

“早蜜橙”的来源 结构及其果实性状的研究

胡桂兵¹ 陈大成¹ 蔡明段²

(1 华南农业大学园艺系, 广州, 510642 2 广东省博罗杨村华侨柑桔场)

摘要 以“早蜜橙”这个新发现的柑桔嫁接嵌合体及与其有关品种类型的柑桔为材料,通过叶片气孔观察、花粉试验、多种酶同工酶分析和果实性状的比较分析,研究了它的来源、结构和果实主要经济性状的表现。结果发现:(1)在来源上,“早蜜橙”是由甜橙(新会甜橙的可能性最大)和南丰蜜桔形成的嫁接嵌合体。(2)在嵌合体结构上,“早蜜橙”是一个不完全周缘嵌合体,ⅡⅢ以橙为主,ⅠⅠ则以桔为主,兼有橙因子。(3)“早蜜橙”果实品质上等,果实性状大部分来自橙,少数来自桔。糖、酸等主要营养物质的含量大都介于两亲本之间,绝大部分水解氨基酸含量比原接穗和砧木品种都高,有较大的利用价值。

关键词 柑桔嫁接嵌合体;来源;结构;果实性状

中图分类号 S666.4

“早蜜橙”是1980年在博罗杨村华侨柑桔场新发现的柑桔嫁接嵌合体,现尚处于观察选择阶段,因此对它进行深入的研究,很有必要。

本研究综合运用多种技术,对“早蜜橙”及与其有关种类的柑桔,进行了叶片气孔大小和密度测定、花粉分析、过氧化物酶(PER)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化氢酶(CAT)、细胞色素氧化酶(CCO)、谷草转氨酶(GOT)、超氧化物歧化酶(SOD)等6种酶系统的同工酶分析以及果实性状和营养成分的分析鉴评等研究。目的在于通过较为先进和细微的方法,查明“早蜜橙”的来源、嵌合体结构及其果实主要性状表现,为进一步研究利用这个柑桔嫁接嵌合体提供科学依据。

1 材料与方法

本研究所用的所有材料均取自广东省博罗杨村华侨柑桔场柑桔研究所品种资源圃(原种来自中国农业科学院柑桔研究所)。

1.1 “早蜜橙”来源和结构鉴定

1.1.1 叶片气孔大小、密度分析 上午10至11点,在树冠外围中部枝梢的中下部取成熟已定型的9个种类的柑桔(名称见表1)叶片10片,卡诺固定液固定,铬酸解离法制片,Ⅰ2-KI染色后在显微镜下观察,测定气孔大小和密度。每个叶制片观察4个视野,求出10张叶片观察的平均值和标准差,并用t测验进行多重比较测试。

1.1.2 花粉分析 用额尔特曼醋酸酞分解法(宋之琛等,1965)研究了8个种类柑桔(名称见表2)的花粉。光学显微镜下观察花粉粒大小、形态及花粉壁厚薄,测量花粉极轴长(P)和赤道轴长(E);扫描电子显微镜(JSM-25S型,工作电压15kV)下观察花粉萌发沟孔和外壁纹饰特征,测量网脊宽(R)和网眼宽(L)以及极面沟末端距离和网眼密度。花粉形态的描述

基本按照额尔特曼的术语(王伏雄等, 1954). 花粉粒大小、网脊宽、网眼宽均为 20 个的统计值并计算其极轴与赤道轴的比值 (P/E) 以及网脊宽与网眼宽的比值 (R/L). 根据观测结果比较分析“早蜜橙”在花粉上的表现及其与参测的其它种类柑桔之间的关系.

1.1.3 同工酶分析 “早蜜橙”来源的同工酶分析: 用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 法分析了 11 个柑桔种类 (名称见图 1) 的 PER PPO CAT CCO GOT SOD 6 种酶系统的同工酶, 试材均为采于树冠四周的健康老熟秋梢叶片.

酶液提取参照 Menendez 等 (1986) 和方德秋等 (1991) 的方法. 凝胶制备和电泳参照陆士伟等 (1987) 的方法. 染色时, PER 用改良醋酸联苯胺法 (沈德绪, 1992), PPO 用王定祥 (1986) 的方法, CAT 用陆士伟等 (1987) 的方法, CCO 用胡能书等 (1981) 的方法, GOT 用 Torres 等 (1978) 的方法, SOD 用 Vallejos (1983) 的方法. 每个样品重复 3 次. 染色后, 记录, 拍照, 胶片用 7% 乙酸固定液固定后, 制成干胶板, 长期保存.

