

柑桔种间体细胞杂种的花粉特性及贮藏研究

刘艳玲^{1,2}, 夏仁学^{1*}, 李国怀¹, 马梦亭¹, 伊华林¹

(1. 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070; 2. 中国科学院武汉植物研究所/武汉植物园, 武汉 430074)

摘要: 对粗柠檬与‘哈姆林’甜橙种间体细胞杂种的花粉特性(形态、花粉量、生活力等)进行了观察、检测,并于-20℃的低温条件下开展了贮藏试验。结果表明:花粉离体萌发的适宜培养基为0.8%琼脂+16%蔗糖+10mg/kg硼酸,萌发率为15.31%,其生活力介于两亲本之间,可作为杂交亲本进一步被利用。贮藏试验结果显示:以真空、干燥(CaCl₂或硅胶作干燥剂)贮藏花粉的效果较好。授粉试验证明,贮藏花粉与新鲜花粉的座果率差异不显著,说明低温、真空和干燥是贮藏粗柠檬与‘哈姆林’甜橙种间体细胞杂种花粉的较适条件。

关键词: 柑桔; 种间体细胞杂种; 花粉特性; 花粉贮藏

中图分类号: Q945; S666

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2003)03-0254-05

Study on the Pollen Characteristics and Storage of *Citrus* Interspecific Somatic Hybrid

LIU Yan-Ling^{1,2}, XIA Ren-Xue^{1*}, LI Guo-Huai¹, MA Meng-Ting¹, YI Hua-Lin¹

(1. College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Wuhan Botanical Garden/Wuhan Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: The pollen characteristics of *Citrus* interspecific somatic hybrid ‘Hamlin sweet orange (*Citrus sinensis*) + Rough lemon (*Citrus jambhiri*)’ was observed. The results showed that the medium containing 16% sucrose, 10 mg/kg H₃BO₄ and 0.8% agar *in vitro* culture was suitable for pollen germination, and the pollen germinability of ‘Hamlin sweet orange+ Rough lemon’ was 15.31%, which indicated that the viability of interspecific somatic hybrid was intermediate to its parents and could be used as parent in future crossing. Pollen grains of ‘Hamlin sweet orange + Rough lemon’ were stored at -20℃. The results showed that vacuum and dry condition (calcium chloride or silica gel as desiccants) were benefit for the pollen storage. And the results of artificial pollination also showed that the fruit set with fresh pollen and stored pollen was not significantly different. Thus low temperature, vacuum and dry condition were benefit for the pollen storage of *Citrus* somatic hybrid.

Key words: *Citrus*; Interspecific somatic hybrid; Pollen characteristics; Pollen storage

随着原生质体融合技术在柑桔育种上的应用与发展,异源四倍体体细胞杂种的潜在价值逐步显示出来^[1-3]:除作为砧木(具抗寒、抗某些病虫害,生长势强等优点)外,还可作为杂交亲本被利用。即以异源四倍体体细胞杂种作父本,与单胚性柚杂交后,并

结合胚抢救技术可创造具有三亲优良性状的无籽三倍体柑桔品种^[4-6],因此研究体细胞杂种花粉特性(包括花粉形态、花粉量、生活力等)对三倍体柑桔品种的培育具有重要意义。

然而异源四倍体体细胞杂种由于倍性的增加,

收稿日期: 2002-09-18, 修回日期: 2003-01-15。

基金项目: 国务院三峡建设委员会移民科技项目及国家 948 项目资助。

作者简介: 刘艳玲(1976-), 女, 硕士, 现从事水生植物育种研究。

* 通讯作者。

植株的花期一般晚于同一地区的柚树品种^[7,8], 并且与异地柚品种花期更不易相遇, 因此为了满足不同地区不同柚品种人工授粉的需要, 我们对粗柠檬与‘哈姆林’甜橙种间体细胞杂种的花粉进行贮藏并开展了人工授粉试验。

1 材料与方法

异源四倍体粗柠檬(*C. jambhiri* Lush) + ‘哈姆林’甜橙(*C. sinensis* Osbeck) 种间体细胞杂种(简称 HR) 由华中农业大学柑橘研究所通过原生质体融合产生^[9], 栽植土壤后三年半开花, 以下各观察项目均在其枳砧田间高接树上进行。

