

无籽八月桔胚囊及胚胎发育细胞学观察

范学翠, 秦永华, 叶自行, 吴筱颖, 胡桂兵*

(华南农业大学园艺学院, 广州 510642)

摘要: 运用酶解振荡压片技术和常规石蜡切片技术分别研究了无籽八月桔的胚囊育性及无籽八月桔自交和异交(无籽八月桔×台湾椪柑, 无籽八月桔×有籽八月桔)的胚胎发育。结果表明: 无籽八月桔胚囊可育, 成熟胚囊具一个卵细胞、两个助细胞、三个反足细胞以及一个大的含二个极核的中央细胞; 其自交和异交的胚胎发育均正常, 授粉后2周出现球形胚和少量心形胚, 授粉后3周出现心形胚和鱼雷形胚, 授粉后4周全部为鱼雷形胚, 授粉后5周发育成子叶胚, 授粉后7周子叶胚继续发育形成种子痕迹, 仍具珠柄。可以得出, 无籽八月桔胚囊育性正常, 且不具胚胎中途败育现象, 胚胎败育不是无籽八月桔无籽的原因。

关键词: 无籽八月桔; 无籽机理; 胚囊; 胚胎发育

中图分类号: S666.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)02-0255-07

Cytological observation of embryo sac and embryonic development in the new mandarin cultivar 'Wuzibayueju' (*Citrus reticulata* Blanco)

FAN Xue-Cui, QIN Yong-Hua, YE Zi-Xing,
WU Xiao-Ying, HU Gui-Bing*

(Faculty of Pomology, College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Enzymolysis oscillation squash method and routine paraffin section were used to study embryo sac fertility of 'Wuzibayueju' and the embryonic development of three pollinated combinations ('Wuzibayueju' × 'Wuzibayueju', 'Wuzibayueju' × 'Ponkan', 'Wuzibayueju' × 'Bayueju'). The results were as follows: (1) The embryo sac fertility of 'Wuzibayueju' was normal. Mature embryo sac had one egg, two synergids, three antipodal cells and a big central cell containing two polar nuclei. (2) The embryonic development of self-pollinated 'Wuzibayueju' and cross-pollinated 'Wuzibayueju' × 'Ponkan', 'Wuzibayueju' × 'Bayueju' were normal. Two weeks after self-pollination, the zygotic embryo became globular-shaped and a few heart-shaped. Three weeks later, heart-shaped embryos and torpedo-shaped embryos were observed. Four weeks later, embryo reached at the torpedo stage. Five weeks later, cotyledonary embryos were observed. And seven weeks later, cotyledonary embryos were developing into seeds while funiculi were still existent. Those results indicated that embryo sac fertility of 'Wuzibayueju' was normal and there was no embryo abortion during embryonic development. Therefore, the embryo abortion was not the seedless reason of the new cultivar 'Wuzibayueju'.

Key words: 'Wuzibayueju'; seedless mechanism; embryo sac; embryonic development

收稿日期: 2010-07-30 修回日期: 2010-11-22

基金项目: 广东省科技计划项目(2006B20201036)[Supported by Science and Technology Planning Project of Guangdong Province of China (2006B20201036)]

作者简介: 范学翠(1984-), 女, 山东枣庄人, 硕士, 主要从事果树种质资源改良及遗传育种研究, (E-mail) fanxuecui@163.com.

* 通讯作者: 胡桂兵, 教授, 博士生导师, (E-mail) guibing@scau.edu.cn.

八月桔(*Citrus reticulata* 'Bayueju')是我国特有的宽皮桔品种之一,该品种10月下旬开始成熟,果肉清甜,结实早,丰产性好,因品质优良而深受广大消费者的喜爱,但原有的八月桔由于种子太多(平均单果种子数在16.6粒左右),从而限制其进一步发展(邓秀新等,2008)。课题组通过芽变选种途径在粤西山区选育出一株无籽芽变植株,连续观察两年发现其单果平均种子数均为1.9粒,符合柑桔无籽的标准。芽变是遗传物质的改变,包括染色体数目变异、染色体结构变异、基因突变及核外突变,且基因突变产生的芽变多数是由一个基因的突变形成的(沈德绪,1995),因此,研究由芽变产生的无籽八月桔的无籽机理,在理论及实践上都具有特别重要的意义。

柑桔无籽的原因有许多,包括雄性不育(胡志勇等,2006;张青闪等,2006)、胚囊育性下降或败育(刘蕊等,2008;肖金平等,2007)、自交不亲和(Yamamoto等,2002;Ye等,2009)、胚胎败育(王玉玲等,2008)、多倍体造成的不育(Grosser等,2000)以及外在因素影响(Talon等,1992;邓秀新等,1996)等。对无籽八月桔的雄配子体的育性及自交亲和性的研究表明,无籽八月桔的雄配子体可育、自交亲和(另文发表)。在此基础上,本文对无籽八月桔成熟胚囊的育性和胚胎发育进行了研究,以期阐明无籽八月桔无籽化机理,为生产应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

材料无籽八月桔(树龄2 a)、有籽八月桔和台湾椪柑均种植于广州市华南农业大学分场果园,试验植株均以酸桔为砧木。

1.2 方法

1.2.1 无籽八月桔成熟胚囊的观察 取无籽八月桔即将开放的花蕾,将其雌蕊固定于卡诺固定液I(无水乙醇:冰醋酸=3:1)中,固定12~24 h,梯度乙醇浸洗(95%~90%~85%~80%~75%~70%)后(每次10 min),于70%乙醇中4℃保存备用。参照李湘阳等(2000)的方法并略做改进,步骤如下:于70%乙醇中剥取子房中的胚珠,经50%~30%乙醇梯度下行至蒸馏水,每级10 min;换入2.5%纤维素酶和2.5%果胶酶的混合液(pH5.5)中,在微型振

