

溪蜜柚和度尾蜜柚自交和互交胚珠发育状况的比较*

王 平¹ 吕柳新^{1*} 薛勇彪² 李周歧¹ 陈桂信¹ 黄代青³

(1. 福建农林大学园艺学院, 福州 350002; 2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所植物遗传与发育实验室, 北京 100080; 3. 福建师范大学生物工程学院, 福州 350007)

摘 要: 用石蜡切片技术对 溪蜜柚(*Citrus grandis* cv. Guanximiyou)和度尾蜜柚(*C. grandis* cv. Duweimiyou)自交和互交胚珠发育进行了比较观察。溪蜜柚的自交授粉后胚珠发育有 2 种不同情形(I 型和 II 型), I 型在授粉后 5 d 的珠心组织细胞有变形现象, 接着胚囊萎缩, 但外珠被能生长发育到 50 d 左右; II 型受精后胚乳发育异常, 种子不能发育。度尾蜜柚自交胚囊中胚乳没有出现, 在授粉后 35 d 左右珠心组织和囊腔同时萎缩。互交胚珠发育正常, 成熟果实有籽。表明两品种是自交不亲和的, 导致了果实无籽。但两者的识别反应和阻抑部位不同, 溪蜜柚 I 型可能出现在受精前, II 型出现在受精后, 而度尾蜜柚自交花粉管可能没有进入胚囊, 是一种受精前的障碍。瘪籽的大小与不亲和障碍发生的时期有关。实验为进一步研究两品种的自交不亲和性遗传机理提供了实验证据, 将有助于解决由于果实无籽导致的汁胞粒化、裂果、裂瓣等品质问题。

关键词: 溪蜜柚; 度尾蜜柚; 自交; 互交; 胚胎发育

中图分类号: S 666.3; Q 944.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2002)06-0409-04

Ovule Development in *Citrus grandis* cv. Guanximiyou and Duweimiyou under Selfing and Crossing Conditions

WANG Ping¹, LU Liu-Xin¹, XU E Yong-Biao², LI Zhou-Qi¹, CHEN Gui-Xin¹, HUANG Dai-Qing³

(1. Department of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2. Institute of Genetics and Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;
3. Bioengineering College, Fujian Teacher's University, Fuzhou 350007, China)

Abstract: The development of ovule was studied after self- and cross-pollination of *Citrus grandis* cv. Guanximiyou (GXM) and Duweimiyou (DWM) by paraffin section. GXM after selfing showed two ovular developmental patterns (Type I and Type II). In Type I, nucellar cells were deformed 5 days after pollination (ADP), followed by the atrophy of embryo sac, but outer integument continued to develop for 50 ADP; in Type II, endosperm developed abnormally and eventually aborted. DWM after selfing showed endospermless. Nucellar cells and embryo sac simultaneously atrophied 35 ADP. The development of ovule in crosses between GXM and DWM was normal and result in normal seed formation. These results demonstrate that GXM and DWM are self-incompatible, which is the main reason for seedless fruit. The recognition response and inhibition process occur in different development stage, before fertilization in Type I and after fertilization in Type II, respectively. In contrast, self-cross pollen tubes in DWM are unable to reach embryo sac with self-incompatible reaction occurred only before fertilization. It appears that aborted seed sizes are related to the time of self-incompatible reaction. In addition, our results will facilitate investigation on the genetic basis of self-incompatibility in Citrus and provide solutions to

收稿日期: 2002-07-13, 修回日期: 2002-11-27。

* 基金项目: 福建省教育厅科技计划项目(K02063)资助。

作者简介: 王平(1968-), 男, 讲师, 果树学专业, 从事园艺植物遗传与育种以及生物技术教学和科研工作。

** 通讯作者。

juice sac granulation, dehiscent fruit and cracked valve often associated with seedless cultivars.

Key words: *Citrus grandis* cv. Guanximiyou; *Citrus grandis* cv. Duweimiyou; Self-cross; Mutual-cross; Embryo development

芸香科中的溪蜜柚和度尾蜜柚,其果实无籽,果肉风味极佳,是具有很高经济价值的果树。但由于无籽,导致在果实成熟和储藏过程中,存在一些如汁胞粒化(juice sac granulation)、裂果(dehiscent fruit)、裂瓣(cracked valve)等问题,严重影响品质及其商品价值。一些研究表明,无籽原因可能与它们具有自交不亲和(self-incompatibility, SI)^[1,2]特性有关,若无异花授粉,果实中仅有败育种子(种皮)^[3,4]。笔者试图通过对两品种自交和互交后胚囊发育状况的比较观察,以查明无籽原因,并为解决品质问题寻找有效途径。

