

白乳胶花粉隔离法在君迁子无融合生殖鉴定中的应用

周艳芳¹, 毛树林¹, 周瑞金¹, 张晓娜¹, 张 鹏¹, 何宜恒¹, 扈惠灵^{1,2*}

(¹河南科技学院园艺园林学院, 河南新乡 453003; ²河南省园艺植物资源利用与种质创新工程研究中心, 河南新乡 453003)

摘 要:【目的】探究白乳胶在君迁子雌株花粉隔离中的有效性, 提高君迁子无融合生殖种质的鉴定效率。【方法】以君迁子成龄雌株为试材, 选择大花蕾期的单花, 利用硫酸纸袋套袋、尼龙网套袋以及白乳胶封涂柱头3种花粉隔离方式进行花粉隔离, 并以正常人工授粉为对照, 通过荧光显微镜观察供试柱头上花粉的情况, 确定不同隔离处理的花粉隔离效果; 用白乳胶花粉隔离法对22株君迁子进行无融合生殖特性鉴定, 确定其大范围应用的可行性。【结果】白乳胶能阻断其柱头与外来花粉的接触, 可以达到花粉隔离的目的, 且不会影响君迁子的子房发育; 应用白乳胶花粉隔离法在22株君迁子中鉴定出具备无融合生殖能力的单株12个, 其中高无融合生殖率单株2个。【结论】白乳胶花粉隔离法在君迁子无融合生殖鉴定方面有着极为突出的优势。

关键词: 君迁子; 白乳胶; 花粉隔离; 无融合生殖

中图分类号: S665.3

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2022)08-1503-08

Application of pollen isolation in apomixis germplasm identification of date plum (*Diospyros lotus*) by sealing stigma with white latex

ZHOU Yanfang¹, MAO Shulin¹, ZHOU Ruijin¹, ZHANG Xiaona¹, ZHANG Peng¹, HE Yiheng¹, HU Huiling^{1,2*}

(¹School of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan, China; ²Henan Province Engineering Research Center of Horticultural Plant Resource Utilization and Germplasm Enhancement, Xinxiang 453003, Henan, China)

Abstract: 【Objective】*Diospyros lotus* is an excellent persimmon rootstock widely used in North China. Some individual date plum plants do have apomixis characteristics which has great theoretical and practical significance for breeding. A research team of diospyros plants is working on the screening and utilization of apomixis germplasm and trying to improve work efficiency by exploring other possible pollen isolation methods to replace the traditional sulfuric acid paper bagging method. This study aimed to make a thorough inquiry into the effectiveness of white latex in pollen isolation and provide technical support for apomixis germplasm identification and in-depth analysis of apomixis reproductive characteristics of date plum. 【Methods】Flowers at large bud stage were selected from mature female plants and the corolla was removed carefully to expose the stigma of female flowers on a calm and sunny day. Three pollen isolation methods including sulfuric acid paper bag, nylon net bag and white latex stigma seal were used for pollen isolation, and normal artificial pollination was used as the control. The morphology of stigmas and quantity of pollens on them were observed under the fluorescence microscope, compared with the control: artificial pollination flowers. In addition, the apomictic ability of 22 individual date plum germplasms were identified by sealing stigma with white latex to test and verify the feasibility of large-scale or mass application. 【Results】The white latex did not affect the ovary development

收稿日期: 2021-11-23

接受日期: 2022-03-18

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(182102110050)

作者简介: 周艳芳, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为果树种质资源与遗传育种。Tel: 15993067568, E-mail: 1327870600@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13523220523, E-mail: hu-huiling@163.com

