染色活力/%<br>Pollen<br>viability | 花粉萌发率/%<br>Pollen germination<br>rate | 单花药花粉粒数目<br>No. of pollen<br>grains peranther |
| W                                                  | 20.13±0.03b                     | 1.15±0.002b                           | 26 375±3 000b                                 |
| CK1                                                | 62.04±0.03a                     | 13.80±0.02a                           | 36 125±3 375a                                 |
| CK2                                                | 57.17±0.02a                     | 15.70±0.02a                           | 35 437±2 562a                                 |

注:表中不同字母表示经 Duncan's 新复极差检验差异显著 ( $P<0.05$ )。Note: Different letters indicated significant differences using Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).

2)花粉形态扫描电镜观察。扫描电镜观察结果

显示:CK1(图 1 D)和 CK2(图 1 G)花粉粒为球状结构、饱满,沟腹(图 1 F、I)、花粉沟清晰(图 1 E、H);无核优系花粉粒不整齐(图 1 A),≥80%畸形,呈枣核状或不饱满的球状结构(图 1 C),花粉沟及沟腹不明显(图 1 B),发育异常,与对照有明显差异。

3)花粉母细胞减数分裂观察。如表 2 所示,江西有核椴柑花粉母细胞减数分裂不正常比例仅 4%,而无核优系减数分裂异常比例达 33.2%;异常行为在终变期、中期 I、后期 I、中期 II 和后期 II 中均有出现(图 2),但四分体时期均表现正常。观察结果说明:无核优系花粉母细胞减数分裂有高比例的异常行为,但正常比例也较高,此结果表明优系花粉育性低可能并不是由花粉母细胞异常分裂引起的。



A、B、C 为无核优系(W),D、E、F 为 CK1,G、H、I 为 CK2;A、D、G:花粉粒群体;B、E、H:花粉粒极面观;C、F、I:花粉粒赤道面观;A-C show W,D-F show CK1; G-I show CK2; A,D and G:Group form of pollen grains; B,E and H:The pole fronts of pollen grains; C, F and I:The equator fronts of pollen grains.

图 1 扫描电镜花粉粒形态

Fig.1 Scanning electron micrographs of pollen grains

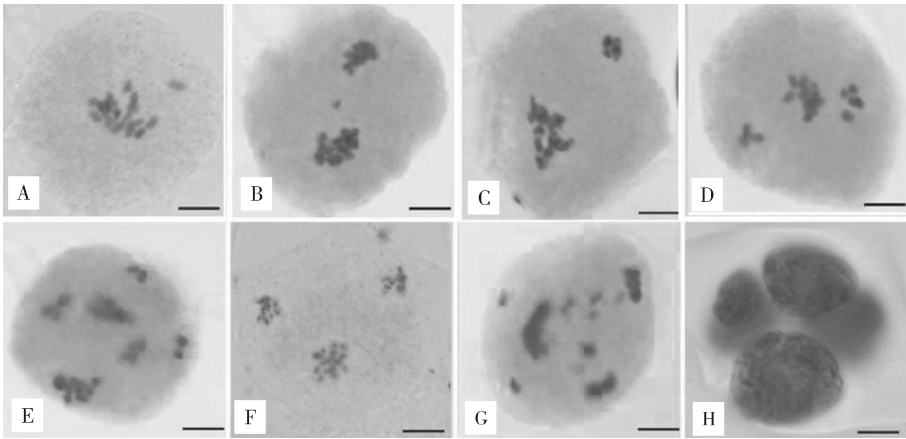
4)小孢子母细胞发育后期观察。石蜡切片显示,无核优系小孢子母细胞的形态在减数分裂期(图 4 3、B、F、G)以及花粉粒形成期(图 3 C、D、H、I)与对照无明显差异,差异出现在花药开裂释放花粉粒时期,此时优系的细胞核开始弥散消失,甲苯

胺蓝染色后呈通剔透亮的蓝色,部分小孢子母细胞有皱缩现象(图 3 E),对照正常(图 3 J),这一结果说明影响无核优系花粉育性的关键时期可能是花粉母细胞减数分裂完成之后、花药开裂释放花粉粒之间。

