

## 融安金柑雌雄配子发育相关性 及 2n 配子诱导研究

黄桂香, 刘福平, 刘丽君, 潘介春, 周琼, 周瑞阳\*, 何新华

(广西大学农学院, 南宁 530004)

**摘要:**以融安金柑为试验材料,观察了 2n 花粉自然发生率、雌雄配子发育过程及减数分裂行为,以不同秋水仙素浓度及处理时间对花蕾进行 2n 配子诱变。结果显示:(1)融安金柑 2n 花粉自然发生率为 0.31%;(2)花蕾纵径为 0.228~0.270 cm 时,为花粉母细胞减数分裂 I 前期;花蕾纵径为 0.274~0.318 cm 时,大孢子处于减数分裂 I 前期,而此时花粉母细胞处于减数分裂中后期至四分体期,融安金柑雌雄配子发育不同步;(3)0.25%秋水仙素处理 2 d 时 2n 雌配子的诱导率为 9.09%,杂种染色体有加倍现象;(4)0.3%秋水仙素处理 4 d,2n 花粉发生率为 0.67%,2n 花粉萌发较 n 花粉迟 3 h。

**关键词:**融安金柑;花粉母细胞;雌配子体;减数分裂;2n 配子

**中图分类号:**S603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3142(2011)04-0536-05

## Study on the development correlation between male and female gametes and the induction of 2n gamete of Rongan kumquat (*F. crassifolia*)

HUANG Gui-Xiang, LIU Fu-Ping, LIU Li-Jun, PAN Jie-Chun, ZHOU Qiong, ZHOU Rui-Yang\*, HE Xin-Hua

(College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract:** With Rongan kumquat (*F. crassifolia*) as the experiment material, the process of meiosis and the development of microsporocyte, female gametophyte and the natural incidence of 2n pollen were observed and buds were induced mutation with colchicine of different concentrations and times. The main results showed that: (1) The proportion of 2n pollen of Kumquat was 0.31% under natural state. (2) When the longitudinal diameter of the bud was 0.228-0.270 cm, the microsporocyte was pre-meiosis I; When the longitudinal diameter of the bud was 0.274-0.318 cm, the megaspore mother cell was in the early stage of meiosis, and the microsporocyte was in the stage from meiotic metaphase to tetrad, male and female gametes did not develop synchronously. (3) The induction rate of 2n female gametes was 9.09% when treated with colchicine of 0.25% for 2 days. (4) 0.67% of 2n pollen was observed when treated with colchicine of 0.30% 4 days after treated. It was found that 2n pollen germinated 3 hours later than n pollen and 2n pollen tube growth rate was also lower.

**Key words:** Rongan kumquat (*F. crassifolia*); microsporocyte; female gametophyte; meiosis; 2n gamete

收稿日期: 2010-12-23 修回日期: 2011-03-12

基金项目: 科技部国际合作项目(2008DFA30900); 广西自然科学基金(桂科自 0991040); 广西研究生创新项目(2008105930901D21)[Supported by International Cooperation Projects, Ministry of Science and Technology (2008DFA30900); the Natural Science Foundation of Guangxi (0991040); Project of Innovation in Postgraduate of Guangxi (2008105930901D21)]

作者简介: 黄桂香(1966-),女(壮族),广西德保人,博士研究生,副教授,主要从事果树种质资源与遗传育种研究,(E-mail) hguixiang@163.com.

通讯作者: 周瑞阳,博士,教授,博士生导师,(E-mail) ry\_zhou@tom.com.

金柑属(*Fortunella*)植物共有 4 个种和 2 个杂种(陈杰忠等,2003),其中,金弹(*F. crassifolia*)是主要的鲜食栽培种,融安金柑(又称融安金桔,融安金弹)为金弹优良品种之一。金柑一年能多次开花结果,果实形美色艳,有吉祥喜庆之寓意,且营养价值极高,是鲜食、加工及观赏的多用果树。然而目前生产上栽培的金柑优良品种极少,严重限制了产业的可持续发展(黄桂香等,2006)。