统计时先计算“早蜜橙”橙变枝和每个橙类样品各种酶的酶谱相似系数 SIV (计算公式: $SIV = \text{两样品间相同酶带数} / \text{总酶带数}$), 然后求出它和每个橙类样品的平均相似系数 (计算公式: 平均 $SIV = \text{各酶种的 } SIV / \text{酶种数}$). 再同样的方法算出“早蜜橙”和每个桔类的平均 SIV . 两样品间的平均 SIV 越大, 它们之间的亲缘关系越近.

“早蜜橙”嵌合体结构的同工酶分析: 根据形成层发生理论 (Frost et al, 1942), 用上述 PAGE 法分析新会甜橙、“早蜜橙”、南丰蜜桔同样成熟度果实的汁胞 (LI 层)、果皮 (LII 层)、种子 (LIII 层) 和白皮层 (LIIV 层) 4 种组织器官的 PE RPPQ GOT SOD 4 种酶同工酶.

1.2 “早蜜橙”果实性状和主要营养成分分析

1994 年 11 月至 12 月, 采集树冠四周, 无病虫害的新会甜橙、“早蜜橙”、南丰蜜桔成熟果实, 带回实验室后, 每个种类取 10 个果进行外观及内部性状分析并综合评分 (总分 60 分). 每个样品取 5 个果用榨汁机榨出果汁, 混匀后用常规方法进行糖、酸、维生素 C 等主要营养成分分析. 另取 50 mL 混匀的果汁经 6 mol/L HCl 水解后用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪分析果汁中各种水解氨基酸含量.

2 结果与分析

2.1 “早蜜橙”的来源和结构

2.1.1 气孔大小、密度分析 结果见表 1, 经. 测验后发现: (1) 在气孔保卫细胞长度上, 除走马塘酸桔外, 所有的桔类间差异不显著. “早蜜橙”和桔类差异不显著, 但和橙类差异显著. (2) 在气孔保卫细胞宽度上, 所有的桔类间差异不显著. 除“早蜜橙”橙变枝外, 所有的橙类间差异也不显著. “早蜜橙”和桔类差异不显著, 但和橙类差异显著. (3) 在气孔密度上, 年桔、走马塘酸桔和海丰香炉桔之间差异不显著, 但它们和南丰蜜桔差异均很显著. 橙类除“早蜜橙”橙变枝外, 其余间差异均不显著. “早蜜橙”除和桔类的南丰蜜桔间差异不显著外, 和其它所有桔类或橙类均有不同程度的差异.

受测量误差和取材时气孔开闭的影响, 气孔观察的可靠性和精确度不是很高, 但总的来说, 还是一个非常简捷、有意义的工作, 从实验中我们至少可以得到以下两点推断: (1) “早蜜橙”在气孔大小上和桔类差异不显著, 但和橙类差异显著; 在气孔密度上仅和南丰蜜桔差异不显著. 说明“早蜜橙”的 LI 层基本为桔类因子 (根据形成层发生理论, 气孔是由 LI 层衍变

而来),并且它的砧木亲本很可能来源于南丰蜜桔. (2)桔类有些种类在气孔密度上差异很大,可能可以作为桔类品种鉴别的一个指标.

表 1 叶片气孔大小和密度的多重比较表⁽¹⁾

品 种 (类 型)	气孔保卫细胞长 μm			气孔保卫细胞宽 μm			气孔密度 / mm^2 $^{\circ}(\text{mm}^2)^{-1}$		
	平均数	差异显著性		平均数	差异显著性		平均数	差异显著性	
“早蜜橙”	11.05	f g h	E F G	8.20	e f	E F	645.5	c	C
南丰蜜桔	11.49	e f g	D E F	8.52	e f	E F	630.9	c	C
年 桔	10.92	g h	E F G	9.06	e	F	509.0	e f g	E F G
走马塘酸桔	10.35	h	G	8.31	e f	E F	475.9	g h	F G H
海丰香炉桔	11.14	e f g h	E F G	8.96	e	E F	532.8	c	E F
新会甜橙	14.58	a	A	11.47	b c	B C	547.5	d e	E
雪柑	13.82	b	A B	10.89	c	C	532.5	d e f	E F
暗柳橙	13.63	b	A B	11.73	b	B C	507.0	e f g	E F G
“早蜜橙”橙变枝	12.98	b c	B C	10.15	d	D	474.2	g h	F G H