1 材料与方法

1.1 供试品种

溪蜜柚,种植于福建农林大学植物园;度尾蜜柚,种植于仙游县度尾镇果场。

1.2 授粉试验

人工控制授粉。设计4个组合,自交组合2组:A-溪蜜柚自交;B-度尾蜜柚自交。互交组合2组:C-溪蜜柚×度尾蜜柚;D-度尾蜜柚×溪蜜柚。每个组合授粉100朵。

1.3 采样时期

从授粉后5 d开始,各组合每隔15 d随机取幼果10个,取出胚珠进行固定。一直到授粉后65 d左右为止,此时已见互交组合幼胚发育、自交组合胚囊败育。共观察5个时期。

1.4 石蜡切片

将胚珠在改良的卡诺氏固定液(冰乙酸70%乙醇=1:3)中固定,接着用爱氏苏木精和0.1%的碱性品红染色、硫酸亚铁胺分色,后进行脱水、石蜡包埋固定、切片、脱蜡和用加拿大树胶封片,在显微镜下观察胚胎发育状态。

2 结果比较

溪蜜柚和度尾蜜柚胚珠倒生卵形,为厚珠心,珠孔端一般有8至20层珠心组织细胞。大多数为单珠心,偶有出现双珠心或三珠心。两个品种在自花授粉时,果实无籽,但在完全异花授粉情况下,果实中种子都多达100~200粒,且无瘪籽出现,表明其胚珠发育是正常的^[3-6]。现将观察结果报道如下。

2.1 授粉后5 d胚珠的发育状况

溪蜜柚自交5 d后,胚珠的发育有2种不同的状态:一种是珠心细胞开始出现萎缩,胚囊周围个别珠心细胞拉长,呈棒状。胚囊腔呈不规则长椭圆形,胚囊内珠孔端有卵细胞和助细胞,但没有胚乳出现(以下简称为Ⅰ型,图版:1);另一种则珠心组织细胞发育正常,胚囊腔呈规则的椭圆形,在珠孔端卵细胞和助细胞呈倒卵形或柱形,其顶端有少量游离胚乳出现(以下简称为Ⅱ型,图版:2)。度尾蜜柚自交5 d后,珠心组织细胞生长尚正常,胚囊腔小,短圆形,在珠孔端可以看到很小的2个细胞(图版:3)。在2个互交组合中,授粉后5 d的胚珠珠心组织细胞层次分明,细胞排列紧凑,胚囊腔椭圆形,在珠孔端有合子和宿存助细胞,其顶端已开始有游离胚乳核出现(图版:4)。

2.2 授粉后20 d胚珠的发育状况

授粉后20 d,溪蜜柚自交Ⅰ型从合点端到珠孔端的珠心组织细胞进一步萎缩解体,细胞壁连成带状。胚囊空腔虽有一定的扩大,但与互交胚囊相比,空腔发育狭长,且边缘模糊,珠孔端的卵细胞与助细胞已萎缩成一团(图版:5);Ⅱ型胚囊有所发育,胚囊腔稍变大,椭圆形,珠孔端见有倒卵形或柱形的2个细胞瓦解或稍缩小,游离胚乳增多(图版:6)。度尾蜜柚自交组合中,此时胚囊没有很好地发育或发育缓慢,囊腔狭长(图版:7),有些珠孔端仍可以看到完整的卵细胞和助细胞。而互交组合,其胚囊周围珠心组织细胞发育正常,个别珠心细胞开始瓦解,其胚囊与溪蜜柚和度尾蜜柚自交组合相比,胚囊腔发育大,且边缘清晰,胚乳迅速增多,呈游离核状态。在珠孔端有缩小的似柱形或合子细胞,可能是处于休眠的合子(图版:8)。

2.3 授粉后35 d胚珠的发育状况

授粉后35 d,溪蜜柚自交Ⅰ型珠心组织细胞进一步萎缩,内珠被停止发育,而外珠被仍继续生长,导致了内外珠被分离,胚囊腔变得狭长,胚囊腔内物质已萎缩一团(图版:9)。Ⅱ型胚囊周围珠心组织细胞萎缩现象尚不明显,但整个胚珠发育缓慢,也出现内外珠被稍有分离,胚乳开始出现萎缩的迹象(图版:10)。度尾蜜柚自交组合,此时胚珠生长停顿,胚囊和珠心组织同时萎缩(图版:11),形成