of date plum and succeeded in blocking the contact between stigma and pollinated pollen. By using this method called white latex pollen isolation, apomixis evaluation of 22 date plum plants was completed in one year just by one person. Under conventional artificial pollination, male xy-1 pollen could germinate normally on the stigma of female plant xx-10, and 2 h after pollination, many pollen tubes had germinated on the stigma; 3 h after pollination, the pollen tube reached the middle of the style; at 5 h, the pollen tube extended to the bottom of the style, and at 8 h, the pollen tube could be seen at the base of the ovary. After sealing the stigma with white latex, artificial pollination was performed at 1, 3, 5, 8, 12, 24, 48 and 72 h, respectively, and no pollen grains were observed on the tested stigma samples under a fluorescence microscope, indicating that white latex spot coating on stigmata was indeed completely effective in isolation of pollinated pollen. The results also showed that xx-8, xx-10, xx-20, xx-24, xx-29, xx-31 and xx-33 could not set fruit normally after pollen isolation. It was preliminarily determined that these individual plants did not have apomictic reproductive ability. Two individual plants of xx-13 and xx-15, after bagging, set fruit and did not produce seed, indicating that they did not have apomictic reproductive ability, but may have parthenogenetic bearing ability. The individual fruit of xx-18 date plum had seeds, but none of the seeds became seedlings in that year. Further evidence is needed to identify its apomixis reproductive ability. The remaining 12 date plums could produce viable seeds after pollen isolation, indicating that they had apomixis reproductive characteristics. Among them, xx-7 and xx-37 were highly apomixis reproductive plants, and more than 40 seeds could be obtained from 100 female flowers isolated. **【Conclusion】** In this study, the exact effect of white latex on pollen isolation of date plum was verified by fluorescence microscopic observation, and an efficient pollen isolation technology suitable for date plum was successfully established. The white latex is available and efficient in pollen isolation and apomixis germplasm identification of date plum and it can improve the identification efficiency of apomixis germplasm and provide technical support for in-depth analysis of apomictic characteristics of date plum. White latex has the characteristics of good film forming and fast curing speed, forming a protective film after air drying, and can completely and effectively isolate foreign pollens. Compared with the sulfuric acid paper bagging isolation method, there is no need for multiple bagging and bagging, saving a lot of labor and time. Compared with polyvinyl alcohol, white latex is a mature commodity, which is more common in the market and convenient to purchase with low cost. We can try to apply this method to other fruit crops to carry out relevant research.

Key words: *Diospyros lotus* L.; White latex; Pollen isolation; Apomixis reproduction

无融合生殖是植物不经过雌雄配子融合而繁衍后代的一种特殊生殖方式,因其产生的后代基因全部来自于母本,可获得遗传结构上与母本完全相同的子代,利用其作母本能够固定杂种优势,保持基因的杂合性,后代性状不发生分离,具有极其重要的理论研究和育种应用价值^[1-3]。果树遗传背景复杂,其重要经济性状在遗传上为多基因控制,常规的育种周期很长,无融合生殖在果树育种和生产上的价值就更为突出。近百年来很多学者都致力于探寻具备无融合生殖特性的果树类型及通过此途径改良果树育种的策略^[4-6]。

无融合生殖鉴定的关键技术环节是隔离外来

花粉,常规的方法是采用硫酸纸袋对雌花进行套袋隔离,如柑橘属及其近缘属、苹果属、胡桃属的无融合生殖研究^[7-8],但工作量大,操作费时。为了提高操作效率,有学者探讨其他可能的花粉隔离方法。董文轩等^[9]在苹果属植物中研究了切除柱头和部分花柱的方法,发现其不能完全阻断外来花粉;李迎超^[10]探讨了套袋、切柱头和聚乙烯醇封柱头3种隔离方式在核桃上的应用效果,提出聚乙烯醇封柱头是最为高效的隔离方式;葛朝红等^[11]在棉花自交研究上发现白乳胶点涂封闭花苞的方式可以实现花粉隔离。

君迁子(*Diospyros lotus* L.)又名黑枣、软枣,是

我国北方广泛应用的优良柿树砧木。近年来,随着柿树产业的高速发展和甜柿品种的更新换代,越来越多的学者开始关注君迁子的种质资源,研究其遗传多样性^[12-13],着力筛选特异性状种质,开展矮化^[14]、嫁接亲和性^[15]、抗逆境胁迫^[16]及离体再生^[17]等方面的研究。河南科技学院柿属植物研究团队在2015年发现了某些君迁子雌株在隔离花粉的情况下仍能产生具有生活力的种子,近年利用传统的硫酸纸套袋隔离花粉的方法对收集的资源进行了初步鉴定筛选,进一步确认了君迁子的很多单株确实具有无融合生殖特性^[18-19]。

在研究实践中发现,君迁子雌花花柄非常短,且密集地着生在枝条的基部,很难像其他果树进行单个花的套袋隔离,通常采用硫酸纸将整个枝条覆盖再用曲别针封套,不但费工费时、破坏邻近叶片,而且由于君迁子花期较其他果树偏晚、气温偏高常导致袋内落花焦叶现象严重。另外,在进行大规模的资源筛查或在山区野外开展无融合生殖种质鉴定研究时,这样的隔离操作效率极低,容易错过花期或遭到外来因素的干扰^[20]。基于以上认识,河南科技学院柿属植物研究团队近年着力于研发高效花粉隔离技术,经过前期摸索试验,发现白乳胶点涂柱头的方法操作简单,也有花粉隔离效果,但对其能否完全隔离花粉缺乏信心。笔者在本研究中拟利用荧光显微观察法探明白乳胶在君迁子花粉隔离中的确切效果,建立一种适于君迁子的高效花粉隔离技术,提高无融合生殖种质的鉴定效率,为深入解析君迁子无融合生殖特性提供技术支持。