(1)小写字母表示 $\alpha=0.05$ 显著小平,大写字母表示 $\alpha=0.01$ 显著小平

2.1.2 花粉分析 参试各样品的花粉有共同点,如花粉为圆至椭圆形,以长圆球形居多;赤道面观沟孔呈十字形,极面观四裂圆形,花粉大小为 $(25.6\sim 32.0)\mu\text{m}\times(24.7\sim 29.1)\mu\text{m}$;网状纹饰,两层壁,外壁外层厚于内层;外壁外层和内层在萌发孔处均匀变薄,孔几乎陷于花粉粒的轮廓之内等.

但花粉形态各种类间还是有差别的,如大部分橙类和少核或无核桔类有畸形变异花粉;有些样品有三裂或五裂花粉出现等,但受观察花粉的数量限制,这些差异并不完全能反应各样品花粉间的本质差异,所以单从花粉的大小、极面观和赤道面观等形态特征,难以看出“早蜜橙”和其它柑桔品种类型间的亲缘关系.但从萌发孔、网眼、网脊特征等细微的形态特征(见表 2)上进行分析后发现:“早蜜橙”和新会甜橙的萌发孔、外壁纹饰特征完全一样,但与南丰蜜桔、年桔、海丰香炉桔、红黎檬等其它桔类都有不同之处,说明“早蜜橙”这个嫁接嵌合体接穗亲本来源于新会甜橙的可能性最大, LII层(花粉由 LII层衍生而来)以橙类为主.

表 2 花粉壁网眼、网脊、极面沟末端距离、网眼密度、萌发孔特征、外壁纹饰特征比较

品种类型	脊宽	$R/\mu\text{m}$	网眼宽	R/L	极面沟末端	网眼密度	小	萌发孔	外壁纹饰		
			$L/\mu\text{m}$		距离 μm	孔数 $\cdot (\mu\text{m}^2)^{-1}$		特征 ⁽¹⁾	特征 ⁽²⁾		
暗柳橙	1.00±	0.23	0.67±	0.22	1.499	11.68±	1.20	50.59±	5.62	I	LM
普通雪柑	1.09±	0.26	0.77±	0.33	1.416	14.49±	0.51	26.23±	3.24	I	LM
新会甜橙	1.02±	0.19	0.71±	0.32	1.434	11.19±	0.58	41.22±	3.25	I	LS
“早蜜橙”	1.05±	0.20	0.75±	0.23	1.396	12.94±	1.02	31.85±	6.45	I	LS
南丰蜜桔	1.02±	0.22	0.43±	0.20	2.359	12.09±	5.53	56.2±	9.74	II	SL
年桔	0.98±	0.15	0.55±	0.24	1.775	10.53±	1.28	50.59±	11.24	II	SL
海丰香炉桔	0.74±	0.14	0.55±	0.18	1.364	9.46±	0.85	88.07±	8.59	I	SL
红黎檬	0.73±	0.13	0.71±	0.33	1.032	9.97±	0.68	59.96±	5.62	II	LM

(1)I = 萌发孔两端小,II = 平直,III = 两端扩大; (2)SL= 网眼小,脊宽; LS= 网眼大,脊狭;

LM= 网眼大,脊中狭

2.1.3 同工酶分析 “早蜜橙”来源的同工酶分析:部分酶谱见图 1. 统计后发现:“早蜜橙”橙变枝和新会甜橙平均 SIV 为 82.3%;和红 1-7 甜橙的平均 SIV 为 72.9%;和普通雪柑的平均 SIV 为 80.6%. 说明它的接穗亲本来自于新会甜橙的可能性最大,其次是雪柑.“早蜜橙”和南丰蜜桔的平均 SIV 为 78.1%;和普通蕉柑的为 65.8%;和年桔的为 65.8%;和海丰香炉桔的为 61.6%;和走马塘酸桔的为 60.3%;和红木檬的为 54.2%. 所以早蜜橙砧木亲本源于南丰蜜桔的可能性最大.