大小0.2 cm左右的瘿籽(图版:19上)。而此时互交的胚囊里合子和胚乳发育正常,合子仍处于休眠的单细胞状态,胚囊腔进一步增大,周围光滑,胚乳逐渐占据整个胚囊(图版:12)。

2.4 授粉后50 d 胚珠的发育状况

授粉后50 d, 溪蜜柚自交 型珠心组织细胞到此时已完全萎缩,外珠被发育到此阶段也停止(图版:13),形成大小0.5 cm左右的瘿籽(图版:19下)。 型珠心组织细胞没有萎缩,因而胚囊还会发育,但胚乳开始出现萎缩(图版:14)。度尾蜜柚自交组合,整个珠心组织和胚囊萎缩直至消失(图版:15)。在两个互交组合的胚囊里,这一时期胚囊腔迅速增大,相当于15 d前的2~3倍,胚乳逐渐占据整个胚囊。个别合子已开始分裂,形成合子胚(图版:16)。

2.5 授粉后65 d 胚珠的发育状况

授粉后65 d左右,自交组合只有 溪蜜柚 型胚珠的内外珠被能发育到这个阶段,但未见有合子胚的生长,珠心组织细胞和胚乳逐渐萎缩(图版:17),最终成为0.7~1 cm左右的瘿籽(图版:20)。而互交组合的胚囊里开始出现球形胚(图版:18),胚周围的胚乳组织开始解体瓦解,直至整个胚乳组织消失,球形胚发育成心形胚、鱼雷形胚,一直到子叶胚占据整个胚囊成为正常种子。

3 讨论

在对 溪蜜柚和度尾蜜柚自交和互交亲和性荧光观察实验中,发现自交花粉粒在柱头上萌发都很正常,花粉管能沿柱头的细胞间隙进入花柱道、子房,甚至一直进入到胚囊^[5]。本实验对自交和互交后的胚珠发育进行了研究,发现 溪蜜柚自交后,胚珠发育比较复杂,出现了上述 型和 型2种状态。 型在授粉后5 d的珠心组织细胞就开始发育不正常,接着胚囊萎缩,但外珠被尚能生长发育到50 d左右; 型珠心组织细胞开始时发育尚正常,从胚囊的状况来看,胚囊空腔变大,呈椭圆形,有胚乳出现,由此推测,这一类型可能存在受精现象。但从受精开始就孕育着不正常,在35 d左右发现胚乳开始出现萎缩,其珠心组织和内外珠被虽能继续发育一段时间,但不久亦停顿,导致种子的早期陆续败育。因此,在成熟的果实里会观察到大小有0.5 cm或0.7~1 cm不等的瘿籽。度尾蜜柚自交组合,在授粉20 d后就见到内外珠被出现轻微分离,胚囊不能很好地发育,珠心组织和胚囊腔开始萎缩,个别的仍可看到

完整的2个细胞(卵细胞和助细胞)。随后胚珠生长便停顿,胚囊和珠心组织同时萎缩。因此,度尾蜜柚仅有很小瘿籽(0.2 cm左右)。由此说明,2个品种的不亲和识别反应部位和阻抑过程是不同的, 溪蜜柚既可能在子房、胚珠组织发生阻抑(受精前障碍),亦可能发生在受精后的胚囊中(受精后障碍);而度尾蜜柚的不亲和阻抑反应与 溪蜜柚I型一样发生在受精之前。自交果实中瘿籽的大小与不亲和障碍发生的时期有关,这个结果与解剖观察到的瘿籽停止生长的时期及其所能达到的大小相符。

本试验表明,两品种的自交不亲和表现不同于其他一些如蔷薇科、茄科、金鱼草以及柚类品种中的沙田柚、奥兰多橘柚等配子体自交不亲和类型^[7-10],这些不亲和类型的阻抑部位是在花柱。而 溪蜜柚自交不亲和的阻抑反应较为复杂,有2种不同情况,一种是不亲和花粉管能到达胚珠,但不能受精,阻抑部位发生在子房或胚珠,属于受精前障碍;另一种情况与热带植物可可(*Theobroma cacao*)的自交不亲和性反应相似,它能发生配子融合,但珠心组织及胚乳等发育异常,种子不能发育,属于受精后障碍。据报道,可可的花粉为配子体不亲和类型,而卵为孢子体不亲和类型^[11], 溪蜜柚自交不亲和阻抑机制是否与之有相同之处,还需对两者作进一步的比较研究。