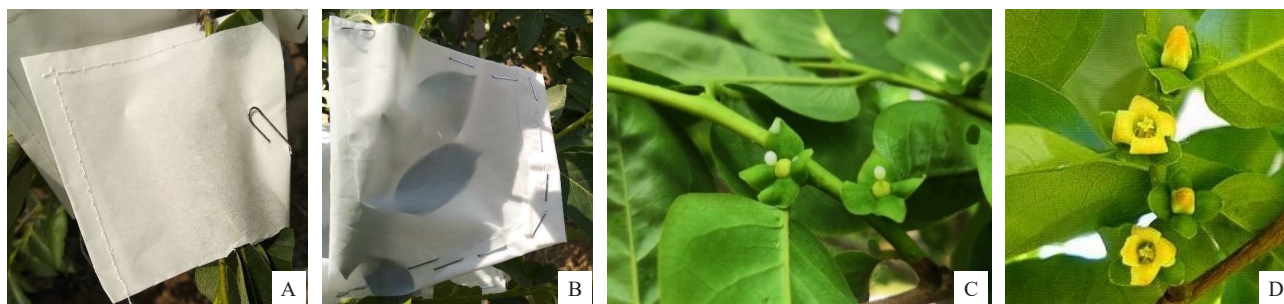
1 材料和方法

1.1 材料

试验材料来自河南科技学院柿属植物种质资源收集圃。选择生长健壮、花朵数量适宜、结实率较好且结实稳定的成龄君迁子进行研究,授粉树是通过多年花粉萌发试验选择的雄xy-1单株,其花瓣玫红色,花量大,花粉萌发率高,花期与供试雌株相遇。无融合生殖鉴定的22个雌株中除了7株(xx-2、xx-3、xx-4、xx-5、xx-7、xx-8、xx-10)分布在新乡市周边外,其余15株均来源于该资源圃。

1.2 方法

1.2.1 君迁子花粉隔离处理方法 2018年5月上旬,在雌花呈大花苞状态时,对选定单株xx-6进行花粉隔离处理。隔离处理方法包括硫酸纸套袋、尼龙网套袋和白乳胶封柱头,以自然授粉作为对照(图1)。(1)硫酸纸袋套袋隔离花粉法。先摘除已经开放的或发育过小的雌花,然后对单朵雌花进行单花套袋,也可对生长较为密集的多朵花一起套袋,用大头针或曲别针封口。(2)尼龙网套袋隔离花粉法。使用特定孔径(38 μm)的尼龙网套袋时,在套袋前先将尼龙网裁剪成合适的大小,折叠(折叠成口袋状,如图1-B)后利用订书机固定,先摘除已经开放的或发育过小的雌花,然后可对单朵雌花进行单花套袋,也可对生长较为密集的多朵花一起套袋,最后用大头针或曲别针封口。(3)白乳胶封柱头隔离花粉法。在多数雌花处于大花蕾期时,于无风晴天选择呈大花苞状态的雌花,小心去掉雌花花冠,露出雌花柱头,利用棉签蘸取适量白乳胶(得力牌,60 mL)涂抹君迁子柱头,以完全包裹柱头为宜。白乳胶用量为每朵单花0.5~1.0 mL。(4)自然授粉(CK)。随意选取花苞进行自然授粉,标为对照。每种处理完成后及时进行挂牌标记,标明处理方法、处理花苞数以及处



A. 硫酸纸袋套袋; B. 尼龙网套袋; C. 白乳胶封柱头; D. 自然授粉。

A. Sulfuric acid paper bag bagging; B. Nylon mesh bagging of date plum; C. White latex seals the stigma; D. Natural pollination of date plum.

图1 不同的君迁子花粉隔离方式

Fig. 1 Different pollen isolation methods of date plum

理时间。隔离处理 12 h 后进行取样并利用 FAA 固定液保存,每个处理取样不少于 30 个。本试验采用苯胺蓝染色法。利用 Nikon 的 ECLIPSE Ti 荧光显微镜,在 4× 镜下用 DAPI 光观察不同隔离处理下的隔离效果。

1.2.2 白乳胶隔离效果的荧光显微观察鉴定 2019 年 5 月上旬,利用白乳胶点涂的方法在雌株 xx-10 上处理超过 250 个花朵。对点涂白乳胶的单花分别在处理后 1、3、5、8、12、24、48、72 h,用提前收集的雄 xy-1 花粉进行人工授粉,并做好挂牌标记,每个时间点处理数量不少于 30 个,单花授粉 12 h 后切取完整幼果用 FAA 固定液固定,4 °C 冰箱中保存。在同一供试单株上以不涂白乳胶的正常人工授粉为对照,并于授粉后 72 h 内间断取样固定保存。采用苯胺蓝染色法,利用荧光显微镜(Nikon Ci-S)观察不同处理下君迁子柱头上的花粉萌发情况,分析判断白乳胶封柱头的隔离效果。