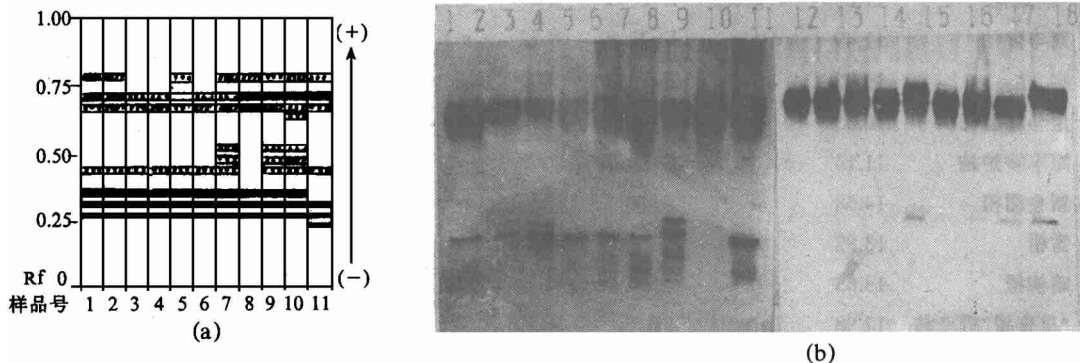
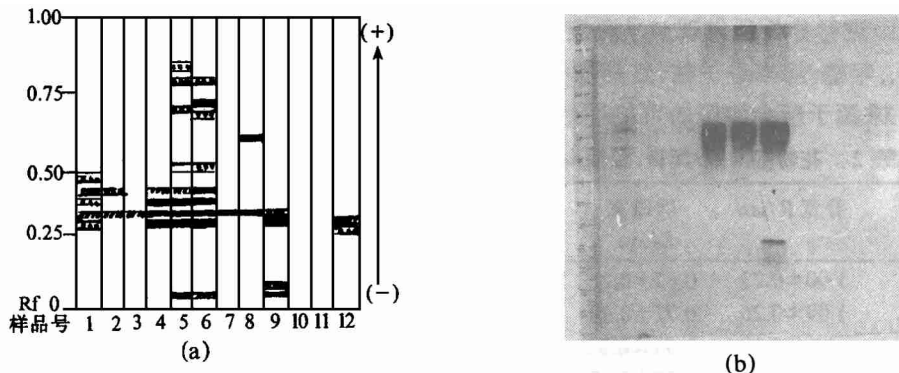


图 1 “早蜜橙”来源的 PER 同工酶酶谱

a 图中各样品号所对应的样品分别是: 1. 雪柑; 2. 红 1-7 甜橙; 3. 新会甜橙; 4. “早蜜橙”橙变枝; 5. “早蜜橙”; 6. 南丰蜜桔; 7. 普通蕉柑; 8. 年桔; 9. 海丰香炉桔; 10. 走马塘酸桔; 11. 红柠檬。图中酶带强弱顺序为:  > |||| > >

“早蜜橙”嵌合体结构的同工酶分析: 部分结果见图 2。分析表明: LI 层, “早蜜橙”和南丰蜜桔的平均 *SIV* 为 67.3%, 和新会甜橙的平均 *SIV* 为 60.0%, 说明“早蜜橙”的 LI 层嵌合复杂, 桔橙因子都有, 但桔因子稍占优。LII 层, “早蜜橙”和新会甜橙的平均 *SIV* 为

图 2 “早蜜橙”各层结构的 *PER* 同工酶酶谱

a 图中各样品号所对应的样品分别是: 1, 4, 7, 10为“早蜜橙”; 2, 5, 8, 11为新会甜橙; 3, 6, 9, 12为南丰蜜桔。其中 1~3为汁胞; 4~6为果皮; 7~9为种子; 10~12为白皮层。

77. 3% ,和南丰蜜桔的平均 *SIV* 为 51. 0% ,说明“早蜜橙”的 LII层基本由橙因子组成. LIII层,“早蜜橙”和新会甜橙的平均 *SIV*为 83. 6% ,和南丰蜜桔的平均 *SIV*为 62. 3% ,说明“早蜜橙”的 LIII层也基本由橙因子组成.

