

文章编号: 1000-5692(2005)04-0359-04

无籽瓯柑无核原因的研究

曾燕如¹, 张炼炳¹, 斯金平², 徐象华²

(1. 浙江林学院 浙江省现代森林培育技术重点实验室, 浙江 临安 311300; 2 浙江省丽水市林业科学研究所, 浙江 丽水 323000)

摘要: 无籽瓯柑 *Citrus suavisissima* ‘Seedless’ 是浙江省新选育的柑橘良种。从花粉的角度对无籽瓯柑、普通瓯柑 *Citrus suavisissima*, 处红柚 *Citrus grandis* ‘Chuhong’ 和翡翠柚的 *Citrus grandis* 的花粉进行了花粉形态观测、花粉量测定、花粉生活力测定及花粉发芽试验等比较研究, 试图探索无籽瓯柑无籽的原因。结果表明, 4 个品种的花药数相近, 但无籽瓯柑的花药上罕见自然散发的花粉; 无籽瓯柑和普通瓯柑的花粉量接近, 两者无明显差异; 翡翠柚的花粉量是 4 个品种中数量最多的, 大约是瓯柑的 4 倍和处红柚的 2 倍; 普通瓯柑花粉的生活力与翡翠柚和处红柚的花粉生活力相当, 无籽瓯柑花粉的生活力略低; 无籽瓯柑在培养基上不发芽, 而普通瓯柑、处红柚和翡翠柚的花粉发芽率在蔗糖质量分数为 $100\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $150\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的培养基上接近。无籽瓯柑无籽是因为其花药上罕有自然散发的花粉以及花粉难发芽造成的。图 1 表 3 参 13

关键词: 园艺学; 无籽瓯柑; 花粉生活力; 花粉发芽率

中图分类号: S666 **文献标识码:** A

瓯柑 *Citrus suavisissima* 是分布在浙南瓯江沿岸最具特色的地方柑橘品种。其果实倒卵形, 风味独特, 略带苦味, 11 月中下旬成熟, 常温下可贮藏至翌年 5 月, 风味不变。但是, 普通瓯柑存在籽多、可食率低等缺点。为了充分开发瓯柑资源, 丽水市山水果树研究所和丽水市林科所在浙江省科技厅等单位的资助下, 从 1996 年开始瓯柑品种的选育, 选育出的无籽瓯柑 *Citrus suavisissima* ‘Seedless’ 新品种于 2004 年通过了浙江省林木良种审定委员会的良种认定。本文从花粉的角度对无籽瓯柑等 4 个品种的花粉进行了比较研究, 以揭示无籽瓯柑无核的原因。

1 材料与方法

1.1 材料

供试品种为无籽瓯柑、普通瓯柑、处红柚 *Citrus grandis* ‘Chuhong’ 和翡翠柚 *Citrus grandis*。这些品种含苞欲放的花苞 2004 年 4 月 25 日采自浙江省丽水市。样品采后立即带回实验室, 置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 并立即用于各项指标的测定。

1.2 测定指标与方法

在对各品种花苞形态及散粉情况进行观察的基础上, 就以下指标进行了测定。

收稿日期: 2004-08-15; 修回日期: 2005-06-20

基金项目: 浙江省科学技术厅重点项目(2003C20002)