1.1 花粉特性

花粉生活力的检测参照邓秀新(1992) 描述的方法^[10]: 采用悬滴培养法, 培养基为 0.8% 琼脂+ 16% 蔗糖+ 10 mg/kg 硼酸, 28℃ 暗培养 18 h 后, 统计花粉萌发率和花粉管长度, 以花粉管超过花粉直径为花粉发芽的直观标志; 花粉粒数/花药: 从即将开放的花中采集 40 个花药, 置于小培养皿中加入 4 mL 含吐温-20 的水, 用小玻棒将花药捣碎使花粉充分散出悬浮于水中, 混匀后用血球计数板统计出花粉粒数量/花药。计算公式为: 每花药中含花粉粒数= (0.1 μL 小方格中的花粉粒数 × 10 × 1 000 × 4) / N, (N 为所取的花药数); 花粉形态及大小的观察: 把干燥花粉涂在洁净的载玻片上, 观察其形态, 并用显微测量尺测其纵、横径, 5 次重复, 每次不少于 50 粒。

1.2 花粉贮藏试验

花粉贮藏试验于 1999 年 5 月~2000 年 5 月进行。以 HR 的田间高接树为试材, 于 1999 年 5 月 1 日~5 日采铃铛期花苞剥取花药, 置于 25~28℃ 的电热鼓风干燥箱中 8~12 h, 散粉后进行低温(-20℃) 保存, 并设计 3 种试验处理。①真空保存。将收集的花粉置于干燥器中, 2 周后, 一是将其转至青霉素小瓶中, 用 50 mL 针管抽气 15~20 次后进

行低真空密封保存; 二是将花粉用硫酸纸包好放入带橡皮塞的棕色广口瓶中, 用扩散泵抽真空 20~30 min 后进行高真空密封保存。②干燥保存。将花粉分别置于以 NaNO₂ 和硅胶作干燥剂的棕色广口瓶中密封保存。③真空、干燥保存。将花粉分别置于以 NaNO₂、硅胶、CaCl₂ 作干燥剂的棕色广口瓶中, 用扩散泵抽真空 20~30 min 后密封保存。

1.3 授粉试验

授粉试验在湖北省宜昌市伍家乡旭光村进行(2000 年 5 月 2 日~5 月 4 日), 试材为晚白柚的成年结果树。选树冠大小、生长势相近的单株为小区, 以自花授粉(套袋) 为主对照, 自然结实为辅对照, 在盛花期选择健壮花序上的 2 朵花分别授以 HR 当年花粉和贮藏花粉(贮期 1 年), 8 次重复, 随机排列。同时为促进授粉操作的简单化, 用 HR 新鲜花粉进行了不套袋的去雄、不去雄授粉处理。

1.4 座果率调查

分别在第一次生理落果(谢花后 25 d) 和第二次生理落果(谢花后 50~60 d) 时调查座果率。花序座果率: 花序上只要结果(1 或 2 个), 其花序座果率就为 100%, 反之为 0%; 花朵座果率= (座果数/授粉花朵数) × 100%。

2 结果与分析

2.1 HR 的花粉特性

2.1.1 HR 花粉离体萌发的培养基 HR 花粉离体萌发的适宜条件见表 1。培养基中硼酸的含量不仅影响 HR 花粉的离体萌发率, 而且影响花粉管的长度。在含琼脂 0.8% 和蔗糖 16% 的培养基中, 添加不同浓度的硼酸后, 随着浓度的加大, 花粉萌发率逐渐变小, 花粉管也逐渐变短、变粗。虽然 15 mg/kg 和 10 mg/kg 的硼酸对花粉萌发率影响不大, 但从花粉管的长度来看, 以 10 mg/kg 硼酸浓度更适于 HR 花粉的离体萌发。

表 1 硼酸对 HR 花粉离体萌发率和花粉管长度的影响
Table 1 The effect of boric acid on pollen germinability and the length of HR pollen tube

硼酸	Boric acid concentration(mg/kg)	100	50	25	15	10
萌发率	Germinability (%)	7.80	10.00	11.89	14.71	16.03
花粉管长度	Pollen tube length(μm)	184.03	204.95	311.72	393.14	538.11