1.2.3 君迁子无融合生殖单株的鉴定 2020 年 5 月上中旬,对供鉴定的 22 株君迁子挂牌标记。在每个单株多数花处于大花蕾期时,摘除已开放的雌花,对余下的花进行白乳胶花粉隔离处理(单人完成 22 株树的全部处理),统计花量。10 月下旬待果实完全成熟后统计坐果数量、有种子的果实数量、果实中的

种子数量,计算坐果率、无融合生殖单果平均结种数、无融合生殖果实比率和百个隔离雌花获种数。

无融合生殖单果平均结种数=隔离处理果结种数量/隔离后有种子的果实数量;

无融合生殖果实比率/%=隔离处理后有种子的果实数量/隔离处理后坐果数量×100。

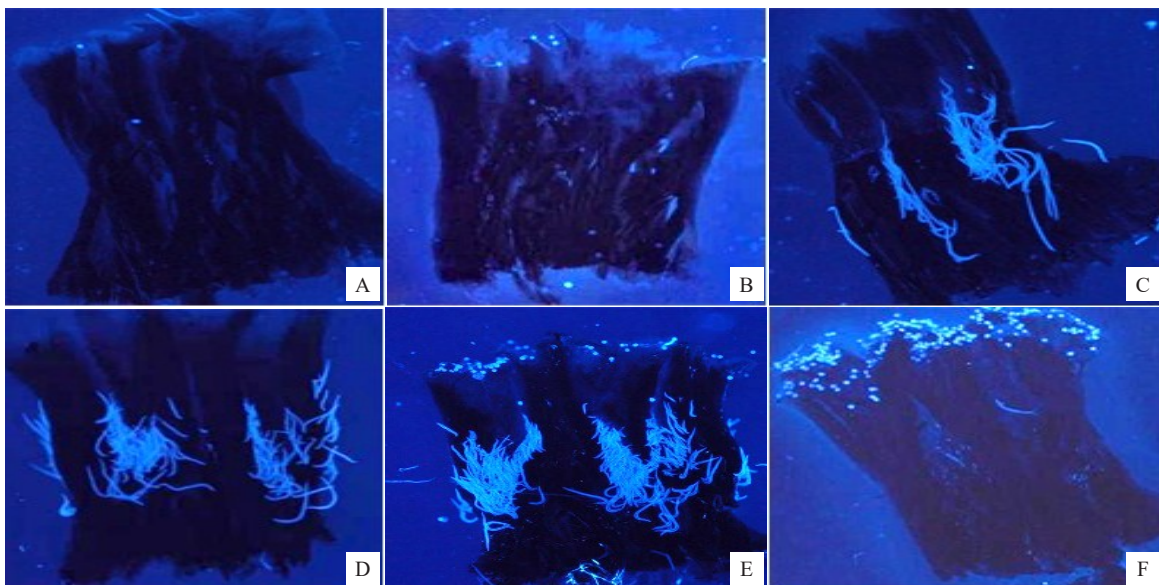
2 结果与分析

2.1 君迁子不同花粉隔离方法效果的荧光观察鉴定

利用荧光显微镜对不同花粉隔离处理下君迁子花粉管生长情况进行观察。如图 2 所示,硫酸纸袋封柱头(图 2-A)、尼龙网封柱头(图 2-D)、白乳胶封柱头(图 2-C)、以及自然授粉(图 2-F)4 种花粉隔离方法,每种隔离方法均能隔离君迁子花粉,但隔离效果存在差异,如图 2-B 和图 2-E 所示,在利用硫酸纸袋套袋和尼龙网进行套袋时,在部分柱头上依然能看到萌发的花粉,隔离成功率仅为 50.0% 和 54.5%,而白乳胶封柱头花粉隔离法的隔离成功率最高,为 83.3%。

2.2 君迁子不同花粉隔离操作的工作效率

君迁子不同花粉隔离处理下的工作效率也有较大差异。本试验的每个花粉隔离处理分别处理了



A-B. 硫酸纸袋套袋后的柱头表面; C. 白乳胶封柱头后的柱头表面; D-E. 尼龙网套袋后的柱头表面; F. 自然授粉后的柱头表面。

A-B. The surface of the stigma of a sulphuric acid paper bag; C. The surface of the stigma after the white latex seal; D-E. Stigma surface after nylon mesh bagging; F. Stigma surface after natural pollination.