作者简介: 曾燕如, 教授, 博士, 从事林木遗传育种学研究。E-mail: yzeng@zjfc.edu.cn

- 1.2.1 花粉粒形态测定 在载玻片上滴上液态琼脂，待凝固后将花粉吹到琼脂培养基上，以固定花粉。在光学显微镜下观察花粉粒的形态，用显微尺测量花粉的极轴长和赤道轴长。
- 1.2.2 花粉量测定 按徐小彪等^[1]的方法进行花粉量测定。取未开裂的花药 60 粒于研钵中研碎，使花粉粒充分散出，用蒸馏水洗涤，将洗液合并，加 1 滴吐温-80，并定容至 12.5 mL。测定前摇匀，用移液枪取 1 滴置于血球计数器中（0.1 mm，1/400 mm²），在 10 倍的显微镜下观察，数出每一中格中的花粉数。每一花药中的平均花粉量用公式 $n = (A \times 12.5 \times 1\,000 \times 10) / 60$ 计算。这里 A 为每一中格的花粉数， n 为每一花药中的平均花粉量。
- 1.2.3 花粉生活力测定 花粉生活力测定采用联苯胺-过氧化氢法和碘-碘化钾法。在联苯胺-过氧化氢法中，先在悬滴玻片上加上少量分散的花粉，再加上 1 滴由联苯胺、 α -萘酚和碳酸钠溶液混合而成的溶液，静置片刻后再加上 1 滴稀释了的体积分数为 30% 过氧化氢溶液。3~4 min 后在显微镜下观察，呈红色或深红色的花粉是有生命力的花粉，染色很浅或无色的是无生命力的花粉。在碘-碘化钾法中，在少量的花粉上滴上碘-碘化钾溶液，3~4 min 后在显微镜下观察，染成黑褐色或红褐色的花粉是有生命力的，而颜色浅或无色的花粉是无生命力的。如果花粉湿度过大而使花粉无法正常散出，则把花药和试剂一起研磨后观察，不影响实验结果。每个品种每种方法观察 10 个悬滴玻片，每片取 5 个视野，并计算有生活力花粉的百分比。
- 1.2.4 花粉发芽实验 将花苞置于 24~26℃ 恒温培养箱中干燥 8 h，使其花粉充分散出。将配制的琼脂（10 g·kg⁻¹）-蔗糖（50~200 g·kg⁻¹，每 50 g·kg⁻¹ 一个梯度）固体培养基在微波炉中加热融解，用移液枪将液态培养基滴到载玻片上，冷却后将花粉接种到培养基上。然后将载玻片放入带有湿润滤纸的培养皿中，盖上培养皿的盖子，将培养皿放置在 24~26℃ 的恒温培养箱中培养 24 h，镜检发芽率。每个梯度观察 10 个玻片，每片取 5 个视野，并计算花粉发芽率。

2 结果与分析

2.1 形态学观察结果

4 个品种中以翡翠柚的花苞最大，其次为处红柚，无籽瓯柑与普通瓯柑的花苞较小，大小相近；柚类的花瓣数较瓯柑少，只有 4~5 个；4 个品种的花药数相近，每朵为 24~31 个花药，无籽瓯柑的雄蕊中有 1~2 个雄蕊相对较长，而普通瓯柑的雄蕊长短几乎一致。另外，4 个品种的花苞室内放置 2~3 d 后观察，发现花苞自然开裂，普通瓯柑、处红柚和翡翠柚的花药上有自然散发的花粉，而无籽瓯柑的花药上却罕见自然散发的花粉。

2.2 花粉粒形态测定

花粉粒长宽度测定结果见表 1。4 个品种的花粉呈长圆形，无畸形。无籽瓯柑、普通瓯柑和处红柚花粉的宽度接近，无明显差异，翡翠柚的花粉明显地比其他 3 个品种要宽，平均达 27.19 μm 。普通瓯柑与处红柚花粉的长度相近，但普通瓯柑的花粉明显地比无籽瓯柑的花粉要长，4 个品种中还是翡翠柚的花粉最长，达 47.18 μm 。从花粉的长宽比来看，无籽瓯柑的比值最小，其余 3 个品种相近。可以认为无籽瓯柑的花粉粒最小，翡翠柚的花粉粒最大。

2.3 花粉量测定

花粉量测定的结果见图 1。实验结果表明，无籽瓯柑和普通瓯柑的花粉量接近，两者无明显差异，分别为 1 105 粒·花药⁻¹和 1 130 粒·花药⁻¹；处红柚的花粉量约是无籽瓯柑与普通瓯柑的 2 倍；翡翠柚的花粉量为 4 884 粒·花药⁻¹，是 4 个品种中数量最多的，分别约是瓯柑的 4 倍和处红柚的 2 倍，和其他 3 个品种的花粉数量有明显的差异。

表 1 无籽瓯柑等 4 个柑橘品种花粉粒的长度与宽度

Table 1 The length and width of pollens of 4 varieties			
品种	花粉长度/ μm	花粉宽度/ μm	长/宽
无籽瓯柑	29.21	20.22	1.45
普通瓯柑	39.33	21.00	1.87
处红柚	40.13	22.92	1.75
翡翠柚	47.18	27.19	1.74