2.2 “早蜜橙”果实性状与主要营养成分比较分析

2.2.1 果实性状的分析与鉴评 22项统计项目中,“早蜜橙”的果实大小、果形指数、果皮颜色、果实重量、果实形状、果皮厚度、果心大小、种子数、果皮重量、种子重量等 10大项和新会甜橙相同或相近,占 45. 4%;而和南丰蜜桔相同或相近的仅有果肉色泽、风味浓度、果汁多少、果肉质度、化渣程度等 5项占 22. 7%;可食率、固形物、整齐度、成熟度、甜酸度等介于橙桔之间,而果皮光滑度均超亲,香味浓度均低亲.按柑桔果实性状的综合评分标准评分后,总分大小顺序为:“早蜜橙”(57. 3分)> 南丰蜜桔(56. 9分)> 新会甜橙(48. 9分). 根据评分,“早蜜橙”和南丰蜜桔果实性状表现上等,新会甜橙果实性状表现中上,说明“早蜜橙”这个桔橙嫁接嵌合体果实性状较优,且结合了接穗和砧木性状,但大部分性状接近接穗,少数性状接近砧木.当然也存在互作作用,使“早蜜橙”果实某些性状变优或变劣,如光滑度、香味浓度就是这样.

根据形成层发生理论,果皮的表皮、汁胞和囊瓣壁的内壁部分由 LI层产生;果皮的有色层、白皮层的外层以及种子由 LII层产生. 所以根据性状分析,从侧面可以证实:“早蜜橙”的 LI层砧木品种占优, LII层接穗品种占优.

2.2.2 果实主要营养成分的比较分析 分析结果见表 3表 4. 从表 3可以看出,“早蜜橙”的主要营养成分含量除 *Vc*稍高于橙、桔外,其余均介于橙、桔之间,有的接近橙,有的接近桔,没有规律性. 从表 4可以看出,“早蜜橙”所分析的 17种水解氨基酸和总氨基酸中,有 16种超过新会甜橙和南丰蜜桔,特别是脯氨酸的含量“早蜜橙”远远高于新会甜橙和南丰蜜桔.

表 3 果实主要营养成分分析表

主要营养成分	新会甜橙	“早蜜橙”	南丰蜜桔
pH值	4. 30	4. 35	4. 10
可滴定酸 <i>I</i> (%)	0. 48	0. 66	0. 79
可溶性糖(总糖) <i>I</i> (%)	12. 19	11. 45	11. 07
蔗糖 <i>I</i> (%)	2. 34	2. 43	3. 74
还原性糖 <i>I</i> (%)	9. 72	8. 89	7. 13
<i>Vc</i> 含量 /mg° L ⁻¹	231. 6	246. 0	243. 7

表 4 果汁水解氨基酸含量

μ g/*g*

水解氨基酸种类	新会甜橙	“早蜜橙”	南丰蜜桔	水解氨基酸种类	新会甜橙	“早蜜橙”	南丰蜜桔
天冬氨酸(ASP)	1527. 00	1667. 15	915. 25	异亮氨酸(ILEU)	65. 73	78. 95	63. 11
苏氨酸(THR)	87. 71	100. 78	101. 02	亮氨酸(LEU)	82. 71	93. 27	71. 96
丝氨酸(SER)	323. 67	280. 60	220. 80	酪氨酸(TYR)	39. 45	46. 59	43. 76
谷氨酸(GLU)	425. 40	524. 72	377. 66	苯丙氨酸(PHE)	65. 84	84. 84	126. 28
甘氨酸(GLY)	87. 80	98. 15	76. 59	赖氨酸(LYS)	121. 13	145. 98	138. 40
丙氨酸(ALA)	240. 37	288. 85	202. 34	组氨酸(HIS)	38. 91	44. 48	46. 54
胱氨酸(CYS)	37. 74	46. 81	45. 43	精氨酸(ARG)	481. 51	1099. 99	1211. 32
缬氨酸(VAL)	107. 49	130. 16	111. 56	脯氨酸(PRO)	1782. 12	2121. 74	646. 21
蛋氨酸(MET)	64. 89	75. 23	50. 29	总氨基酸	5578. 97	6928. 29	4448. 52

(1)进样量:50*μ*g

3 讨论

研究表明,“早蜜橙”是一个较为典型的嫁接嵌合体,它的砧木亲本可以确定为南丰蜜桔,而接穗亲本则最有可能是新会甜橙.在嵌合体结构上,“早蜜橙”是个不完全周缘嵌合体,LI层以桔为主,呈桔和甜橙的混合嵌合状态;LII层甜橙占绝大部分;LIII层则基本为甜橙.与当前广泛栽培的柑桔嫁接嵌合体改良橙(它的优良生态型为“红江橙”)相比较,“早蜜橙”LII层甜橙的细胞所占的比例较大,表现也相对较稳定.