图 2 君迁子不同花粉隔离方式的荧光观察鉴定

Fig. 2 Fluorescence observation and identification of different pollen isolation methods of date plum

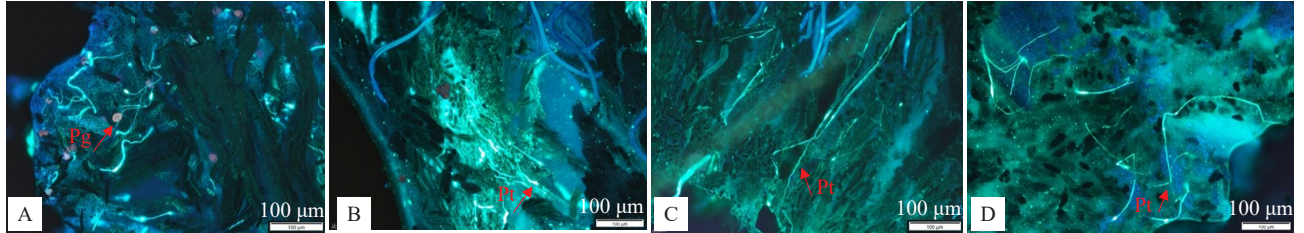
23个花苞,3次重复,利用硫酸纸袋套袋隔离花粉操作作用时,平均为10 min;尼龙网处理为18 min;白乳胶封柱头花粉隔离法平均用时为9 min。

2.3 常规人工授粉条件下君迁子花粉的萌发情况

常规人工授粉情况下,君迁子雄xy-1花粉在雌

株xx-10柱头上能正常萌发,授粉后2 h柱头上已经有大量的花粉管萌发出来;授粉3 h时花粉管已到达花柱的中部;5 h时有花粉管伸长至花柱底部,8 h时子房基部可以看到花粉管(图3)。

2.4 白乳胶对君迁子花粉的隔离效果



A. 2 h 柱头表面;B. 3 h 柱头中部;C. 5 h 柱头底部;D. 8 h 子房底部。Pg. 花粉粒;Pt. 花粉管。

A. 2 h stigma surface; 3 h middle of stigma; 5 h bottom of stigma; 8 h bottom of ovary. Pg. Pollen grain; Pt. Pollen tube.

图3 常规人工授粉条件下君迁子花粉的萌发进程

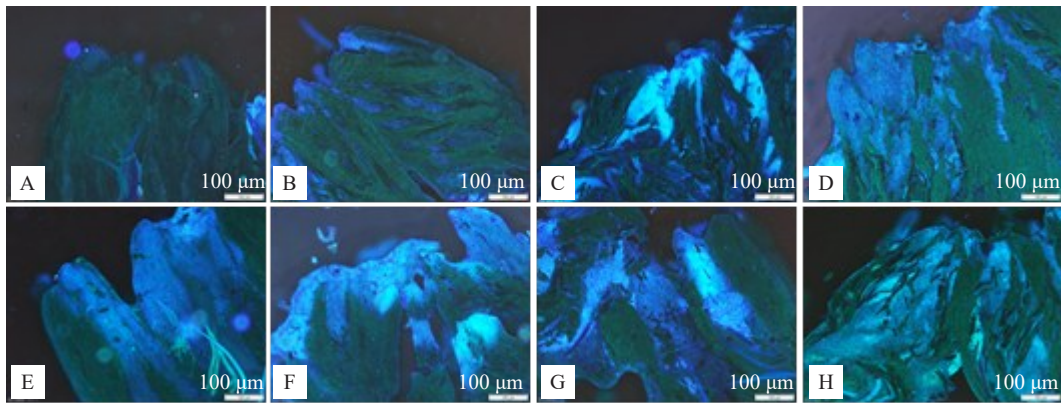
Fig. 3 Pollen germination process of date plum under artificial pollination

在君迁子雌花大蕾期,对柱头进行白乳胶点涂处理后间隔1、3、5、8、12、24、48、72 h人工授粉。在后期取样固定、压片过程中可以肉眼观察到点涂白乳胶形成的隔离膜,在荧光显微镜下发现供试的柱头样本上均未看到花粉粒的存在。表明白乳胶涂抹柱头确实完全有效隔离了点授的花粉(图4-A~H)。

2.5 白乳胶花粉隔离法在君迁子无融合生殖鉴定中的应用

花粉隔离处理后的坐果、结种情况是判断君迁子单株是否具备无融合生殖能力的第一步。

本文中无融合生殖率的计算参考闫弯弯^[18]所提出的计算方法,并结合连续多年的数据来确定指标的稳定范围。其中100个套袋果获得种子数>40粒无融合生殖能力高,20~40粒无融合生殖能力中等,<20粒为无融合生殖能力低。利用白乳胶花粉隔离法,对选定的22个君迁子雌株进行处理鉴定。结果表明,xx-8、xx-10、xx-20、xx-24、xx-29、xx-31、xx-33等7株君迁子隔离花粉后不能正常坐果,初步判定这些单株不具备无融合生殖能力;xx-13、xx-15 2个单株套袋后结实不结种,说明其也不具备无融合生殖能力,但可能具备单性