2.1.2 HR 花粉活力 对种间体细胞杂种 HR 的花粉进行了花粉量、生活力测定, 结果表明: HR 每花药含花粉 19 229.40 粒、染色活力为 77.41%、萌发率为 15.31%, 3 个指标都介于两亲本之间, 说明

HR 的活力相对于高值亲本‘哈姆林’甜橙(每花药含花粉 24 117.00 粒, 染色活力为 84.20%, 萌发率为 31.00%) 有所降低, 相对于低值亲本粗柠檬(每花药含花粉 17 228.00 粒, 染色活力为 67.20%, 萌

发率为 13.90%)有所提高,这为其作为亲本与单胚性柚类等杂交奠定了基础。但 HR 小花粉的比例(25.67%)远远高于两亲本(“哈姆林”甜橙为 0.70%,粗柠檬为 3.80%)。

同时对 HR 的花粉进行了观察,根据其大小、形态可划分为 3 类(见表 2),即长椭圆形大花粉、近圆形中等花粉和不规则形小花粉。

表 2 HR 花粉形态及大小的观察
Table 2 HR pollen morphology and size

类型 Type	形状 Morphology	大小(横径×纵径) (μm) Diameter (cross diameter× longitudinal diameter)
大花粉 Big pollen	长椭圆形 Long-ellipse	27.502×39.419
中等花粉 Middle pollen	近圆形 Nearly-circle	25.930×26.240
小花粉 Small pollen	不规则 Abnormal	13.096×15.715

HR 每朵花的花药数一般为 25~30 个,每花药的花粉量约 18 000~19 000 粒,因此每朵花约含花粉 $4.63\times10^5\sim5.55\times10^5$ 粒。HR 花粉的离体萌发率为 15.31%,故每朵花约含 70 885.3~84 970.5

粒有萌发力的花粉,基本可以满足授粉要求。

2.2 贮藏方法与花粉生活力

不同贮藏条件下 HR 花粉的离体萌发率见表 3。从表 3 中可以看出:①以 NaNO_2 作干燥剂不适于 HR 花粉保存。干燥保存中, NaNO_2 控湿的花粉生活力与硅胶控湿的花粉生活力差异显著。以硅胶控湿的花粉生活力随着贮藏时间的延长缓慢下降,而 NaNO_2 控湿的花粉生活力迅速下降,贮藏 6 个月后萌发率只有 1.48%,基本丧失了生活力;真空、干燥保存中, NaNO_2 控湿的花粉生活力与硅胶、 CaCl_2 控湿的差异显著。硅胶、 CaCl_2 控湿的花粉生活力下降缓慢,两者无差异。而 NaNO_2 控湿的花粉贮藏 1 年后萌发率只有 4.16%,明显低于其它干燥剂保存的效果。②真空能延缓花粉生活力的下降,有利于花粉保存。真空和非真空保存中, NaNO_2 控湿的花粉生活力差异显著。贮藏 6 个月后,非真空保存的花粉萌发率只有 1.48%,而真空保存的花粉生活力为 7.29%。③真空保存中,高真空保存与低真空保存的花粉生活力差异不显著,但从花粉生活力下降的趋势看,高真空保存的花粉生活力下降较缓慢,这说明在同一湿度条件下,高真空有利于花粉贮藏。

表 3 不同贮藏条件下 HR 花粉的离体萌发率比较
Table 3 Comparision of HR pollen germinability in different storage conditions

贮藏时间(月) Storage time (month)	干燥 Desiccant		真空+ 干燥 Vocauum+ desiccant			真空 Vocauum	
	NaNO_2 Nitrite sodium	硅胶 Silica gel	NaNO_2 Nitrite sodium	硅胶 Silica gel	CaCl_2 Calcium chloride	高真空 High vocauum	低真空 Low vocauum
2	10.25	14.61	11.61	14.88	15.03	15.07	15.71
4	6.77	13.52	10.21	13.80	14.53	13.86	14.33
6	1.48	12.96	7.29	13.24	14.41	12.55	13.80
8	1.50	11.96	7.02	12.05	13.80	11.22	12.05
10	1.05	10.03	5.47	11.88	12.06	10.92	11.44
12	1.01	8.62	4.16	11.15	11.94	9.61	10.03
方差分析后进一步 测验的结果 ($\alpha=0.05$) Variance analysis results	c	a	b	a	a	a	a

注:方差分析的数据为贮藏第 12 个月时的花粉萌发率;方差分析的显著水平 $\alpha=0.05$;表中所列数据均为百分数;差异显著水平用 a,b,c 来表示。
Notes: The data of variance analysis is the germinability of HR pollen stored twelve months; The significant level of variance analysis is $\alpha=0.05$; The data of table 1 is in terms of percentage; a, b and c stand for the extent of difference.