荡器上28℃酶解处理2~7 h;微型离心机上1500 rpm离心5 min,去酶液,水洗2次,去上清,加入乳酚甘油(乳酸20 mL、酚20 mL、甘油40 mL、蒸馏水20 mL)透明。制片,用吸管将胚珠和一滴乳酚甘油转移到载玻片上,加上盖玻片,用解剖针在盖玻片上轻敲,使胚珠的细胞分散,分离出胚囊,用倒置相差显微镜(Olympus IMT-2,日本)观察拍照。

1.2.2 无籽八月桔自交和异交胚胎发育的观察 分别于无籽八月桔自交、无籽八月桔×有籽八月桔及无籽八月桔×台湾椪柑授粉后2、3、4、5、6及7周取幼果,每个处理采集4个发育正常的幼果,将材料浸于卡诺氏固定液I(无水乙醇:冰醋酸=3:1)带回,固定12~24 h,梯度乙醇浸洗后,置70%乙醇中4℃保存备用。将材料用2%丙酸乙醇媒染及2%丙酸乙醇+爱氏苏木精(2:1)整染。随后进行流水冲洗、梯度乙醇脱水以及氯仿透明、浸蜡。最后用石蜡对处理过的材料包埋。用切片機(AO820,美国)进行切片,厚度8 μm,经二甲苯脱蜡,中性树胶封片后,在光学显微镜(Olympus BH-2,日本)下镜检,选取有代表性的片子用数码显微照相系统(Olympus DP70)进行拍照。

2 结果与分析

2.1 酶解时间对无籽八月桔胚珠解离效果的影响

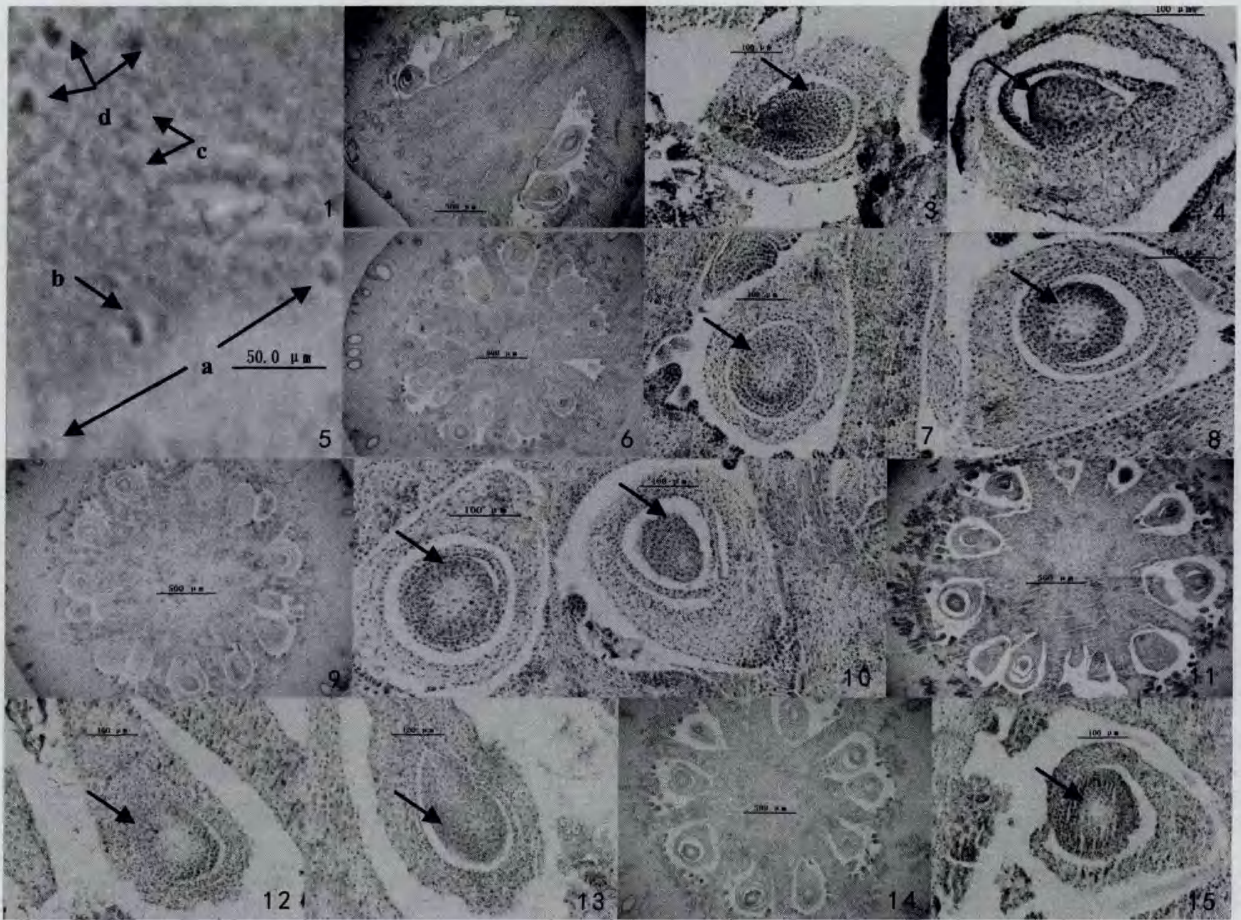
不同的酶解时间对无籽八月桔胚珠解离有显著影响。于微型振荡器上,酶解4~5 h的效果最好,内外珠被几乎完全脱落。酶解时间在3 h以下的胚珠,其内外珠被没有脱落,还需用解剖针使之离散,操作不方便;酶解6 h以上的胚珠解离过度,内外珠被虽脱落,但胚囊无法保证其完整性,也不利于观察。