A~H. 君迁子点涂白乳胶后1、3、5、8、12、24、48、72 h授粉柱头样本上均未看到花粉粒。A. 1 h 柱头表面;B. 3 h 柱头表面;C. 5 h 柱头表面;D. 8 h 柱头表面;E. 12 h 柱头表面;F. 24 h 柱头表面;G. 48 h 柱头表面;H. 72 h 柱头表面。

A-H. No pollen grains were found on stigma pollinated in 1, 3, 5, 8, 12, 24, 48, 72 h, respectively after coated with white latex in date plum. A. 1 h surface of stigma; B. 3 h surface of stigma; C. 5 h surface of stigma; D. 8 h surface of stigma; E. 12 h surface of stigma; F. 24 h surface of stigma; G. 48 h surface of stigma; H. 72 h surface of stigma.

图4 白乳胶对君迁子花粉的隔离效果

Fig. 4 Isolation effect of white latex on stigma of date plum

结实能力;xx-18 君迁子单株果实有种子,但当年种子均未成苗,鉴定其无融合生殖能力还需要更多的证据。其余 12 个单株花粉隔离后均能产生

具有生活力的种子,说明具备无融合生殖特性,其中 xx-7、xx-37 为高无融合生殖单株,隔离百个雌花可获得超过 40 粒种子(表 1)。

表 1 白乳胶花粉隔离法鉴定 22 株君迁子雌株无融合生殖能力

Table 1 The apomictic ability of 22 individual date plum identified by pollen isolation method of sealing stigma with white latex

株号 No.	隔离花数 No. of isolated female flowers	坐果率 Fruit setting rate/%	出苗率 Emergence rate/%	无融合生殖果实比率 The ratio of apomixis fruits/%	隔离百朵雌花获种数 No. of seeds obtained from 100 isolated female flowers	无融合生殖单果平均结种数 No. of seeds per apomixis fruit
xx-7	119	68.1	87.5	16.0	41.4	3.8
xx-37	139	10.3	73.3	100.0	41.2	4.0
xx-5	168	28.0	45.5	27.7	27.7	3.6
xx-4	120	4.2	88.5	100.0	23.5	5.6
xx-14	179	4.5	81.1	87.5	20.3	5.2
xx-19	154	7.4	25.0	75.0	16.5	3.0
xx-28	159	11.9	50.0	28.6	13.6	4.0
xx-3	115	21.7	100.0	12.0	12.2	4.7
xx-17	165	1.5	100.0	100.0	9.0	6.0
xx-11	104	4.8	88.9	60.0	8.7	3.0
xx-16	190	13.3	85.7	16.7	7.7	3.5
xx-2	139	1.4	66.7	100.0	6.3	4.5
xx-18	156	2.6	0.0	50.0	2.6	2.0
xx-13	106	8.5	0.0	0.0	0.0	0.0
xx-15	109	22.9	0.0	0.0	0.0	0.0
xx-8	204	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
xx-10	146	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
xx-20	117	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
xx-24	144	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
xx-29	132	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
xx-31	134	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
xx-33	129	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

3 讨 论

3.1 不同花粉隔离方式操作的工作效率存在差异

君迁子不同花粉隔离处理下的工作效率也有较大差异。笔者研究了尼龙网套袋、硫酸纸袋套袋和白乳胶封柱头 3 种不同的花粉隔离方式的工作效率,试验结果表明,用尼龙网套袋隔离时操作复杂,用时最长,其次为硫酸纸袋套袋,而在利用白乳胶封柱头花粉隔离法进行花粉隔离时操作相对简单,用时较短。其中工作效率还和处理时花朵是否集中在一起有关,在花朵集中的前提下,硫酸纸袋套袋和尼龙网可以 1 个袋子套多朵花,操作时间会相应缩短,但 1 个袋内套多个花往往易造成严重的落花现象,影响君迁子正常的生长发育,故从整体实际操作上来讲,采

用白乳胶封柱头的方法隔离君迁子花粉更为简单。

3.2 不同花粉隔离操作的便捷性与有效性

植物的花性特征和花器构造各有特点,可能极为相似,也可能极为不同,因而用于育种研究的高效花粉隔离方式也可能会有差别。李迎超^[10]在核桃无融合生殖研究中提出,聚乙烯醇封柱头可代替套袋进行花粉隔离。笔者在前期亦曾使用聚乙烯醇进行花粉隔离,但发现其黏性较强,点涂时因君迁子柱头小,易导致操作污染幼果,且聚乙烯醇使用时需要提前熬制,过程较为繁琐。白乳胶的重要成分之一为聚乙烯醇^[21],葛朝红等^[11]在用白乳胶点涂研究棉花不同品系间自交的成铃率时认为,白乳胶可以实现花粉隔离,但操作较为费工。本研究表明,白乳胶具有成膜性好、固化速度快等特点,在风干后形成保护