度尾蜜柚以及 溪蜜柚的 型自交不亲和反应与萱草、百合、番荔枝和茶 子等属的一些种的阻抑机制相似,抑制部位发生在子房或胚珠组织中。这些物种的一个共同特征是花柱为中空,据报道,在花柱中空的系统中,不亲和反应仅存在于子房中^[2,12]。但是,在沙田柚、长花百合等中空花柱系统中,抑制作用却发生在花柱部位上^[8,13]。

本试验进一步证实 溪蜜柚与度尾蜜柚的无籽是由自交不亲和所致。两品种在无其它品种混栽情况下,也能够正常结果,与异花授粉相比,结实率没有差别,表明它们具有很强的单性结实能力。但由于果实无籽,使其内源激素供应不足,从而导致了果实发育后期汁胞粒化、裂果、裂瓣等严重问题。不过,只要在有少量种子的情况下,这些品质问题便会得到改善^[3,4]。因此进一步研究两品种的自交不亲和特性和遗传机理,从生理生化或生物技术上采取一定措施,使其产生少量种子,以改善品质,可能是比较有效的一条途径。

参考文献:

[1] Charlesworth D. Self-incompatibility. *Curr Biol*,

2002, **12**(12): 424 – 426.

[2] 刘定富, 薛勇彪. 植物生殖遗传学. 北京: 科学出版社, 1995. 214 – 295.

[3] 潘东明, 郑国华, 陈桂信, 等. 溪蜜柚汁胞粒化原因分析. 果树科学, 1999, **16**(3): 202 – 209.

[4] 吴智仁, 陈文山. 度尾蜜柚裂果原因及克服措施. 中国柑橘, 1987(2): 33.

[5] 王平, 吕柳新, 薛勇彪, 等. 溪蜜柚和度尾蜜柚自交和互交亲和性观察. 福建农林大学学报, 2002, **31**(2): 339 – 342.

[6] 吕柳新, 陈桂信. 蕉柑大孢子与珠心胚的发生发育, 福建农业大学学报, 1997, **26**(4): 397 – 400.

[7] Xue Y, Carpenter R, Dickinson H G, *et al.* Origin of allelic diversity in *A ntirrhinum* S-locus RNases. *Plant Cell*, 1996, **8**: 805 – 814.

[8] 薛妙男, 陈腾士, 杨继华. 沙田柚自交和异交亲和性观察. 园艺学报, 1995, **22**(2): 127 – 132.

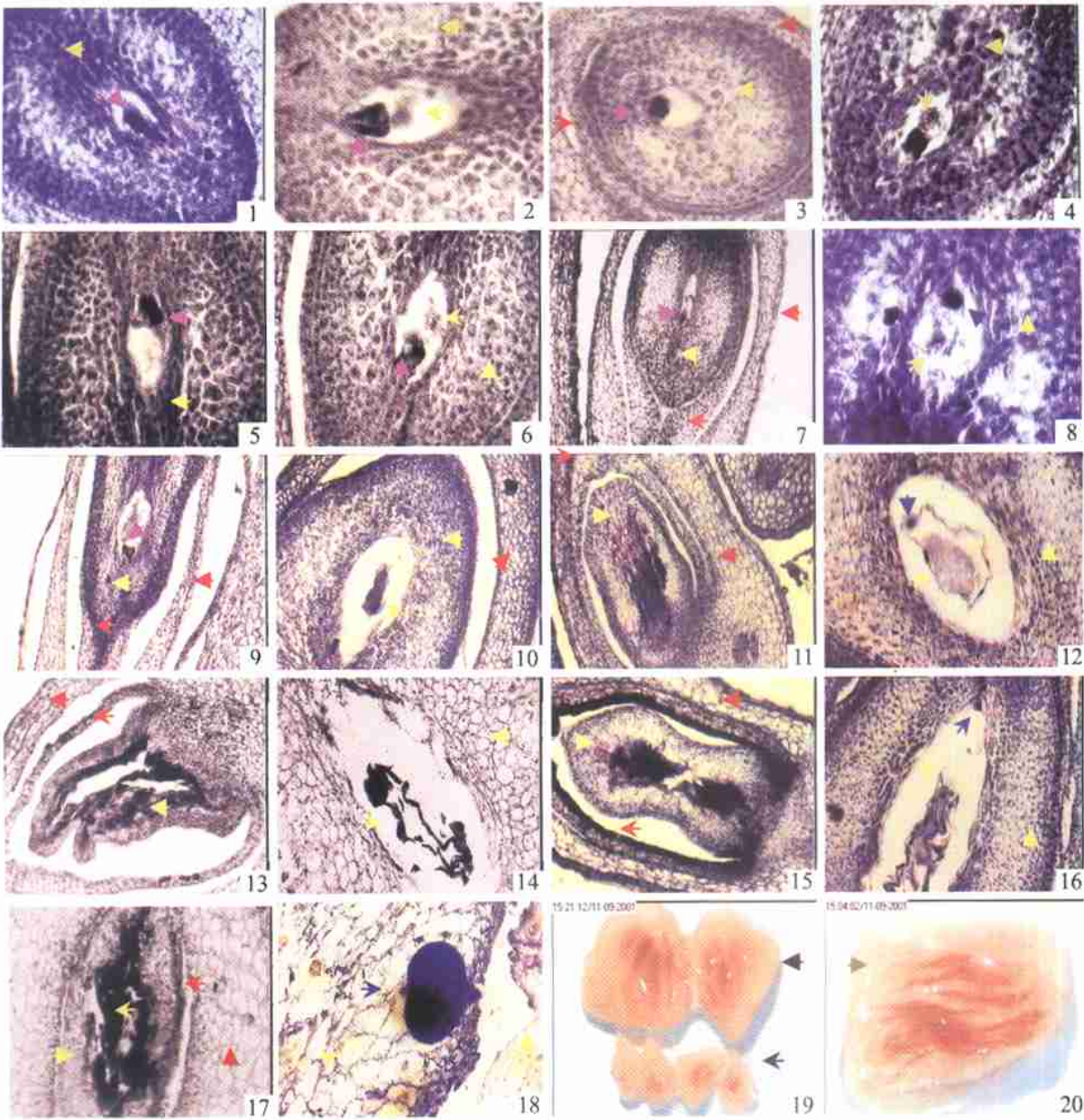
[9] Lange J H. Pollen tube growth in Citrus. *A groplatae*, 1973, **5**(3): 73 – 77.