表 2 花粉母细胞减数分裂观察

Table 2 The meiotic behavior of pollen mother cell

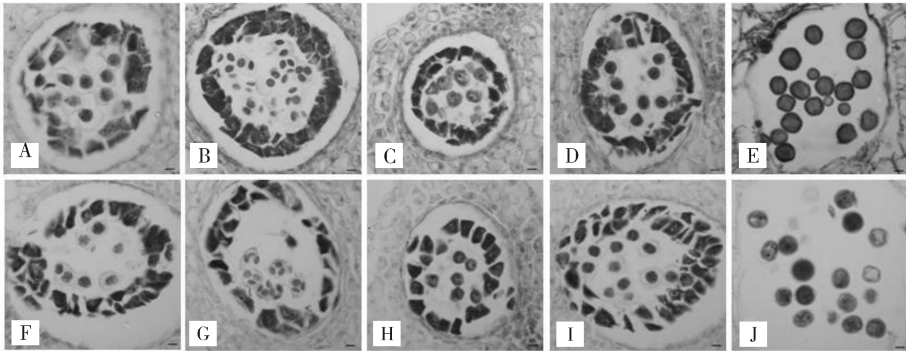
| 时期<br>Stage        | CK1           |                  |                                | W             |                  |                                |
|--------------------|---------------|------------------|--------------------------------|---------------|------------------|--------------------------------|
|                    | 观察总数          | 不正常细胞数目          | 不正常细胞比例/%                      | 观察总数          | 不正常细胞数目          | 不正常细胞比例/%                      |
|                    | Total numbers | Abnormal numbers | Percentage of abnormal numbers | Total numbers | Abnormal numbers | Percentage of abnormal numbers |
| 终变期 Diakinesis     | 126           | 3                | 2                              | 143           | 65               | 45.5                           |
| 中期 I Metaphase I   | 185           | 9                | 5                              | 138           | 45               | 32.6                           |
| 后期 I Telophase I   | 119           | 9                | 8                              | 120           | 43               | 35.8                           |
| 中期 II Metaphase II | 89            | 0                | 0                              | 45            | 20               | 44.4                           |
| 后期 II Telophase II | 43            | 5                | 12                             | 59            | 23               | 39.0                           |
| 四分体 Tetrad         | 151           | 0                | 0                              | 62            | 4                | 6.5                            |
| 总数 Total numbers   | 713           | 26               | —                              | 603           | 200              | —                              |
| 平均值 Average        | —             | —                | 4                              | —             | —                | 33.2                           |



A: 中期 I 分布在赤道板外的染色单体; B: 后期 I 落后染色体; C: 末期 I 染色体不均等分离; D: 中期 II 出现 3 个赤道板; E, F: 末期 II 染色体不均等分裂; G: 末期 II 染色体不均等分裂及落后染色体; H: 四分体; 标尺: 5  $\mu\text{m}$ 。A: Chromosomes outside the metaphase plate (Metaphase I); B: Lagging chromosomes (Anaphase I); C: Unequally cleaving chromosomes (Telophase I); D: Three equatorial plates (Metaphase II); E, F: Unequally cleaving chromosomes (Telophase II); G: Unequally cleaving and lagging chromosomes (Telophase II); H: Tetrad. Bar= 5  $\mu\text{m}$ .

图 2 无核优系花粉母细胞减数分裂情况

Fig.2 Meiosis of pollen mother cells of seedless fine selection Ponkan



A-E 为 W; F-J 为 CK1; A, F: 小孢子二分体; B, G: 小孢子四分体; C, H: 单核花粉粒; D, I: 成熟花粉粒; E, J: 花药即将开裂释放花粉粒; 标尺=10  $\mu\text{m}$ 。A-E: W; F-J: CK1. A, F: Microsporocyte of dyad cell; B, G: Microsporocyte of tetrad cell; C, H: Mononucleate pollen grains; D, I: Mature pollen grains; E, J: Anther releasing pollen grains soon. Bar=10  $\mu\text{m}$ .