2.2 无籽八月桔成熟胚囊的结构观察

利用酶解振荡压片法,从无籽八月桔的胚珠中分离出“七胞八核”的胚囊结构(图版I:1),可见在珠孔端有1个卵细胞、2个助细胞,在合点端有3个反足细胞,以及在这两群细胞之间有1个大的含2个极核的中央细胞。由此表明,无籽八月桔成熟胚囊的发育是正常的。

2.3 无籽八月桔自交和异交胚胎发育状况

无籽八月桔自交和异交授粉后2周,观察到多数的球形胚和少数的早心形胚(图版I:2-10)。自交和异交授粉后3周和4周,可以观察到心形胚和鱼雷形胚(图版I:11-15,图版II:16-28),已进入分



图版 I 1. 无籽八月桔成熟胚囊(a. 两个助细胞, b. 卵细胞, c. 极核(不清晰, 因为不在同一个光切面上), d. 3 个反足细胞); 2-4. 无籽八月桔 × 无籽八月桔授粉后 2 周(2. 子房纵切面, 3. 球形胚, 4. 球形胚向心形胚发育); 5-7. 无籽八月桔 × 有籽八月桔授粉后 2 周(5. 子房横切面, 6-7. 球形胚); 8-10. 无籽八月桔 × 台湾椪柑授粉后 2 周(8. 子房横切面, 9. 球形胚, 10. 心形胚); 11-13. 无籽八月桔 × 无籽八月桔授粉后 3 周(11. 子房横切面, 12. 心形胚, 13. 心形胚向鱼雷形胚发育); 14-15. 无籽八月桔 × 有籽八月桔授粉后 3 周(14. 子房横切面, 15. 心形胚)。

Plate I 1. Mature embryo sac of 'Wuzibayueju' (a. two synergids, b. one egg, c. two polar nuclei, d. three antipodal cells); 2-4. Two weeks after self-pollination of 'Wuzibayueju' (2. ovarian longitudinal section, 3. globular embryo, 4. globular embryo was growing into heart-shaped embryo); 5-7. Two weeks after cross-pollination of 'Wuzishatangju' × 'Bayueju' (5. ovarian transverse section, 6-7. globular embryo); 8-10. Two weeks after cross-pollination of 'Wuzishatangju' × 'Ponkan' (8. ovarian transverse section, 9. globular embryo, 10. heart-shaped embryo); 11-13. Three weeks after self-pollination of 'Wuzibayueju' (11. ovarian transverse section, 12. heart-shaped embryo, 13. Heart-shaped embryo was growing into torpedo-shaped embryo); 14-15. Three weeks after cross-pollination of 'Wuzishatangju' × 'bayueju' (14. ovarian transverse section, 15. heart-shaped embryo).

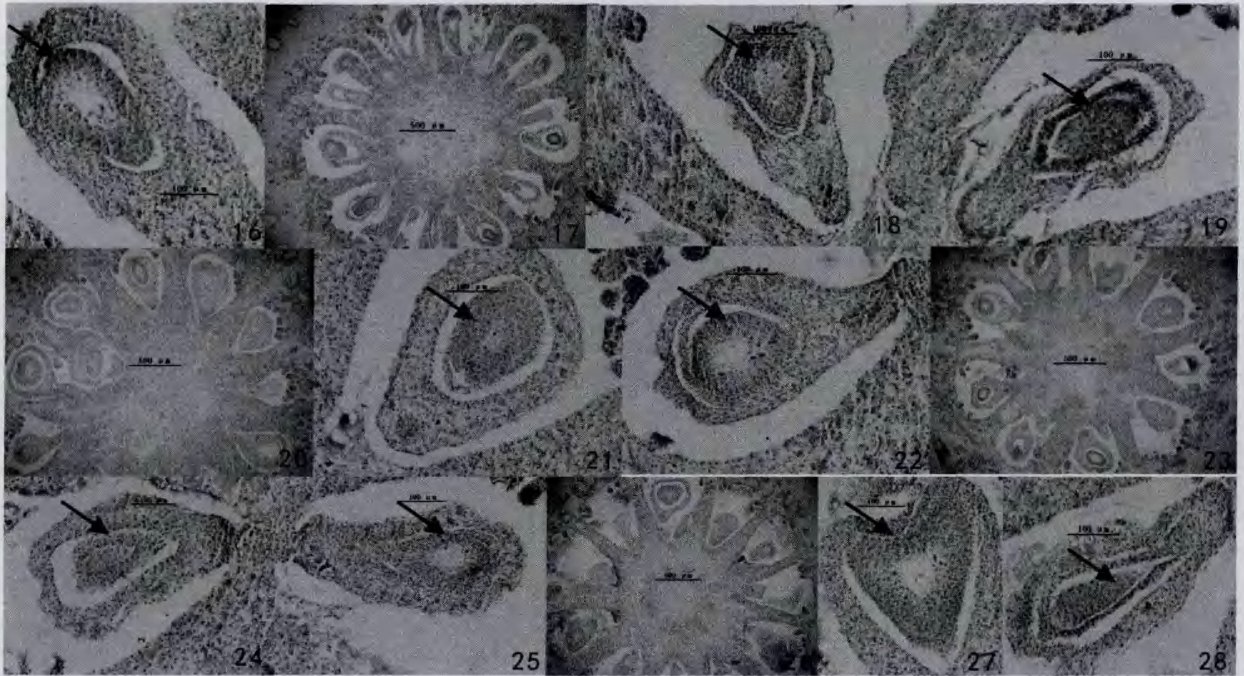
化时期, 心形胚是球形胚发育形成、左右对称而顶端扁平的结构, 形似心脏; 鱼雷形胚是心形胚进一步发育, 在扁平顶端开始形成两枚子叶微突, 形似鱼雷。授粉后 5 周, 无论自交和异交均可见无籽八月桔的胚胎发育基本进入鱼雷形胚时期, 部分胚从鱼雷形胚向子叶胚转变(图版 III: 1-9)。授粉后 6 周, 无籽八月桔自交和异交多数胚胎已发育成子叶胚, 此时珠柄存在(图版 III: 10-15, 图版 IV: 16-18)。授粉后 7 周, 无籽八月桔自交和异交授粉, 其子叶胚仍进一步发育形成种子, 珠柄仍然存在(图版 IV: 19-27)。结果表明, 无籽八月桔自交和异交的胚胎发育正常, 没有出现胚胎中途败育, 同时也可间接说明无籽八月