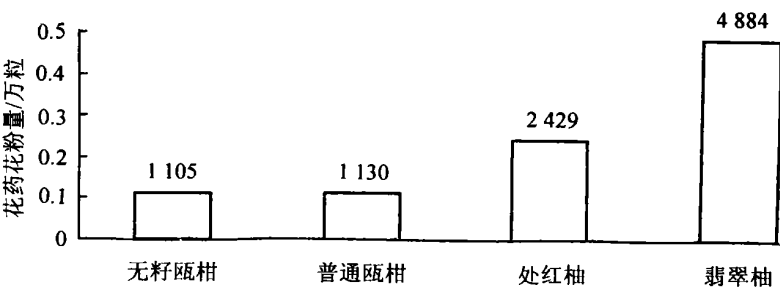


图 1 瓯柑 4 个品种的花粉量
Figure 1 The number of pollens of 4 varieties

2 4 花粉生活力测定

用联苯胺-过氧化氢法测定的结果表明，普通瓯柑花粉的生活力与翡翠柚和处红柚的花粉生活力相当，翡翠柚、处红柚和普通瓯柑分别为 87.14%，85.63%和 85.24%，无籽瓯柑花粉的生活力略低，为 75.89%。用碘-碘化钾法测定 4 个品种花粉生活力的结果与联苯胺-过氧化氢法基本一致，翡翠柚、处红柚和普通瓯柑分别为 87.54%，84.62%和 85.15%，而无籽瓯柑的生活力最低，为 75.13%（表 2）。实际操作时，联苯胺-过氧化氢法比碘-碘化钾法更为简便。

表 2 无籽瓯柑等 4 个品种花粉生活力的比较
Table 2 A comparison among 4 varieties of orange in pollen viability

测定方法	不同品种花粉生活力/%			
	翡翠柚	处红柚	普通瓯柑	无籽瓯柑
联苯胺-过氧化氢法	87.14	85.63	85.24	75.89
碘-碘化钾法	87.54	84.62	85.15	75.13

2 5 花粉发芽试验

蔗糖质量分数是影响花粉发芽率的重要因素之一^[3]。通过预备实验，发现无籽瓯柑在 50~200 g·kg⁻¹（50 g·kg⁻¹ 一个梯度）4 种不同蔗糖质量分数的培养基上均无发芽；普通瓯柑、处红柚和翡翠柚在质量分数为 50 g·kg⁻¹ 与 200 g·kg⁻¹ 的培养基上的发芽率极低，一般低于 5%，可以认为没有发芽，而蔗糖质量分数为 100 g·kg⁻¹ 和 150 g·kg⁻¹ 培养基上的花粉发芽率接近。因此，同一花粉在不同蔗糖质量分数的培养基上，其发芽率是各不相同。普通瓯柑和处红柚培养基最佳的蔗糖质量分数为 150 g·kg⁻¹，发芽率分别为 49.5%和 39.62%，而翡翠柚培养基最佳的蔗糖质量分数为 100 g·kg⁻¹，发芽率为 44.76%（表 3）。

表 3 无籽瓯柑等 4 个柑橘品种花粉发芽率
Table 3 The percentage of germinated pollens of 4 varieties

培养基蔗糖质量分数/（g·kg ⁻¹ ）	不同瓯柑品种花粉发芽率/%			
	翡翠柚	处红柚	普通瓯柑	无籽瓯柑
50	≤5	≤5	≤5	0
100	44.76	33.33	34.23	0
150	33.97	39.62	49.25	0
200	≤5	≤5	≤5	0

花粉在培养基上的培养时间一般不宜超过 48 h，因为所有的操作都是非无菌操作。48 h 后观察，只能在显微镜下观察到成团的霉菌和被污染的花粉，而且霉菌生长消耗了大量的养分，在霉菌斑旁边的花粉，花粉管根本无法萌发，即使有也很细小。

3 讨论

造成柑橘无核的主要原因有花药及花粉母细胞退化、减数分裂中染色体变异、花粉粒退化和环境异常等引起的雄性不育、胚囊育性下降、自交不亲和及胚胎败育等因素^[3]，而雄性不育表现为花药退化、花药内无花粉和花粉败育。在本研究中，通过对无籽瓯柑花粉的形态观察和测定，发现无籽瓯柑花器发育正常，不存在花粉畸形引起无核。无籽瓯柑的花粉虽然很少，但和普通瓯柑相接近，而普通瓯柑在如此少的花粉量下能产生种子，说明无籽瓯柑无核的原因不可能是花药退化或者花药内不产生

花粉引起的。无籽瓯柑与普通瓯柑花粉性状上的主要差异是其花粉几乎不发芽和很少有自然散发的花粉，尽管实验表明无籽瓯柑的花粉具有生活力。一般花粉生活力低与花粉败育总是联系在一起的，但在山葡萄品种双庆 *Vitis venifera* ‘Shuangqing’ 及巨峰 *Vitis venifera* ‘Kyoho’ 中，其花粉的生活力分别达 71% 和 66%，但存在因花粉败育而导致自然坐果率低的现象^[4]。因此花粉败育和自然散发花粉少是无籽瓯柑无核的主要原因。DNA 水平的研究从遗传学角度证实，无籽瓯柑和普通瓯柑遗传上是有差别的，无核可能是通过遗传变异产生的(另文发表)，在酸橙 *Citrus aurantium* 中就发现有种子偏少的基因^[9]。转雄性不育基因可阻碍可育花粉的形成，进而产生无籽的孤雌生殖现象^[6]，而孤雌生殖是由 3 个显性基因决定的^[7]。不少报道表明，果树品种无核(少核)类型多数与花粉育性下降有关^[8~13]。