从表 3 中还可以看出:无论哪种处理,随着贮藏时间的延长,花粉生活力都逐渐下降,只是方法不同,花粉生活力下降的速度不同而已。

2.3 授粉座果率

从表 4 中可以看出:①HR 贮藏花粉的平均座果率为 45.75%,与新鲜花粉的座果率 49.50% 差异

不显著。经授粉前花粉生活力测定,新鲜花粉的生活力达 14.59%,而贮藏花粉的生活力只有 8%~10%,但两者的座果率却无差异,这说明 HR 花粉贮藏 1 年后生活力虽有所下降,但足以引起晚白柚的授粉受精;②晚白柚自花授粉的座果率为 3.86%,自然结实率为 1.67%,两者都很低且差异不显著。

这说明晚白柚有一定的自花结实能力,但不能满足生产需要,需异花授粉;③以 HR 为父本与晚白柚杂交的座果率远远高于其自花授粉及自然结实的座果率,两者差异显著,这说明 HR 异花授粉可显著提高

座果率。④从 HR 新鲜花粉不套袋的去雄、不去雄的授粉结果来看,其平均座果率高达 48.50%,与新鲜花粉(套袋)的座果率(49.50%)差异不显著,说明 HR 授粉操作可简单、方便化。

表 4 HR 不同处理花粉的座果率比较
Table 4 Comparison of the fruit set with different stored pollen of HR

座果率(%) Fruit set (%)	HR 新 鲜花粉 HR fresh pollen	贮藏花粉(1 年) Stored pollen (for one year)				自花授 粉,套袋 Self- pollination, package	天然结实 Natural fruit set	不去雄, 不套袋 Non- package with stamen	去雄, 不套袋 Non- package without stamen
		CaCl ₂ , 真空 Calcium chloride, vacuum	硅胶, 真空 Silica gel, vacuum	硅胶 Silica gel	低真空 Low vacuum				
花序座果率-1 Fruit set of flower head-1	78.50	92.00	82.00	86.00	74.67	31.99	26.67	95.00	95.80
花序座果率-2 Fruit set of flower head-2	70.00	74.00	66.00	70.00	52.00	6.260	3.34	74.00	78.00
花朵座果率-2 Fruit set of flower -2	49.50	53.00	45.00	49.00	36.00	3.86	1.67	46.00	51.00
方差分析后 进一步测验的结果 Variance analysis results (α= 0.05)	a	a	a	a	a	b	b	a	a

注: 方差分析的结果包括花序座果率-1、-2 和花朵座果率-2; 方差分析的显著性水平 $\alpha=0.05$; 差异显著水平用 a, b, c 来表示; “-1”表示第一次生理落果后调查的座果率; “-2”表示第二次生理落果后调查的座果率。
Notes: The fruit set percentage of flower head-1, -2 and flower-2 are included in the variance analysis results; The significant level of variance analysis is $\alpha=0.05$; a, b and c stand for the extent of difference; “-1” stand for the fruit set percentage detected after the first physiological drop; “-2” stand for the fruit set percentage detected after the second physiological drop.