倍性育种是果树重要育种方法之一,多倍体果树具有果大、无籽、抗性强等优点。2n 配子(未减数配子)对倍性育种具有重要意义(李树贤,2008)。植物的 2n 配子参与受精的结果是有性多倍化,是自然界多倍体产生的主要途径,利用 2n 配子创造园艺作物多倍体新种质引起育种家的高度重视(张新忠等,2003)。2n 配子在马铃薯、毛白杨、桑树、柿树、大白菜上已有研究,果树中的甜柿(谷晓峰等,2003)、草莓(时翠平等,2002)、柑橘属(向素琼等,2005)等也有关于 2n 配子研究的报道。过去认为体细胞加倍是多倍化的主要方式,同源多倍体来自二倍体体细胞的直接加倍;异源多倍体则来自远缘杂交后体细胞加倍。而现在认识到自然界中成功的多倍体一部分是由于细胞学上 2n 配子作用产生而得到。金柑属各种间的自然变异类型少,种质资源创新利用的研究不多,2n 配子诱导、倍性育种等相关研究均未见报道,由于金柑果实小,主栽品种种子较多,直接影响鲜食及加工品质,通过 2n 配子的应用等途径培育金柑多倍体无核大果品种显得极为重要。为了解金柑 2n 配子发生规律和找出诱导 2n 配子的最佳时期及适宜方法,本研究观察了融安金柑雌雄配子发育过程、减数分裂行为、2n 花粉自然发生率,并以不同秋水仙素浓度及处理时间对融安金柑花蕾进行诱变处理,为提高金柑 2n 配子的诱变率及倍性育种和种质创新提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试验时间

本试验于 2008~2010 年进行,试验材料来自广西大学农学院实验基地 5 年生融安金柑。

### 1.2 试验方法

1.2.1 花粉母细胞减数分裂观察 采用压片法,取适当大小的花蕾,剥去花瓣,用卡诺液(95%乙醇:冰醋酸=3:1)固定 24 h,然后转入 70%酒精溶液

中冷藏,观察时,取出花药用镊子除去花药壁,滴一滴卡宝品红染液,盖好盖玻片,用铅笔头轻敲几下,在酒精灯上微预热后压片,镜检并拍照。

1.2.2 2n 花粉自然发生率的观察 采集融安金柑成熟花粉,用显微镜观察花粉粒,每个品种观察约 1 万粒。将花粉分为 3 大类:第一类为正常花粉粒,即 n 花粉;第二类为 2n 花粉粒,其直径约是 n 花粉的 1.3 倍;第三类为败育花粉,其直径比 n 花粉直径小 1/3 或更小。统计各类花粉的比例。

1.2.3 融安金柑 2n 花粉诱导 分别用 0.15%、0.30%、0.45%、0.60%秋水仙素,加适量洗衣粉及甘油。用滴液法处理减数分裂前期的金柑花蕾,处理时间分别为 2、4、6 d。以清水为对照,每个组合处理 60 个花蕾,处理后套袋保湿。处理结束后拆除脱脂棉,用清水冲洗残留在花蕾上的秋水仙素药液。待花粉成熟时及时采样回室内观察,每个处理组合观察花粉粒 10 000 粒以上,用显微镜观察并测量花粉粒直径,统计正常花粉、2n 花粉和败育花粉所占比例,比较各组合的处理效果。同时将 2n 花粉比例较高的花粉与未处理的花朵杂交,授粉后及时套袋,观察记录。

1.2.4 融安金柑 2n 雌配子诱导 分别用 0.05%、0.10%、0.25%、0.40%、0.60%的秋水仙素,加适量洗衣粉及甘油。用滴液法处理减数分裂前期的金柑花蕾,处理时间分别为 1、2、3 d。以清水为对照,每一组合处理 60 个花蕾,滴药后套袋保湿。以清水处理为对照。

1.2.5 授粉及杂种染色体观察 分别用诱导后的混合花粉与未处理的花朵、未处理花粉与处理后的花朵进行授粉,套袋隔离。采收所结果实,将各处理最后采得的果实进行取种催芽,用酸解法逐粒观察其染色体数目。

## 2 结果与分析

### 2.1 融安金柑雌雄配子发育与花蕾纵径的相关性

对不同发育时期的融安金柑花药及胚囊进行压片及石蜡切片,观察结果显示:当花蕾纵径分别为 0.168~0.224、0.198~0.260、0.274~0.318 cm 和 0.368~0.404 cm 时,雌配子发育分别处于胚珠原基基本形成、孢原细胞核形成、大孢子减数分裂 I 前期和大孢子四分体时期。当花蕾纵径分别为 0.134~0.184、0.228~0.270、0.286~0.350 cm 和 0.552

~0.628 cm 时,雄配子发育分别处于孢原细胞分化、花粉母细胞减数分裂 I 前期、四分体和花粉粒成熟期。融安金柑花蕾纵径与雌雄配子主要发育时期的相关性详见表 1。

表 1 融安金柑花蕾纵径与雌雄配子发育的关系

Table 1 The relationship between bud length and development of female gametes of kumquat