膜,能完全有效隔离外来花粉,且不影响果实的子房发育。与硫酸纸袋套袋隔离方法相比,无需多次套袋、取袋,省工省时,相较聚乙烯醇而言,白乳胶为成熟的商品,在市场上比较常见,购买方便且成本低廉,可以尝试在其他果树上应用该方法开展相关研究。

3.3 白乳胶花粉隔离法在无融合生殖鉴定中的应用

无融合生殖育种的关键环节就是确定该植物是否具备无融合生殖特性。在果树生产中,常规的鉴定方法就是利用套袋进行花粉隔离,使用较多的是硫酸纸袋套袋和尼龙网套袋等。本试验最先也是采用传统套袋的方式对资源圃中无融合生殖单株进行鉴定和筛选,使用了硫酸纸袋套袋和尼龙网套袋的方法隔离君迁子花粉,对君迁子种子资源进行筛选和鉴定,但是套袋导致君迁子出现了严重的落花现象,限制了后期育种工作的进程,所以笔者在本试验中开始探索新的花粉隔离方式。在核桃等其他果树无融合生殖研究的启发下,笔者在第二年增加了聚乙烯醇胶封柱头、白乳胶封柱头等的花粉隔离方法,并结合荧光显微镜观察隔离后君迁子的柱头上的花粉萌发情况,最终筛选出白乳胶封柱头花粉隔离法是最适合君迁子在无融合生殖研究中使用的花粉隔离方式。利用白乳胶封柱头花粉隔离法不仅可以避免套袋导致的落花现象,而且还节省人力物力,省工省时,可明显提高君迁子无融合生殖种质的鉴定效率,为君迁子无融合生殖高效育种提供技术支持。

4 结 论

白乳胶花粉隔离法是一种适于君迁子的高效花粉隔离技术,可以明显提高无融合生殖种质的鉴定效率,能够为深入解析君迁子无融合生殖特性提供可靠的技术支持。

参考文献 References:

- [1] KOLTUNOW A M, BICKNELL R A, CHAUDHURY A M. Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization[J]. *Plant Physiology*, 1995, 108(4):1345-1352.
- [2] VIELLE-CALZADA J. P, NUCCIO M L, BUDIMAN M A, THOMAS T L, WING R A. Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of *Pennisetum ciliare* (L.) Link[J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 32(6): 1085-1092.
- [3] GROSSNIKLAUS U, KOLTUNOW A, CAMPAGNE L. A bright future for apomixis[J]. *Trends Plant Science*, 1998, 3(11): 415-416.
- [4] 宁万军, 廖康, 王国安, 张强, 赵世荣, 曼苏尔·那斯尔, 邱晨. ‘新新 2’和‘温 185’核桃无融合生殖的解剖学研究[J]. *果树学报*, 2014, 31(4): 632-635.
NING Wanjun, LIAO Kang, WANG Guoan, ZHANG Qiang, ZHAO Shirong, Mansur·Nasir, QIU Chen. Anatomy of apomixis in ‘Xinxin 2’ and ‘Wen 185’ walnut[J]. *Journal of Fruit Science*, 2014, 31(4): 632-635.
- [5] 张智英. 早实核桃生殖特性及胚培养条件研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
ZHANG Zhiying. Study on procreate characteristic and conditions of embryo cultivate in early-bearing walnut[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2009.
- [6] 马荣群, 黄粤, 沙广利, 石琰璟, 李佳, 宫象晖, 李梅. 无融合生殖苹果砧木 F₁ 代实生苗的流式细胞术倍性分析及 SSR 鉴定[J]. *果树学报*, 2012, 29(3): 461-465.
MA Rongqun, HUANG Yue, SHA Guangli, SHI Yanjing, LI Jia, GONG Xianghui, LI Mei. Identifying hybrids of apomictic apple rootstocks with SSR and flow cytometry[J]. *Journal of Fruit Science*, 2012, 29(3): 461-465.
- [7] 杜蕊, 李保国, 顾玉红, 李迎超, 魏常燕, 崔硕, 回彦哲. 不同处理对‘绿岭’核桃无融合生殖坐果的影响[J]. *河北农业大学学报*, 2010, 33(6): 95-98.
DU Rui, LI Baoguo, GU Yuhong, LI Yingchao, WEI Changyan, CUI Shuo, HUI Yanzhe. Effect of different methods on fruit setting percentage in apomixes of ‘Lü Ling’ walnut[J]. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2010, 33(6): 95-98.
- [8] 周志钦, 李育农. 苹果属植物无融合生殖研究进展: 文献综述[J]. *园艺学报*, 1995, 22(4): 341-347.
ZHOU Zhiqin, LI Yunong. Studies on the apomixis in *Malus* Mill.: A literature review[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1995, 22(4): 341-347.
- [9] 董文轩, 计永胜, 赵晓东, 卢丹阳, 曾广娟. 苹果属皱叶矮生型株系切柱头处理后代的生长特性和倍性鉴定[J]. *贵州农业科学*, 2010, 38(3): 151-153.
DONG Wenxuan, JI Yongsheng, ZHAO Xiaodong, LU Danyang, ZENG Guangjuan. Growth characteristic and ploidy identification of seedlings derived from a dwarf line with curled leaves of *Malus* by cutting its stigma before flowering stage[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2010, 38(3): 151-153.
- [10] 李迎超. 早实薄皮核桃‘绿岭’的无融合生殖特性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
LI Yingchao. Studies on the apomixis property of early bearing and pellicle walnut ‘Lü Ling’ [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2010.
- [11] 葛树红, 师树新, 周永萍, 赵海龙, 刘彦霞. 不同自交方法对棉花成铃率的影响[J]. *中国种业*, 2017(1): 57-58.
GE Chaohong, SHI Shuxin, ZHOU Yongping, ZHAO Hailong, LIU Yanxia. Effects of different self-crossing methods on boll formation rate of cotton[J]. *China Seed Industry*, 2017(1): 57-58.