参考文献:

[1] 徐小彪, 陈华, 辜青青, 等. “赣 1 号”无核 柑花粉育性的研究[J]. 浙江柑橘, 2002, 19(增刊): 57—59.
[2] 赵长星, 刘成连. 培养基种类及蔗糖浓度对部分果树花粉发芽率的影响[J]. 河北林果研究, 2001, 16(3): 240—243.
[3] 温寿星, 蔡子坚. 我国无核柑橘不育研究概况[J]. 福建果树, 2000, (2): 15—16.
[4] 宋润刚, 路文鹏, 李昌禹, 等. 山葡萄孢粉学的研究[J]. 特产研究, 1996, (3): 5—8.
[5] Koltunow A M, Brennan P, Protosaltis S, et al. Regeneration of West Indian Limes (*Citrus aurantifolia*) Containing Genes for Decreased Seed Set [R]. Eilat: ISHS Acta Horticulturae 535-First International Citrus Biotechnology Symposium, 2000.
[6] Koltunow A M, Vivian-Smith A, Sykes S R. Molecular and Conventional Breeding Strategies for Seedless Citrus [R]. Eilat: ISHS Acta Horticulturae 535-First International Citrus Biotechnology Symposium, 2000.
[7] Vardi A, Neumann H, Frydman-Shani A, et al. Tentative Model on the Inheritance of Juvenility, Self-incompatibility and Parthenocarpy [R]. Eilat: ISHS Acta Horticulturae 535-First International Citrus Biotechnology Symposium, 2000.
[8] 魏文娜, 陈球明, 杨锡刚. 黔阳无核大红甜橙经济性状及无核原因的分析[J]. 湖南农业大学学报, 1994, 20(3): 207—214.
[9] 郑敏磁, 郭枢, 吴坤用, 等. 柑橘新本 1 号罐藏品种研究总结[J]. 浙江柑橘, 1984, 11(1—2): 15—18.
[10] 林显荣. 无核瓯柑 79-103 的选育[J]. 中国柑橘, 1990, 19(2): 10—13.
[11] 周育彬, 彭定秀, 陈善春, 等. 中育 7 号和中育 8 号无核甜橙的经济性状及遗传学鉴定[J]. 中国柑橘, 1990, 19(4): 9—11.
[12] 李玉堂. 辐射诱变少核红毛橙的初步研究[J]. 四川农业大学学报, 1987, 5(4): 285—290.
[13] 周碧容, 邱继水, 水志雄, 等. 穗龙 1 号无核甜橙无核原因研究[J]. 中国柑橘, 1993, 22(2): 20—21.

Preliminary study on seedlessness of seedless Ougan

ZENG Yan-ru¹, ZHANG Lian-bing¹, SI Jin-ping², XU Xiang-hua²

(1. Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300 Zhejiang, China; 2. Lishui Forestry Institute of Zhejiang Province Lishui 323000 Zhejiang, China)

Abstract: *Citrus suavisissima* ‘Seedless’ is a superior, newly selected and bred variety. Pollens of such varieties as *Citrus suavisissima* ‘Seedless’, *Citrus suavisissima*, *Citrus grandis* ‘Chuhong’, *Citrus grandis* were examined in terms of morphology, quantity, viability and germination percentage in order to explore the reason behind the seedlessness of *Citrus suavisissima* ‘Seedless’. The results showed that these four varieties were similar to one another in the number of anthers, but naturally released pollens were rarely seen on the anthers of *Citrus suavisissima* ‘Seedless’; in quantity of pollens, there was no obvious difference between *Citrus suavisissima* ‘Seedless’ and *Citrus suavisissima*, but *Citrus grandis* had 4 times as many pollens as *Citrus suavisissima* and twice as many pollens as *Citrus grandis* ‘Chuhong’, *Citrus suavisissima*, *Citrus grandis* ‘Chuhong’, and *Citrus grandis* were similar in pollen viability, while *Citrus suavisissima* ‘Seedless’ had a pollen viability a little bit lower than other 3 varieties; and *Citrus suavisissima* ‘Seedless’ had no germinated pollen in all the media tested, but other 3 varieties had a similar percentage of germinated pollens in the media with 100 g·kg⁻¹ and 150 g·kg⁻¹ of sucrose in them. It is concluded that rare naturally released pollens and difficulty in pollen germination were responsible for seedlessness of *Citrus suavisissima* ‘Seedless’ [Ch, 1 fig. 3 tab. 13 ref.]

Key words: horticulture; *Citrus suavisissima* ‘Seedless’; pollen viability; percentage of pollen germination