花蕾纵径(cm) Bud length	雌配子发育时期及主要特征 Main characteristics of female gametes developing stage	雄配子发育时期 Developing stage of male gametes
0.170~0.234	胚珠开始产生并突起,内外珠被已形成,胚珠原基基本形成	花粉母细胞时期
0.228~0.270	胚珠原基前端发育胚珠心,基部分化成珠柄,孢原细胞核形成,并开始发育为胚囊母细胞	花粉母细胞减数分裂 I 前期
0.264~0.312	胚珠完全横向生长,并进入减数分裂时期,为大孢子减数分裂 I 前期	减数分裂 I 中后期
0.306~0.352	内珠被依然短于外珠被,为大孢子减数分裂 I 中后期	四分体时期
0.368~0.404	外珠被较快速生长长度赶上内珠被,四核胚囊时期	单核靠边期
0.552~0.608		花粉粒成熟
0.594~0.664	成熟胚囊形成	

注:观察花蕾总数为 120。

Note: The total number of buds in observation is 120.

表 2 自然状态下融安金柑 2n 花粉比率

Table 2 The percentage of 2n pollen in Rongan kumquat under natural condition

种类 Species	观察花粉数 No. of pollens observed	正常花粉大小( $\mu\text{m}$ ) Average pollen size	正常大小花粉率(%) Rate of normal pollen	2n 花粉率(%) Rate of 2n pollen	败育花粉率(%) Rates of abortive pollen
融安金柑	12 853	35	94.41	0.31	5.28

由表 1 可看出,当花蕾纵径 0.170~0.234 cm 时,为花粉母细胞时期,而此时胚囊母细胞尚未形成;花蕾纵径 0.228~0.270 cm 时,为花粉母细胞减数分裂 I 前期,雌配子仍处于胚囊母细胞时期;花蕾纵径 0.264~0.312 cm 时,为大孢子减数分裂 I 前期,而此时花粉母细胞处于减数分裂中后期至四分体形成期;当花蕾纵径 0.368~0.404 时,为雄配子单核靠边期,而大孢子处于四分体时期。可见,花粉母细胞减数分裂前期早于胚囊母细胞减数分裂前期,花粉粒最早成熟期早于胚囊成熟期,雌雄配子发育不同步。

## 2.2 2n 花粉自然发生率

由表 2 知,融安金柑正常花粉直径平均为 35  $\mu\text{m}$ , 2n 花粉发生率平均为 0.31%。有未减数分裂的花粉存在,但其发生率很低。

## 2.3 秋水仙素诱导融安金柑 2n 花粉效果

不同浓度秋水仙素浓度处理金柑花蕾,结果显示:除 0.60% 处理 6 d 的组合没有产生 2n 花粉外,其它的处理组合都产生一定量的 2n 花粉。但所有处理组合的花粉败育率都比自然状态的高,其中 0.3% 秋水仙素处理 4 d 和 0.45% 秋水仙素处理 4 d 时,2n 花粉发生率分别达 0.67% 和 0.61%,比自然状态下金柑 2n 花粉比率有所提高,是获得 2n 花粉较好的处理组合(表 3)。

表 3 不同浓度、不同天数的秋水仙素处理

诱导融安金柑发生 2n 花粉的效果

Table 3 The 2n pollen rates of Rongan kumquat treated with different concentrations and days of colchicine

秋水仙素 浓度(%) Concentration	天数 Day (d)	观察花粉 数(粒) No. of pollens observed	2n 花粉 发生率(%) 2n rate of pollen	败育花粉率 Rate of abortive pollen(%)
0	0	12853	0.31	5.28
	2	11543	0.26	5.30
0.15	4	12356	0.19	5.43
	6	12870	0.35	6.05
0.30	2	11988	0.41	6.12
	4	12067	0.67	7.08
0.45	6	12832	0.54	8.11
	2	12587	0.52	6.79
0.60	4	11954	0.61	7.27
	6	12311	0.49	8.32
0.60	2	12126	0.42	6.35
	4	11879	0.23	8.56
	6	12083	0	13.96

## 2.4 融安金柑不同倍性花粉萌发动态比较

将含有 2n 花粉的混合花粉进行发芽试验,结果如图 1 所示:在相同培养条件下培养 3 h, n 花粉萌发率已经达 6.20%,而 2n 花粉未见萌发,说明 n 花粉比 2n 花粉萌发早。培养 6 h 时, n 花粉萌发率为 64.32%, 2n 花粉萌发率为 31.57%。培养 9 h 时, n 花粉萌发率为 81.78%, 2n 花粉萌发率为