- [12] 张庆丽. 君迁子的遗传多样性和 SSR-PCR 分子标记分析[D]. 新乡:河南科技学院,2016.
ZAHNG Qingli. Studies on genetic diversity and SSR-PCR optimization of date plum persimmon (*Diospyros lotus*)[D]. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, 2016.
- [13] 杨婷婷,于泽群,夏乐晗,杨勇,王仁梓. 君迁子(*Diospyros lotus*)种质资源形态学性状的聚类分析[J]. 果树学报,2014,31(4):566-573.
YANG Tingting, YU Zequn, XIA Yuehan, YANG Yong, WANG Renzi. Cluster analysis based on morphological traits of date plum (*Diospyros lotus*) germplasm resources[J]. Journal of Fruit Science, 2014, 31(4): 566-573.
- [14] 申妍颖,李雪涵,李飞鸿,渠慎春. 中间砧‘南通小方柿’嫁接柿转录组测序及分析[J]. 分子植物育种,2019,17(5):1454-1466.
SHEN Yanying, LI Xuehan, LI Feihong, QU Shenchun. Transcriptome sequencing and analysis of grafted persimmon with ‘Nantongxiaofangshi’ as the interstock[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(5): 1454-1466.
- [15] 胡梦瑀. 柿嫁接亲和性早期鉴定及其砧木筛选[D]. 武汉:华中农业大学,2015.
HU Mengjue. Early identification of graft compatibility and rootstocks selection in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015.
- [16] 魏平. 柿砧木耐盐抗旱及嫁接亲和性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2017.
WEI Ping. Studies on salt and drought resistance and graft compatibility of persimmon rootstocks (*Diospyros kaki*) [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2017.
- [17] 李晶,罗玉洁,张青林,罗正荣,刘继红. 君迁子休眠芽及叶片离体培养体系优化及植株再生[J]. 华中农业大学学报,2016,35(4):14-19.
LI Jing, LUO Yujie, ZHANG Qinglin, LUO Zhengrong, LIU Jihong. *In vitro* culture system optimization and regeneration of date plum (*Diospyros lotus* Linn.) dormant buds and leavaes[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2016, 35(4): 14-19.
- [18] 闫弯弯. 君迁子无融合生殖特性及胚囊发育进程[D]. 新乡:河南科技学院,2018.
YAN Wanwan. Embryo sac development and characteristics of apomixis in date plum persimmon (*Diospyros lotus*) [D]. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, 2018.
- [19] 杨婷婷. 君迁子遗传多样性及结实类型的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.
YANG Tingting. Study on genetic diversity and reproduction type of date plum persimmon (*Diospyros lotus*) [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2014.
- [20] 郑瑞杰,刘振盼,郑金利,邵屹. 栗属植物花粉形态及授粉隔离袋的选择[J]. 黑龙江农业科学,2018(2):72-75.
ZHENG Ruijie, LIU Zhenpan, ZHENG Jinli, SHAO Yi. Pollen morphology of *Castanea* plants and selection of pollination bag[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2018(2): 72-75.
- [21] 王凤英,孙道兴,申欣. 影响白乳胶稳定性的因素[J]. 上海涂料,2007,45(4):12-14.
WANG Fengying, SUN Daoxing, SHEN Xin. Factors affecting the stability of white latex[J]. Shanghai Coatings, 2007, 45(4): 12-14.