桔的胚囊可育。

3 讨论

3.1 酶解振荡法对胚囊制片效果的影响

酶解法是最近发展起来的技术, 可以一次分离到大量具有生活力的完整胚囊, 具有操作简便、工作周期短等优点。由于酶解分离的效果受植物种类、胚囊发育时期、生理状况、酶的种类、浓度、pH 值、酶解时间和温度等因素的影响, 因此, 目前仅在烟草、泡桐、金鱼草、向日葵等少数植物成功分离到胚囊(杨鹭生等, 2004)。柑桔胚珠为厚珠心组织类型,



图版 II 16. 无籽八月桔×有籽八月桔授粉后 3 周(心形胚向鱼雷形胚发育); 17-19. 无籽八月桔×台湾椪柑授粉后 3 周(17. 子房横切面, 18. 心形胚, 19. 心形胚向鱼雷形胚发育); 20-22. 无籽八月桔×无籽八月桔授粉后 4 周(20. 子房横切面, 21. 心形胚向鱼雷形胚发育, 22. 心形胚); 23-25. 无籽八月桔×有籽八月桔授粉后 4 周(23. 子房横切面, 24. 心形胚向鱼雷形胚发育, 25. 鱼雷形胚); 26-28. 无籽八月桔×台湾椪柑授粉后 4 周(26. 子房横切面, 27. 心形胚, 28. 鱼雷形胚). 标尺: 1=50 μm ; 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26=500 μm ; 3-4, 6-7, 9-10, 12-13, 15-16, 18-19, 21-22, 24-25, 27-28=100 μm .

Plate II 16. Three weeks after cross-pollination of 'Wuzishatangju' × 'bayueju' (Heart-shaped embryo was growing into torpedo-shaped embryo); 17-19. Three weeks after cross-pollination of 'Wuzishatangju' × 'Ponkan' (17. ovarian transverse section, 18. heart-shaped embryo, 19. Heart-shaped embryo was growing into torpedo-shaped embryo); 20-22. Four weeks after self-pollination of 'Wuzibayueju' (20. ovarian transverse section, 21. Heart-shaped embryo was growing into torpedo-shaped embryo, 22. heart-shaped embryo); 23-25. Four weeks after cross-pollination of 'Wuzishatangju' × 'Bayueju' (23. ovarian transverse section, 24. Heart-shaped embryo was growing into torpedo-shaped embryo, 25. torpedo-shaped embryo); 26-28. Four weeks after cross-pollination of 'Wuzishatangju' × 'Ponkan' (26. ovarian transverse section, 27. heart-shaped embryo, 28. torpedo-shaped embryo); Bar: 1=50 μm ; 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26=500 μm ; 3-4, 6-7, 9-10, 12-13, 15-16, 18-19, 21-22, 24-25, 27-28=100 μm .

胚囊被多层珠心及珠被细胞所包围, 因此酶浓度要求较高。无籽八月桔子房内胚珠很小, 酶解后再剥离珠心细胞操作难度较大, 且不易剥离干净, 影响观察效果, 本研究采用酶解振荡相结合的方法, 借助轻微的振荡使珠被和珠心细胞易于脱离胚珠, 免去了人工剥离的困难, 可一次性获得大量较完整的胚囊。再结合倒置相差显微镜可方便地观察到胚囊的结构。

3.2 无籽八月桔胚囊育性

胚囊是雌性器官的重要组成部分, 也是受精和胚珠形成种子的重要场所, 因此胚囊的异常发育也是导致果实无核的原因之一。刘蕊等(2008)研究发现, 郁南无核黄皮胚囊受精前败育是导致其无核的重要原因之一。无核葡萄中, 如黑科林斯品种, 其花粉发育正常, 但雌蕊中的胚囊发育不完全或退化, 无法进行受精作用, 只有靠花粉管中释放出的生长素刺激子房膨大而形成无核小果(朱林, 2001)。董军等(2003)在

芒果胚败育研究中发现, 芒果幼胚败育是由于胚囊在七细胞八核时期, 助细胞与反足细胞等营养细胞退化, 导致胚囊退化。无核荔枝的功能大孢子经过分裂, 在四核胚囊和八核胚囊形成后会出现多条异常的发育途径, 导致胚囊无法形成正常的卵器而败育(刘颂颂等, 1999)。同样, 钦州无核黄皮形成无核的机理也是由于胚囊不育而导致的(吴健华等, 2004)。而在无核柑桔中, 像丽椪 2 号、蕉柑、黔阳无核椪柑、脐橙、温州蜜柑、伏令夏橙、锦橙、晚蜜 1 号、晚蜜 2 号等种类或品种, 其无核的原因除花粉高度不育外, 还与胚囊高度败育或育性下降有关(肖金平等, 2007; 吕柳新等, 1997; 唐世民等, 2001; 温寿星等, 2000)。本研究通过对无籽八月桔成熟胚囊的观察发现, 无籽八月桔成熟胚囊具七个细胞及八核, 胚囊发育正常, 没有退化的迹象; 结合无籽八月桔自交和异交授粉胚胎发育过程观察发现, 自交和异交授粉后, 胚经过球形胚、心