72.45%。培养时间 12 h 时, n 花粉萌发率为 90.13%, 2n 花粉萌发率为 76.21%。随着培养时间的延长, n 花粉和 2n 花粉萌发率不再增加。

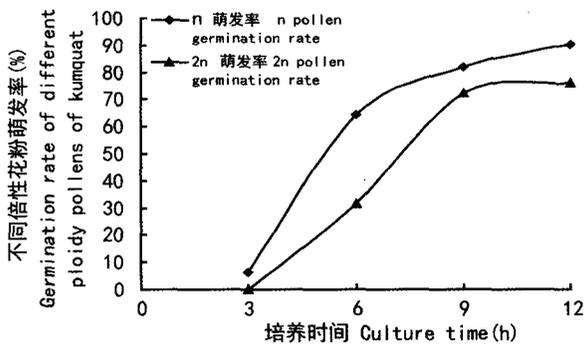


图 1 融安金柑不同倍性花粉的萌发率

Fig. 1 Germination rate of different ploidy pollens of Rong'an kumquat

## 2.5 秋水仙素诱导融安金柑 2n 雌配子效果

不同浓度秋水仙素处理减数分裂前花蕾, 出现花蕾脱落现象, 坐果数也随着处理浓度的增加而减少, 当浓度为 0.60% 处理 1 d 时, 枝条死亡率为 15%, 处理时间为 2 d 时, 死亡率上升到 25%, 处理时间为 3 d 时, 枝条死亡率高达 100%。

分别用诱导后的混合花粉与未处理的花朵、未处理花粉与处理后的花朵进行授粉, 套袋隔离。采收所结果实, 将各处理最后采得的果实进行取种催芽, 用酸解法逐粒观察其染色体数目。其中以未处理的融安金柑二倍体为母本, 用 2n 花粉比例较高组合的混合花粉授粉, 共授粉 60 朵花, 坐果率为 46.7%, 共收获果实 28 个, 种子 84 粒, 将种子催芽进行根尖染色体观察, 未发现多倍体植株。

用 n 花粉与各浓度秋水仙素诱导 2n 雌配子的

表 4 秋水仙素不同浓度处理对杂种后代染色体的影响

Table 4 The influence of different concentrations of colchicines on the chromosome of hybrid

杂交组合 Cross combination	处理天数 Treat day (d)	浓度 Concentration (%)	收获果数 No. of fruit harvested	种子总数 No. of seeds	染色体加倍果数 No. of fruits with doubled chromosome	染色体加倍种子数 No. of seeds with doubled chromosome	诱变率 Mutation rate (%)
n × n	0	0	32	123	0	0	0
		0.05	18	56	0	0	0
		0.1	23	73	0	0	0
诱变♀ × n	1	0.25	16	70	0	0	0
		0.4	11	51	0	0	0
		0.6	0	0	0	0	0
		0.05	20	66	0	0	0
		0.1	18	71	0	0	0
诱变♀ × n	2	0.25	11	34	1	1	9.09
		0.4	7	23	0	0	0
		0.6	0	0	0	0	0
n × 诱变♂	4	0.3	15	45	0	0	0
n × 诱变♂	4	0.45	13	39	0	0	0

花朵杂交, 将收获的果实取种催芽, 观察染色体数目。结果显示: 在浓度为 0.25%, 处理时间为 2 d 的处理组合中, 收获 17 个果, 其中有 1 个果实的 1 粒种子催芽后, 根尖染色体有加倍, 染色体数目为 27, 诱变率为 9.09%。其余各处理果实种子催芽后, 均未发现有加倍现象。各杂交组合后代染色体观察结果见表 4。

## 3 讨论

本研究结果表明, 融安金柑 2n 花粉自然发生率, 平均仅为 0.31%。其它果树的 2n 花粉自然发

生率因不同的树种有较大差异, 其中近缘的柑橘属部分品种的 2n 花粉发生率为 0.05%~2.95% (向素琼等, 2005)。这也许是目前金柑属资源多数停留在种的层面上, 栽培品种自然变异类型少, 遗传多样性少的原因之一。

2n 配子的产生被认为主要通过减数分裂前的加倍、核重组(第一次分裂重组和第二次分裂重组)、缺减数分裂的第一次或第二次分裂、细胞质早分裂、缺第二次细胞质分裂和减数分裂后的融合等途径实现 (Veilleux, 1985), 因此要有效地诱导和提高融安金柑 2n 配子的比例, 必须了解其雌雄配子发育及减数分裂过程, 本研究观察结果表明: 花蕾纵径为