从果实性状分析结果来看,“早蜜橙”品质表现最优,其营养成分含量一般都介于新会甜橙和南丰蜜桔之间,而令人感兴趣的是,其总氨基酸含量,远远高于新会甜橙和南丰蜜桔.几个对人体特别有益的氨基酸,如抗疲劳氨基酸—天门冬氨酸,人体所需的八种必需氨基酸中有五种(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸、蛋氨酸)都高于新会甜橙和南丰蜜桔.所以,从果实的品质和营养价值方面看,“早蜜橙”具有较高的利用价值.目前,“早蜜橙”在试种中,表现果实外表不够美观,早结、丰产、优质配套栽培措施尚未完善等问题.据观察,“早蜜橙”在不同砧木上,其果皮光滑度表现有明显差异.选择适当的砧木及探索其早结、丰产、优质配套栽培措施,是提高“早蜜橙”在生产上的利用价值的重要途径,值得今后进一步深入研究.

致谢 华南农业大学实验中心仪器分析室帮助进行了果汁氨基酸分析,电镜室杨秉耀高级工程师指导了扫描电镜操作,园艺系吴筱颖老师指导了光学显微摄影,谨此致谢.

参 考 文 献

- 王伏雄,喻诚江. 1954.花粉形态的研究I:术语及研究方法.植物学报,3(1): 81~ 102
- 王定祥. 1986.梨实生树个体发育过程中蛋白质含量、过氧化物酶和多酚化酶同工酶的变化.植物生理学报,12(1): 40~ 47
- 方德秋,肖顺元,章文才. 1991.柑桔同工酶的组织器官特异性研究.浙江柑桔,(4): 4~ 6
- 宋之琛. 1965.孢子花粉分析.北京:科学出版社,39~ 47
- 沈德绪主编. 1992.果树育种实验技术.北京:农业出版社,94~ 96
- 陆士伟,赖天斌. 1987.同工酶在农业上的应用.广州:广东科技出版社,98~ 100
- 胡能书,万贤国. 1981.同工酶技术及其应用.长沙:湖南科学技术出版社,110~ 112
- Frost H B, Krug C A. 1942. Diploidtetraploid chimeras and bud variants in citrus. Genetics, 27 619~ 634
- Menendez R A, Larsen F E, Fritts R J. 1986. Protein and isozyme electrophoresis and isoelectric focusing for characterization of apple clones. Scientia Horti, 29 211~ 220
- Torres A M, Soost T K, Diedenhofen U. 1978. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. Amer J Bot, 65(8): 869~ 881
- Vallejos C E. 1983. Enzyme activity staining. In Tanksley S D, Orton T J, eds. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 469~ 515

STUDIES ON THE ORIGIN STRUCTURE AND ITS FRUIT CHARACTERS OF“ ZAOMI ORANGE”

Hu Guibing¹ Chen Dacheng¹ Cai Mingduan²

(1 Dept. of Horticulture, South China Agr. Univ. , Guangzhou, 510642

2 Boluo Yangcun Overseas Chinese Citrus farm, Guangdong)

Abstract

With “Zaomi Orange” – the new citrus graft chimera and related cultivars types as material, a series of experiments including the observation of the leaf stomata, pollen test, analysis of zymograms as well as the analysis and comparison of fruit characters was performed. The results indicated that (1) “Zaomi Orange” was a graft chimera the stock being Xinhui Sweet Orange (most probable), and the scion Nanfeng Sweet Mandarin. (2) “Zaomi Orange” was an incomplete mericlinal chimera. Orange was dominant in LII and LIII, and in LI mandarin prevailed over orange. (3) Most of the fruit characters of “Zaomi Orange” was derived from orange, the contents of most of the nutrients such as sugar, acid were between the two parents, while the contents of most hydrolytic amino acids were higher than the stock and scion, demonstrating that “Zaomi Orange” was a valuable chimera.

Key words citrus graft chimera; origin; structure; fruit characters