[10] Ton L D, Krezdorn A H. Growth of pollen tubes in three incompatible Citrus varieties. *J Amer Soc Hort Sci*, 1967, **80**(2): 211 – 215.

[11] Hasenstein K H, Zavada M S. Auxin modification of the Incompatibility response in *Theobroma cacao*. *Physiol Plant*, 2001, **112**(1): 113 – 118.

[12] Brewbaker J L. Pollen cytology and self-incompatibility systems in Plants. *J Hered*, 1957, **48**: 271 – 277.

[13] Lewis D. Sexual Incompatibility in Plants. [s. l.] : Edward Arnold (Publishers) Limited, 1979.



● 珠心组织 (nucellar cells) ● 胚乳 (endosperm) ● 合子 (zygote) ● 胚 (embryo)
● 卵细胞和助细胞 (egg and synergid) ● 外珠被 (outer integument) ● 内珠被 (inner integument)
● G1 (aborted seeds in GXM type I) ● D (aborted seeds in DWM) ● G2 (aborted seeds in GXM type II)

1, 5, 9, 13 分别为 溪蜜柚自交 型授粉后 5 d (×400)、20 d (×400)、35 d (×200)、50 d (×100) 胚珠发育状况。2, 6, 10, 14, 17 分别为 溪蜜柚自交 型授粉后 5 d (×400)、20 d (×400)、35 d (×200)、50 d (×100)、65 d (×100) 胚珠发育状况。3, 7, 11, 15 分别为度尾蜜柚自交授粉后 5 d (×400)、20 d (×400)、35 d (×200)、50 d (×100) 胚珠发育状况。4, 8, 12, 16, 18 分别为互交授粉后 5 d (×400)、20 d (×400)、35 d (×200)、50 d (×100)、65 d (×100) 胚珠发育状况。19 (G1) 为 溪蜜柚自交 型瘪籽 (×4), (D) 为度尾蜜柚自交瘪籽。20 为 溪蜜柚自交 型瘪籽 (×4)
1, 5, 9, 13 show developing status of the ovules on the 5th (×400), 20th (×400), 35th (×200) and 50th (×100) ADP in GXM type I respectively. 2, 6, 10, 14, 17 show developing status of the ovules on the 5th (×400), 20th (×400), 35th (×200), 50th (×100) and 65th (×100) ADP in GXM type I respectively. 3, 7, 11, 15 show developing status of the ovules on the 5th (×400), 20th (×400), 35th (×200) and 50th (×100) ADP in DWM respectively. 4, 8, 12, 16, 18 show developing status of the ovules on the 5th (×400), 20th (×400), 35th (×200) and 50th (×100), 65th (×100) ADP in GXM × DWM or DWM × GXM respectively. 19 (G1) shows aborted seeds in GXM type I, (D) shows aborted seeds in DWM (×4). 20 (G2) shows aborted seeds in GXM type II (×4)