图 3 小孢子母细胞发育后期形态

Fig.3 Morphology of the microspore mother cell during late development stage

2.2 自交不亲和性检测

1)花粉粒在柱头表面萌发情况。如图 4 所示, 优系自交授粉后花粉粒在柱头表面的萌发率在 17%左右,显著低于鄂柑 1 号。授粉 56 h 后,二者花粉萌发率均达到最大值。显微观察显示:鄂柑 1 号花粉粒 80%有萌发迹象,无核优系为 19%。

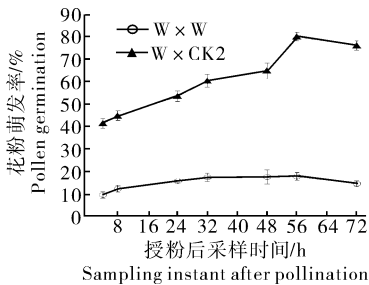
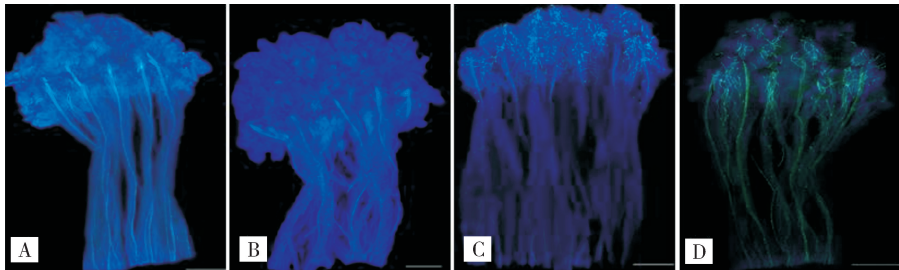


图 4 花粉粒在柱头表面萌发率曲线

Fig.4 The germination ratio of pollen grain on stigma



A,B:无核优系自交授粉 56 h 和 120 h 后花粉管生长情况; C,D:W×CK2 授粉 56 h 和 120 h 后花粉管生长情况,标尺=1 000 μm。  
A,B indicated pollen tube growth state at 56 h and 120 h after self-pollination respectively; C,D indicated pollen tube growth state at 56 h and 120 h after W ×CK2. Bar = 1 000 μm.

图 5 花粉管在花柱中的生长情况

Fig.5 Pollen tube growth statue in the style

加明显(图 6 H、K),胚珠败育。无核优系自交授粉 6 周后,仍有少数未退化的胚珠,但未见子叶形胚出现,表现发育异常或滞后(图 6 G)。

2.4 坐果率及种籽数

对授粉后坐果率及种籽数进行观测,结果(表 3)表明:无核优系自花授粉及人工授粉后的坐

表 3 坐果率及种籽数观测

| Table 3 The statistics of fruit set rates and seeds number |                                          |                                |                                           |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------|
| 杂交组合<br>Cross<br>combination                               | 授粉总数<br>Numbers of<br>flowers pollinated | 坐果率/%<br>Fruit setting<br>rate | 单果平均种籽数<br>Average seeds<br>No. per fruit |
| 2011                                                       |                                          |                                |                                           |
| W×W                                                        | 100                                      | 9                              | 0.1                                       |
| W×CK2                                                      | 100                                      | 6                              | 0.6                                       |
| CK2×CK2                                                    | 100                                      | 8                              | 15.0                                      |
| 2012                                                       |                                          |                                |                                           |
| W×W                                                        | 200                                      | 4                              | 0.4                                       |
| W×CK2                                                      | 200                                      | 5                              | 0.4                                       |
| CK2×CK2                                                    | 200                                      | 2.5                            | 12.0                                      |

表明:无核优系自交后仍有少量花粉在柱头萌发,自交不亲和现象不明显。

2)花粉管在花柱中生长情况。授粉 56 h 后,无核优系和鄂柑 1 号大部分花粉管到达花柱中上部,小部分可以抵达花柱基部(图 5A、C),授粉 120 h 后,大量花粉管可抵达花柱基部(图 5 B、D),二者花粉管生长过程均正常。