0.228~0.270 cm 时,为花粉母细胞减数分裂 I 前期,是诱导 2n 花粉的最佳时期;花蕾纵径为 0.274~0.318 cm 时,大孢子处于减数分裂 I 前期,此时是诱导 2n 雌配子的最佳时期,而此时花粉母细胞处于减数分裂中后期至四分体期。融安金柑雌雄配子发育不同步,花粉母细胞减数分裂期早于胚囊母细胞减数分裂期,花粉最早成熟期早于胚囊成熟期。

热激、低温、戊炔草胺、安磺灵、氯仿和秋水仙素等均可诱导 2n 配子发生。果树上常用秋水仙素诱导且效果较好 (Veilleux, 1985; 从佩华等, 1998; 张新忠等, 2003; 时翠平等, 2002; 向素琼等, 2005; 李树贤, 2008)。本研究以 0.25% 秋水仙素处理 2 d 时,杂种染色体有加倍现象,染色体数为 27, 2n 雌配子的诱导率为 9.09%; 0.3% 秋水仙素处理 4 d, 2n 花粉发生率为 0.67%, 但 2n 花粉杂交后代没有多倍体出现,其原因可能是 2n 花粉萌发较 n 花粉迟 3 h, 2n 花粉管生长速度较慢,自然条件下, 2n 花粉竞争不过 n 花粉,因此阻碍了多倍体后代获得。

秋水仙素诱导融安金柑 2n 雌配子获得三倍体后代,但 2n 花粉发生率仍很低,且杂交后代难获多倍体,其原因可能与品种的特性及诱导方法等内外因素有关,具体原因及改进方法正在进一步探索研究中。

### 参考文献:

- 李树贤. 2008. 植物染色体与遗传育种[M]. 北京: 科学出版社: 95-105
- 陈杰忠. 2003. 果树栽培学各论(南方本)[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社: 4
- 黄桂香, 何静. 2006. 金柑优质高效栽培[M]. 北京: 金盾出版社: 1-13
- Cong PH(从佩华), Wu LP(吴禄平), Jing SX(景士西). 1998. The occurrence of 2n gametes and their uses in fruit breeding(2n 配子发生及在果树育种中的应用)[J]. *J Fruit Sci*(果树科学), 15(4): 347-353
- Gu XF(谷晓峰), Luo ZR(罗正荣). 2003. Studies on abnormal meiosis producing 2n pollens in Nonstringent Persimmon (*Diospyros kaki*)('禅寺丸'甜柿 2n 花粉形成机制的研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 30(2): 135-140
- Huang GX(黄桂香), Liu LJ(刘丽君), Liu FP(刘福平), et al. 2009. Observation of pollen development characteristics and flowering and bearing habits of rongan kumquat(融安滑皮金柑花粉发育特性及开花结果习性观察)[J]. *Guangxi Trop Agric*(广西热带农业), (3): 15-18
- Jiang SY(蒋水元), Jiang XJ(蒋向军), Qin JS(覃吉胜), et al. 2009. Preliminary study on selection of seedless *Siraitia grosvenorii*(无籽罗汉果选育的初步研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 29(4): 506-509
- Shi CP(时翠平), Ge HB(葛会波), Zhang CH(张成和), et al. 2002. Cytological studies on unreduced gamete formation of strawberries (*Fragaria*)(草莓未减数分裂配子形成的细胞学研究)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), 35(10): 1260-1263
- Su XQ(向素琼), Gong GZ(龚桂枝), Guo QG(郭启高), et al. 2005. Spontaneous generation of 2n pollen in citrus and induction of 2n pollen in *Citrus grandis*(柑桔属 2n 花粉自然发生与沙田柚 2n 花粉诱导研究)[J]. *J Southwest Agric Univ, Nat Sci Edi*(西南农业大学学报·自然科学版)[J]. 27(5): 616-620
- Veilleux R. 1985. Diploid and poly ploid gametes in crop plants: Mechanisms of formation and utilization in plant breeding[J]. *Plant Breeding Review*, 3: 253-288
- Yang XL(杨晓伶), Cheng Z(程舟), Li S(李珊), et al. 2006. Self-hybridized triploids derived from 2n gametes induced by colchicine in pummelo(秋水仙素诱导文旦柚 2n 配子获得自交三倍体)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 33(5): 1045-1047
- Zhang XZ(张新忠), Yan LY(闫立英), Liu GJ(刘国俭), et al. 2003. Utilization of 2n gametes in plant breeding and germplasm enhancement(2n 配子在植物育种和种质创新中利用的研究进展)[J]. *Acta Agric Bor-Sin*(华北农学报), (S1): 30-35