图版 III 1-3. 无籽八月桔×无籽八月桔授粉后 5 周(1. 子房横切面, 2. 鱼雷形胚, 3. 子叶胚); 4-6. 无籽八月桔×有籽八月桔授粉后 5 周(4. 子房纵切面, 5. 鱼雷形胚, 6. 子叶胚); 7-9. 无籽八月桔×台湾椪柑授粉后 5 周(7. 子房横切面, 8-9. 鱼雷形胚向子叶胚发育); 10-12. 无籽八月桔×无籽八月桔授粉后 6 周(10. 子房横切面, 11-12. 子叶胚); 13-15. 无籽八月桔×有籽八月桔授粉后 6 周(13. 子房横切面, 14-15. 子叶胚); 16. 无籽八月桔×台湾椪柑授粉后 6 周(子房横切面)。

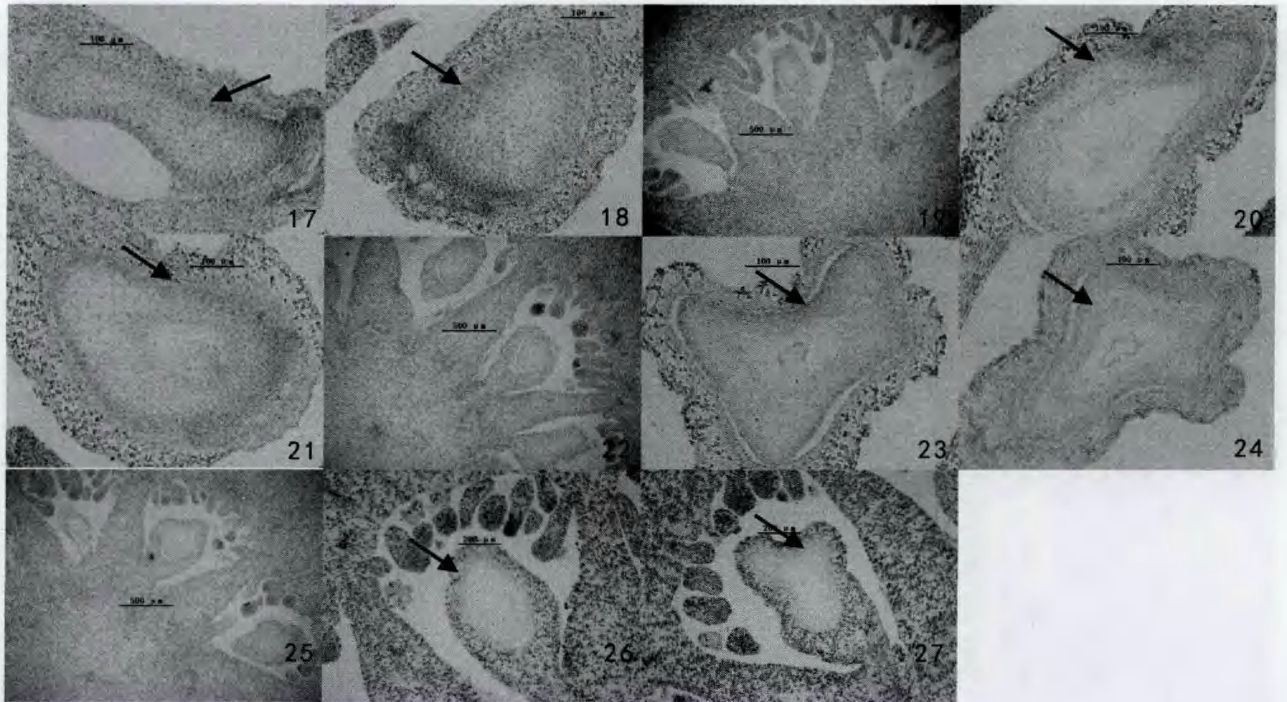
Plate III 1-3. Five weeks after self-pollination of 'Wuzhishatangju' (1. ovarian transverse section, 2. torpedo-shaped embryo, 3. cotyledonary embryo); 4-6. Five weeks after cross-pollination of 'Wuzhishatangju' × 'bayueju' (4. ovarian longitudinal section, 5. torpedo-shaped embryo, 6. cotyledonary embryo); 7-9. Five weeks after cross-pollination of 'Wuzhishatangju' × 'Ponkan' (7. ovarian transverse section, 8-9. Torpedo-shaped embryo was growing into cotyledonary embryo); 10-12. Six weeks after self-pollination of 'Wuzhishatangju' (10. ovarian transverse section, 11-12. cotyledonary embryo); 13-15. Six weeks after cross-pollination of 'Wuzhishatangju' × 'bayueju' (13. ovarian transverse section, 14-15. cotyledonary embryo); 16. Six weeks after cross-pollination of 'Wuzhishatangju' × 'Ponkan' (ovarian transverse section).