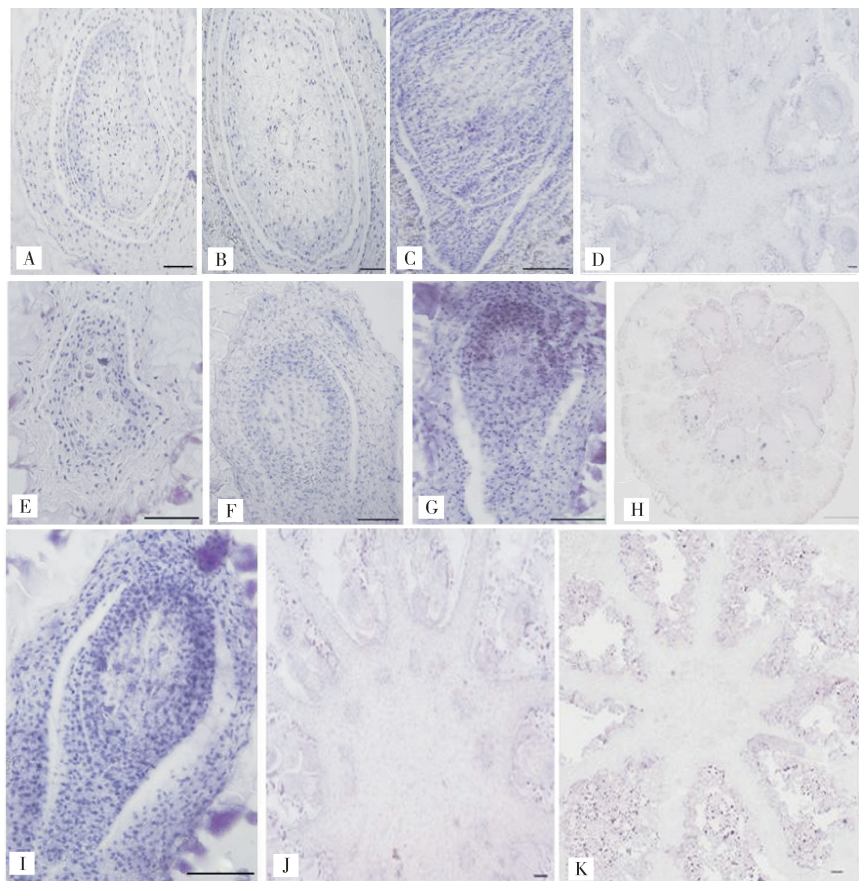
2.3 胚胎发育观察

鄂柑 1 号(CK2)自交授粉后胚胎发育正常;无核优系自交和无核优系(W)×鄂柑 1 号(CK2)杂交后,胚胎在发育过程均出现败育现象,且败育主要在授粉 3 周后出现,过程相似(图 6)。即授粉 1~2 周,胚胎发育正常,3 周后子房内部开始出现空腔(图 6 E、J),5 周后胚胎发育缓慢,极少数胚珠能发育成鱼雷形胚(图 6 I、F)。6 周后子房内部空腔更

果率与鄂柑 1 号自花授粉后的坐果率相近。而种籽数则差异较大,鄂柑 1 号自花授粉果实种籽数分别为 15 和 12,无核优系自花授粉或人工授粉其果实种籽数均不到 1 粒,达到无核或小核标准。

3 讨 论

花粉的萌发量及其活力对花粉管能否到达子房完成受精作用具有重要影响<sup>[11-12]</sup>。本研究中椪柑无核优系花粉有一定育性,自花授粉 24 h 后花粉在柱头的萌发率可保持 18%左右,56 h 后一些花粉管可顺利到达花柱基部,说明其为非自交不亲和类型。通过对授粉后胚胎发育进行解剖观察,发现无核优系自花及异花授粉后,胚胎前 2 周发育正常,但从第 3 周开始,胚珠内部逐渐出现空腔,部分胚珠发育迟缓或萎缩直至最终败育;椪柑无核优系授以育性高的花粉仍表现无核,与自花授粉相似。综上,优系的



A: 鄂柑 1 号心形胚(授粉 3 周); B: 鄂柑 1 号心形胚向鱼雷形胚过渡(授粉 5 周); C: 鄂柑 1 号子叶形胚(授粉 6 周); D: 鄂柑 1 号子房横切(授粉 3 周); E: 无核优系心形胚(授粉 3 周); F: 无核优系鱼雷形胚(授粉 5 周); G: 无核优系未退化的胚珠形态(授粉 6 周); H: 无核优系子房横切(授粉 6 周); I: W×CK2 鱼雷形胚(授粉 5 周); J: W×CK2 子房横切(授粉 3 周); K: W×CK2 子房横切(授粉 6 周).H 标尺=1 000  $\mu\text{m}$ ,其余标尺=50  $\mu\text{m}$ . A: E-gan No.1 heat-shape embryo at 3rd week; B: E-gan No.1 heat- shape embryo was growing into torpedo-shaped embryo at 5th week; C: E-gan No.1 cotyledon embryo at 6th week; D: E-gan No.1 ovarian transverse section at 3rd week; E: Seedless selection Ponka heat-shape embryo at 3rd week; F: Seedless selection Ponka torpedo-shaped embryo at 5th week; G: Seedless selection Ponka morphology of undegenerated ovules; H: Seedless selection Ponka ovarian transverse section at 6th week; I: W×CK2 torpedo-shaped embryo at 5th week; J: W×CK2 ovarian transverse section at 3rd week; K: W×CK2 ovarian transverse section at 6th week. Bar of H=1 000  $\mu\text{m}$ ,the others=50  $\mu\text{m}$ .