3 讨论

原生质体融合虽可克服柑桔杂交育种中遇到的珠心胚干扰、雌/雄败育及有性杂交不亲和等困难,但由于其结果较晚,皮厚、硬,汁少、酸味重,口感不良,因而果实的商品价值不高,目前难以作为栽培品种直接利用^[11]。通过对柑桔种间体细胞杂种 HR 的花粉量、花粉生活力进行检测,表明其花粉活力介于两亲本(粗柠檬与哈姆林甜橙)之间,可作为杂交亲本被利用,这与前人^[8, 12, 13]的报道是一致的。
HR 的花粉大小、形态各异,且小花粉出现的比率远远高于两亲本,这可能与亲缘关系远近有关,因为种间体细胞杂种来自双亲的染色体不能正常配对,最后出现许多落后染色体、单体及多分孢子等,都会导致小花粉的形成^[14-17]。因此进一步研究柑桔异源四倍体体细胞杂种的减数分裂行为,提高其花粉活力,可为其在柑桔育种上更广泛应用奠定基础。
然而由于倍性的增加,HR 的花期稍晚于同一地区柚树的花期,即无法作为授粉品种在同一地区直接加以利用,因此需对其花粉进行贮藏,才能满足

不同地区不同柚品种授粉的需要。通过对 HR 花粉的贮藏,本试验探索出了贮藏的较适条件:低温(-20℃)、低湿(硅胶或 CaCl₂ 控湿)、真空。其中低温、低湿(<50%)是贮藏 HR 花粉的关键,真空虽然能够延缓生活力的下降,但它不是 HR 花粉贮藏的必要条件。

参考文献:

[1] Grosser J W, Gmitter F G, Louzada E S, et al. Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless citrus development [J]. HortScience, 1992, 27: 1125-1127.
[2] Grosser J W. Citrus scion and rootstock improvement via somatic hybridization[J]. Acta Hort, 1993, 336: 297-305.
[3] Deng X X, Zhang W C. Protoplast fusion and utilization of citrus somatic hybrids[A]. Proc 2nd Asia-Pacific Conference on Plant Cell and Tissue Culture [C]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1996. 104-110.
[4] Guo W W, Deng X X, Yi H L. Somatic hybrids between navel orange (Citrus sinensis) and grapefruit (C. Paradisi) for seedless triploid breeding [J]. Eu-

phytica, 2000, **116**: 281—285.

[5] 邓秀新, 郭文武. 以异源四倍体体细胞杂种为父本杂交培育三倍体柑桔植株的研究[J]. 植物学报, 1996, **38**(8): 631—636.

[6] 伊华林, 邓秀新. 培养三倍体柑桔植株的研究[J]. 果树科学, 1998, **15**(3): 212—216.

[7] Deng X X, Sun Z H, Gan L, *et al.* The agronomic performance of three newly created hybrids of citrus. Genetic improvement of horticultural crops by biotechnology[J]. *Acta Horti*, 1995, **392**: 69—75.

[8] Kobayashi S, Ohgawara T, Saito W, *et al.* Fruit characteristics and pollen fertility of citrus somatic hybrids[J]. *J Jap an Soc Hort Sci*, 1995, **64**(2): 283—289.

[9] Deng X X, Grosser J W, Gmitter F G. Interspecific somatic hybrid of rough lemon and ‘Hamlin’ sweet orange via protoplast fusion[J]. *Acta Gene Sinica*, 1992, **19**(2): 140—144.

[10] 邓秀新. 黑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.

[11] Deng X X, Sun Z H, Gan L, *et al.* The Agronomic performance of three newly created somatic hybrids of citrus[J]. *Acta Horti*, 1995, **392**: 69—75.

[12] 邓秀新, Gmitter F G, Grosser J W. 柑桔同源及异源四倍体花粉育性研究[J]. 园艺学报, 1995, **22**(1): 16—20.

[13] Mourao F F, Gmitter F G, Grosser J W. New tetraploid breeding parents for triploid seedless citrus cultivar development[J]. *Fruit Varieties*, 1996, **50**: (2), 76—80.

[14] 邓秀新, Gmitter F G, Grosser J W, *et al.* 柑桔体细胞杂种的花粉育性及其遗传稳定性[J]. 果树科学, 1996, **13**(3): 141—144.

[15] 孟金陵, 刘定富, 罗鹏, 等. 植物生殖遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 133.

[16] 高连明, 张长芹, 李德铎, 等. 杜鹃属马银花亚属花粉形态的研究[J]. 武汉植物学研究, 2002, **20**(3): 177—181.

[17] 晃志, 周秀佳. 9 种益母草属植物的花粉粒形态[J]. 武汉植物学研究, 2000, **18**(3): 181—183.