形胚、鱼雷形胚和子叶胚后可以发育成正常种子痕迹, 间接表明无籽八月桔的胚囊可以进行正常受精。由此表明无籽八月桔的雌配子体可育。

3.3 无籽八月桔胚胎发育现象

胚胎败育主要是指雌雄蕊发育正常, 亦能进行授粉受精, 但由于发生了致死遗传变异, 使胚中途死亡而引起无核, 也称伪单性结实。王近卫等(1992)研究认为, 葡萄合子胚中途败育的原因是胚乳核不分裂, 从而导致胚乳细胞解体, 胚乳败育, 不能形成可育的种子。刘小宁等(2005)对火焰无核葡萄胚胎发育进行研究, 发现胚胎败育存在两种类型: 一是由

于胚乳核不分裂或分裂异常, 无法向合子提供生长发育所需的营养, 导致合子无法进行正常分裂; 二是胚乳前期发育正常, 但中途退化, 胚缺乏营养致使其发育中止而败育。王飞等(2005)发现无核葡萄胚败育的主要原因是合子胚发育不良, 珠心、珠被细胞提早解体退化, 胚乳不分裂或只进行 1~2 次分裂。荔枝“绿荷包”的胚胎发育存在着畸变现象, 其胚柄细胞将胚推挤出珠孔, 使之游离于内、外珠被之间的空腔, 使胚不能获得发育所需的正常养分而败育(张健等, 2006)。王跃进等(2007)研究发现“火焰无核”、“大粒红无核”和“京可晶”3 个无核葡萄品种胚乳开



图版 IV 17-18. 无籽八月桔×台湾椪柑授粉后 6 周(17. 鱼雷形胚, 18. 子叶胚); 19-21. 无籽八月桔×无籽八月桔授粉后 7 周(19. 子房横切面, 20-21. 子叶胚); 22-24. 无籽八月桔×有籽八月桔授粉后 7 周(22. 子房横切面, 23-24. 子叶胚); 25-27. 无籽八月桔×台湾椪柑授粉后 7 周(25. 子房横切面, 26-27. 子叶胚). 标尺: 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25=500 μm ; 2-3, 5-6, 8-9, 11-12, 14-15, 17-18, 20-21, 23-24=100 μm ; 26-27=200 μm .

Plate IV 17-18. Six weeks after cross-pollination of 'Wuzhisatangju' × 'Ponkan' (17. torpedo-shaped embryo, 18. cotyledonary embryo); 19-21. Seven weeks after self-pollination of 'Wuzhisatangju' (19. ovarian transverse section, 20-21. cotyledonary embryo); 22-24. Seven weeks after cross-pollination of 'Wuzhisatangju' × 'bayueju' (22. ovarian transverse section, 23-24. cotyledonary embryo); 25-27. Seven weeks after cross-pollination of 'Wuzhisatangju' × 'Ponkan' (25. ovarian transverse section, 26-27. cotyledonary embryo); Bar: 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25=500 μm ; 11-12, 14-15, 17-18, 20-21, 23-24=100 μm ; 26-27=200 μm .

始败育的时期分别为花后 29、42、34 d, 胚开始大量败育的时期分别为花后 39、51、45 d。扈惠灵等(2007)研究发现, 磨盘柿早期败育型杂种的初生胚乳核分裂出现异常, 多数胚最终只能发育至球形早期; 晚期败育型杂种的胚乳没有明显的异常现象, 但胚发育滞后, 且着生位置偏离珠孔, 呈横生或斜生状态。无核雪柑珠被、珠心、胚囊及珠心胚等组织的崩溃、瓦解及最终消失, 是导致雪柑无核、少核的一个重要原因(王玉玲等, 2008)。本研究通过无籽八月桔自交和异交的授粉胚胎发育过程的研究发现, 无籽八月桔自交及异交后的胚胎发育正常, 经历了正常的球形胚、心形胚、鱼雷形胚及子叶形胚时期, 并能发育成正常种子痕迹。由此表明, 无籽八月桔没有发生胚胎中途败育这一致死遗传变异, 胚胎败育不是其无籽的真正原因。

3.4 无籽八月桔无籽原因分析

经雄配子育性观察、自交不亲和观察、胚囊发育

观察、胚胎发育观察及田间授粉实验等一系列的研究, 排除了造成无籽的雄配子不育、自交不亲和性、胚囊败育、胚胎中途败育等原因, 无籽八月桔无籽原因可能是由于温度这一外界环境因素所致, 可能是一种低温敏感型无籽突变体。这种推测依据如下: 第一, 果树上温敏不育造成无籽(核)或少籽(核)现象不少见。如有温敏无核荔枝的报道(杨应华等, 2002; 王廷标等, 1997)。温敏无核荔枝由于低温影响, 在受精过程中, 精子不能进入卵膜或进入卵后雌雄核不融合, 导致卵受精失败并退化, 次生核虽正常受精, 并产生核型胚乳, 有的还能发育到细胞型胚, 到 12 d 左右也完全退化, 导致胚珠极早败育, 但假种皮仍能发生发育, 最终形成无核果实(杨应华等, 2002)。东镇红芒具有 2 次结果习性, 12 月份第 1 次开花结的果, 由于温度低, 果小, 种子会变成“纸核”(核薄如纸, 基本上没有种胚); 4 月份第 2 次开花结的果, 由于温度高, 果大, 种子正常(董军等,

2006)。第二,无籽八月桔是课题组在粤西山区发现的无籽芽变突变体,在研究其无籽机理时,采用的是在温度较高的广州通过无性繁殖手段种植的材料,广州与粤西山区开花时温度差异比较大,从而可能造成育性存在差异。具体原因还有待进一步研究。

4 结论

本研究对胚囊和胚胎发育进行观察,发现无籽芽变八月桔的胚囊具有七胞八核结构,自交和异交授精果实胚胎发育正常,由此可以确定胚胎败育不是无籽八月桔无籽的原因。

参考文献:

- 王廷标. 1997. 无核荔枝新株系的发现及温敏无核理论和无核技术研究[J]. 热带作物科技, (5): 1-7
- 邓秀新, 彭成绩, 陈竹生, 等. 2008. 中国柑桔品种[M]. 北京: 中国农业出版社: 50
- 朱林. 2001. 为什么会产生无核葡萄[J]. 中外葡萄与葡萄酒, (3): 32
- 肖金平, 陈力耕. 2007. 柑桔无核机理与无核性状分子标记研究[D]. 杭州: 浙江大学: 1-96
- 吴健华, 赵向阳. 2004. 无核黄皮的形成机理及主要品种[J]. 广西农业科学, 35(2): 116-117
- 沈德绪. 1995. 果树育种学[M]. 北京: 农业出版社: 85-86
- Deng XX(邓秀新), Guo WW(郭文武), Sun XH(孙绪华). 1996. Advances in breeding and selection of seedless types of citrus in China(我国无核柑桔类型选育研究进展—文献综述)[J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 23(3): 235-240
- Dong J(董军), Lan CY(蓝崇钰), Luan TG(栾天罡). 2003. Preliminary studies on developmental anatomy of a seedless mango fruit(芒果胚败育果实发育研究)[J]. J Univ Elect Sci Tech China(电子科技大学学报), 32(6): 752-754
- Dong J(董军), Lin DT(林丹彤), Luan TG(栾天罡). 2006. Study on flowering behavior and meiosis of pollen mother cells in seedless mango(“纸核”东镇红芒开花习性及花粉母细胞减数分裂研究)[J]. Subtrop Plant Sci(亚热带植物科学), 35(2): 9-11
- Hu HL(扈惠灵), Li Z(李壮), Cao YQ(曹永庆), et al. 2007. Cytological research on abnormal hybrid seeds in parthenocarpic Mopanshi persimmon cultivar(磨盘柿败育杂种胚胎发育的细胞学特征)[J]. J Fruit Sci(果树学报), 24(5): 630-633
- Hu ZY(胡志勇), Deng XX(邓秀新). 2006. Studies on the cytological and molecular mechanism referring seedlessness of ‘Ougan’ and Satsuma Mandarin(‘无核瓯柑’、温州蜜柑无核的细胞及分子机理的研究)[D]. Wu Han(武汉): Hua Zhong Agric Univ(华中农业大学): 1-121
- Li XY(李湘阳), Zhou J(周坚). 2000. Isolation and morphological observation of viable embryo sac in Paulownia fortunei(泡桐生活胚囊的分离及细胞学观察)[J]. J Nanjing Fore Univ(南京林业大学学报), 24(3): 37-40
- Liu R(刘蕊), Feng L(冯莉), Li DH(李德红), et al. 2008. The cytological observation of embryo sac development abnormality in Yu'nán Seedless Wampee(郁南无核黄皮胚囊异常发育的细胞学观察)[J]. J South China Agric Univ(华南农业大学学报), 4(29): 51-54
- Liu SS(刘颂颂), Ye YS(叶永昌), Zhao XD(招晓东), et al. 1999. An embryological study of seed abortion in a seedless Lichi Strain(无核荔枝种子败育的胚胎学研究)[J]. J South China Agric Univ(华南农业大学学报), 20(2): 41-46
- Liu XN(刘小宁), Wang YJ(王跃进), Zhang JX(张剑侠), et al. 2005. Development and abortion of the ovules, endosperms and embryos of flame seedless grape(Flame Seedless 葡萄胚珠、胚乳及胚发育与败育的研究)[J]. Acta Bot Boreali-Occident Sin(西北植物学报), 25(10): 1947-1953
- Lv LX(吕柳新), Chen GX(陈桂信). 1997. Genesis and developments of megaspore and nucellar embryo in Jiaogan(蕉柑大孢子与珠心胚的发生发育)[J]. J Fujian Agric Univ(福建农业大学学报), 26(4): 397-400
- Tang SM(唐世民), Hu BH(胡炳洪). 2001. Selecting of a seedless, good-quality and high-yield cultivar of Ponkan-Qianyang seedless ponkan(无核优质丰产椪柑新品系—黔阳无核椪柑的选育)[J]. South China Fruits(中国南方果树), 30(5): 3-6
- Wang F(王飞), Wang YJ(王跃进), Zhou HL(周会玲), et al. 2005. Cytological study of embryo development and abortion in hybrid progeny of seedless grape and Chinese wild grapes(无核葡萄与中国野生葡萄杂种胚发育和败育的细胞学研究)[J]. J Northwest Sci-Tech Univ Agric Fore Nat Sci Edi(西北农林科技大学学报·自然科学版), 33(3): 61-65
- Wang JW(王近卫), Horiuchi Shosaku(堀内昭作), Lin BN(林伯年), et al. 1992. A morphological study of seedless fruit formation in the gape culture ‘Wuhebai’(无核白葡萄的无核果形成的组织形态学形究)[J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 19(1): 1-6
- Wang YJ(王跃进), Jiang SP(江淑平), Liu XN(刘小宁), et al. 2007. Mechanism of embryo abortion in stenopermocarpic seedless grape(假单性结实无核葡萄胚败育机理研究)[J]. Acta Bot Boreali-Occident Sin(西北植物学报), 27(10): 1987-1993
- Wang YL(王玉玲), Chen QX(陈清西), Su HL(苏海兰). 2008. Anatomic observation of the embryo development in Wuhexuegan and Xuegan after self-breeding or cross-breeding(无核雪柑与普通雪柑自交或杂交后种胚发育的解剖学观察)[J]. J Fujian Agric Fore Univ Nat Sci Edi(福建农林大学学报·自然科学版), 37(2): 145-149
- Wen SX(温寿星), Cai ZJ(蔡子坚). 2000. The overview of surveys about the sterile mechanism of seedless citrus in China(我国无核柑桔不育机理研究概况)[J]. Fujian Fruits(福建果树), (2): 15-16
- Yang LS(杨鹭生), Li GP(李国平). 2004. Procedures for observation of embryo sac structure of angiosperms(被子植物胚囊结构的观察方法)[J]. Res Exploration Lab(实验室研究与探