图 6 鄂柑 1 号、无核优系自交授粉及 W×CK2 杂交授粉后胚胎发育过程

Fig.6 Procedure of embryonic development after E-gan No.1,seedless selection Ponkan self-pollination and pollination of W×CK2

无核原因是胚胎的早期败育而与花粉育性及自交不亲和关联度不大,且无核性状稳定,可以作为潜在的优良品种进行试验示范推广。

参 考 文 献

[1] 陈立松,万蜀渊.一个新的柑桔突变体——‘桂林良丰’无核椪柑的细胞学鉴定[J].武汉植物学研究,1996,14(1):1-5.  
[2] 唐世民,胡炳洪.无核优质丰产椪柑新品系——黔阳无核椪柑的选育[J].中国南方果树,2001,30(5):3-6.

[3] 肖金平.柑桔无核机制及无核性状分子标记研究[D].杭州:浙江大学,2007.  
[4] 徐小彪,陈华,辜青青,等.无核椪柑——‘赣椪 1 号’花粉育性的研究[J].江西农业大学学报,2003,25(1):20-22.  
[5] 吕柳新,陈晓静.‘南靖 14 号’无核椪柑的初步研究[J].福建农学院学报,1985,14(3):247-251.  
[6] 胡志勇.无核瓠柑、温州蜜柑无核的细胞及分子机制研究[D].武汉:华中农业大学,2007.  
[7] 邓秀新,GROSSER J W,GMITTER F G.墨西哥来檬与伏令夏橙种间体细胞杂种的育性研究[J].遗传,1992,14(1):8-9.  
[8] 杨晓伶,程舟.柑橘类植物染色体制片新技术[J].同济大学学

报(自然科学版),2005,33(2):242-244.

[9] 李和平.植物显微技术[M].北京:科学出版社,2009,9-39.

[10] SOGO A,TOBE H. Mode of pollen tube growth in pistils of*Ticodendren Incognitum* (Ticodendraceae Fagales) and the evolution of chalazogamy [J]. Botanical journal of the Linnean Society,2008,157: 621-631.

[11] JIN B,WANG L,WANG J,et al.The structure and roles of

sterile flowers in *Viburnum macrocephalum* f. *keteleeri* (Adoxaceae) [J]. Plant biology,2010,12: 853-862.

[12] SUN C Q,HUANG Z Z,WANG Y L,et al..Overcoming pre-fertilization barriers in the wide cross between *Chrysanthemum grandiflorum* (Ramat.) Kitamura and *C. nankingense* (Nakai) Tzvel by using special pollination techniques [J]. Euphytica,2011,178: 195-202.

Cytological mechanisms of the elite seedless Ponkan accessions

ZHANG Yajing CHENG Yufang YI Hualin

Key Laboratory of Horticultural Plant Biology,Ministry of Education ,  
Huazhong Agricultural University,Wuhan 430070,China

**Abstract** The cytological mechanisms of the elite seedless Ponkan accession were systematically studied through comparing with its maternal parent Jiangxi Ponkan and E-gan No.1. Male gamete fertility,self-incompatibility and embryo development were investigated. The results showed that male gamete of Jiangxi seedless Ponkan developed abnormally and the pollen fertility of the elite seedless Ponkan was significantly lower than that of the control. Meanwhile the abnormal meiosis percentage of pollen mother cell was severely higher than that of the control. Morphological and anatomical structure of microspore mother cell of the elite seedless Ponkan was different from that of the control. The seedless Ponkan accession had self-compatibility and its pollen tubes grew downward through the style normally. Embryo abortion occurred at early developmental stage causing the seedlessness of the elite seedless accession. The 3rd week after pollination was the critical period to observe the embryo abortion. Seed numbers in fruit did not change significantly by self-pollination or cross-pollination. Embryo abortion is responsible for the elite seedless Ponkan accession.

**Keywords** seedless Ponkan tangerine; embryonic development; biological characteristics of pollen; self-incompatibility; pollination

(责任编辑:张志钰)