外植体进行愈伤组织的诱导和植株再生研究。结果表明,在合适的培养基配方上叶片和茎都可以诱导出愈伤组织,但叶片的诱导率较高,且形成的愈伤组织能够再生出不定芽和不定根。因此,对于离体再生为目的的睫毛萼凤仙花组织培养来说,叶片是最适的外植体。在 MS + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 培养基上,叶片诱导的愈伤组织可以直接再生出植株。

对叶片和茎诱导的愈伤组织进行超微结构观察,发现在愈伤组织阶段,出现再分化和未出现再分化的组织在超微结构上就有明显差异,所以在愈伤组织再生研究中,可以根据超微结构初步判断其再生能力,从而减少试验所需时间,增加成功的机率。

本试验首次对睫毛萼凤仙花进行离体培养,并再生出了植株,但对于商业化大规模生产来说,其再生体系还需要进一步的系统化研究。

参考文献:

- 陈艺林. 2001. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,47(2): 186-187
- Cai XZ(蔡秀珍), Liu KM(刘克明), Cong YY(丛义艳), et al. 2007. *Impatiens* L. of 10 species of *Ipomoea* by Scanning Electron Microscope(SEM)(凤仙花属(*Impatiens*) 10 种植物花粉形态的扫描电镜观察)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 27(3):279-283
- Fan MY(樊梅英), Xia RH(夏日红), Cao WY(曹万友), et al. 2006. Znitial study of ecology characteristics of *Impatiens blepharosepala*(睫毛萼凤仙花生态特性的初步研究)[J]. *J Huangshan Univ*(黄山学院学报), 8(5):61-63
- Fan MY(樊梅英), Xia RH(夏日红), Cao WY(曹万友). 2007. A comparative study on the growth of cultivated *Impatiens blepharosepala* and of the wild *I. blepharosepala*(栽培与野生睫毛萼凤仙花生长的比较研究)[J]. *J Huangshan Univ*(黄山学院学报), 9(5):52-53
- Liu J(刘静), Ting L(丁兰), Zhao QF(赵庆芳), et al. 2008. Tissue culture and rapid propagation of *Impatiens balsamine* L.(凤仙花的组织培养与离体快繁)[J]. *J Northwest Normal Univ; Nat Sci Edi*(西北师范大学学报·自然科学版), 44(1):80-82
- Tang ZS(汤泽生), Yang J(杨军), Chen DC(陈德灿), et al. 2006. Morphological variation in SP2 *Impatiens balsamina* induced by space flight(航天诱变凤仙花 SP-2 代形态变异的研究)[J]. *Acta Laser Biol Sin*(激光生物学报), 15(1):31-34
- Wang CF(王发春). 2008. Fatty acid compositions of *Impatiens balsamina* Linn seed oil(凤仙花籽油脂肪酸组分分析)[J]. *China Oils and Fats*(中国油脂), 33(6):78-79
- Wang Y(王越), Liu Y(刘燕). 2008. Tissue culture and rapid propagation of *Impatiens macrovezilla*(大旗瓣凤仙花的组织培养与快速繁殖)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 44(3):510
- Xiao LX(肖乐希), Liu KM(刘克明). 2009. Floral traits and pollination system of *Impatiens chinensis* (Balsaminaceae)(华凤仙花部特征和传粉系统研究)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 29(2):164-168
- Yang J(杨军), Li JT(李劲涛), Tang ZS(汤泽生), et al. 2008. Comparison on three mutant lines with different floral color in SP4 generation *Impatiens balsamina* (Balsaminaceae) induced by spaceflight(航天诱导凤仙花 SP-4 代三种不同花色突变系比较)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 30(2):221-226
- 索), 23(2):9-11
- Yang YH(杨应华), Li L(李蕾), Yu DN(余诞年). 2002. Research on the seed abortion and fruit development in a seedless litchi strain(温敏无核荔枝的种子败育和果实发育研究)[J]. *J Hainan Normal Univ; Nat Sci Edi*(海南师范学院学报·自然科学版), 15(2):71-74
- Zhang J(张健), Lv LX(吕柳新), Ye MZ(叶明志). 2006. Microscopic and submicroscopic observations on the abnormal embryonic development of embryo abortive litchi (*Litchi chinensis* cv. Luhebao)(胚胎败育型荔枝胚胎发育异常的显微及亚显微观察)[J]. *J Henan Agric Univ*(河南农业大学学报), 40(2):194-197
- Zhang QS(张青闪), He YR(何永睿), Wen SH(文尚华), et al. 2006. A preliminary cytological study of the seedless and few-seeded lines of Hongjiangcheng(*Citrus sinensis*)(红江橙无核(少核)选系的细胞遗传学初步研究)[J]. *J Southwest Agric Univ; Nat Sci Edi*(西南农业大学学报·自然科学版), 28(6):937-940
- Grosser JW, Ollitraul TP, Olivares-Fuster O. 2000. Somatic hybridization in citrus: An effective tool to facilitate variety improvement[J]. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 36(6):434-449
- Talon M, Zacarias L, Primo-Millo E. 1992. Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins [J]. *Plant Physiol*, 99(4):1 575-1 581
- Yamamoto M, Tominaga S. 2002. Relationship between seedlessness of keraji(*Citrus keraji* hort. ex Tanaka) and female sterility and self-incompatibility [J]. *J Jpn Soc Horticult Sci*, 71(2):183-186
- Ye WJ, Qin YH, Ye ZX, et al. 2009. Seedless mechanism of a new mandarin cultivar 'Wuzishatangu' (*Citrus reticulata* Blanco) [J]. *Plant Sci*, 177:19-27

(上接第 261 页 Continue from page 261)