

沃柑混倍体新种质的鉴定及评价¹

赵洪涛¹, 陆珍^{1#}, 李果果¹, 解凯东², 郑吉祥³, 梁增⁴, 刘要鑫¹, 欧智涛¹, 梁春⁴,
王举兵³, 周双云¹, 陈东奎^{1*}, 陈香玲^{1*}

(¹广西壮族自治区农业科学院园艺研究所, 南宁 530007; ²华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070;
³广西壮族自治区水果技术指导站, 南宁 530022; ⁴广西桂洁农业开发有限公司, 南宁 530041)

摘要:【目的】鉴定和评价沃柑变异材料, 为其利用提供依据。【方法】采用流式细胞仪、石蜡切片和扫描电镜方法进行倍性和叶片显微结构鉴定, 比较形态特征和果实品质。【结果】变异材料为二、四混倍体(2x+4x), 倍性细胞比例为2x:4x=39.1:60.9; 混倍体在叶片长、宽、周长和面积上比二倍体增加14.75%、31.01%、19.38%和46.09%, 叶形指数减小12.61%; 两者均为两性花, 花瓣数、花瓣颜色、花丝离合状态和花柱状态相同, 花瓣长度和宽度均显著大于二倍体; 种子均为单胚类型, 粒质量、横径和纵径上较二倍体增加30.77%、8.12%和26.64%; 单果质量、纵径、横径、果形指数、果皮厚度和果实硬度分别比二倍体增加29.67%、13.38%、8.57%、3.85%、38.31%和16.37%, 单果种子数减少61.68%; 可溶性固形物和可滴定酸含量无显著差异, 可食率显著降低, 出汁率高, 维生素C含量增加39.70%; 叶片、上表皮、下表皮、栅栏组织和海绵组织厚度较二倍体增加19.75%、4.15%、10.10%、9.38%和43.92%, 气孔长度和密度分别减小7.36%和15.76%, 气孔宽度增加5.09%。【结论】本研究鉴定获得了沃柑二、四混倍体新种质, 与二倍体在形态特征、果实品质及叶片显微结构等方面存在较大差异。

关键词: 沃柑; 二倍体; 混倍体; 形态特征; 果实品质; 显微结构

中图分类号: S666.1 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2024)08-0001-08

Identification and Evaluation of New Mixoploid Variants in *Citrus Reticulata* Blanco 'Orah'

ZHAO Hongtao¹, LU Zhen^{1#}, LI Guoguo¹, XIE Kaidong², ZHENG Jixiang³, LIANG Zeng⁴, LIU Yaixin¹, OU Zhitao¹, LIANG Chun⁴, WANG Jubing³, ZHOU Shuangyun¹, CHEN Dongkui^{1*},
CHEN Xiangling^{1*}

(¹Institute of Horticultural, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China; ²College of Horticulture and Forestry Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ³Fruit Technology Guidance Station of Guangxi Zhuang

收稿日期: 2024-03-20 接受日期: 2024-05-07

基金项目: 广西重点研发计划(桂科AB23026033); 广西农业科学院基本科研业务专项(桂农科2023YM71); 南宁市科技重大专项(20212140); 广西柑橘创新团队桂南综合试验站(nycytxgxcxtd-2021-05-06); 国家现代农业产业技术体系桂中南柑橘综合试验站(CARS-26)

作者简介: 赵洪涛, 男, 副研究员, 研究方向: 柑橘育种与栽培。Tel: 13667881656, E-mail: zhaohongtao211@163.com。#为共同第一作者。陆珍, 女, 研究实习员, 研究方向: 柑橘育种与生理。Tel: 18154580972, E-mail: 229534175@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13807712630, E-mail: 2949956548@qq.com; Tel: 13977188070, E-mail: 729741120@qq.com

Autonomous Region, Nanning 530022, Guangxi, China; ⁴Guangxi Gui Jie Agricultural Development Co., Ltd. Nanning 530041, Guangxi, China)

Abstract: 【Objective】 Orah is an important late-maturing citrus variety. Previously, putative polyploid bud mutation materials were discovered in Orah. In this study, the material was identified and evaluated in terms of ploidy, morphological characteristics, fruit quality, and leaf microstructure to provide a theoretical basis for its utilization. **【Methods】** Flow cytometry was used for ploidy identification, paraffin sections were used for leaf microstructure identification, scanning electron microscopy was used for stomatal morphology, size, and density identification, morphological characteristics of leaves, flowers, seeds, and fruits were compared, and conventional methods were used to determine fruit quality parameters such as soluble solids content, titratable acid content, vitamin C content, edible rate, and juice yield. **【Results】** The results showed that Orah was diploid, while the variant material was a mixoploid of diploid and tetraploid (2x+4x), with a cell ratio of 2x:4x = 39.1:60.9. There were differences in leaf morphology between the mixoploid and diploid. The mixoploid leaves were ovate with short acuminate tips and dark green color, while the diploid leaves were broad-lanceolate with gradually acuminate tips. The length, width, perimeter, and area of the mixoploid leaves were 101.68 mm, 54.29 mm, 266.02 mm, and 3598.92 mm², respectively, which were 14.75%, 31.01%, 19.38%, and 46.09% higher than those of the diploid, respectively. The leaf shape index was 1.87, which was 12.61% lower. Both were bisexual flowers with similar petal numbers, petal colors, filament cohesion states, and style states. The petal length and width of the mixoploid were 14.48 mm and 8.22 mm, respectively, which were significantly larger than those of the diploid, increasing by 34.32% and 49.18%, respectively. The seeds were both monoembryonic, and the mixoploid had higher seed weight, transverse diameter, and longitudinal diameter than the diploid, increasing by 30.77%, 8.12%, and 26.64%, respectively. The single fruit weight of the mixoploid was 206.16 g, the fruit longitudinal diameter was 63.37 mm, the transverse diameter was 77.90 mm, the fruit shape index was 0.81, the peel thickness was 4.26 mm, and the fruit firmness was 6.47 kg.cm², which were 29.67%, 13.38%, 8.57%, 3.85%, 38.31%, and 16.37% higher than those of the diploid, respectively. However, the number of seeds per fruit was 8.2, which was 61.68% lower than that of the diploid. There were no significant differences in soluble solids content (15.10%) and titratable acid content (0.58%) between the mixoploid and diploid. The edible rate decreased by 8.09%, the juice yield increased by 4.34%, and the vitamin C content increased by 39.70%. The cellular arrangement of the transverse section tissue structure of the mixoploid leaves was basically the same as that of the diploid. The thicknesses of the leaf, upper epidermis, lower epidermis, palisade tissue, and spongy tissue were 310.96 μm, 12.26 μm, 72.89 μm, and 227.94 μm, respectively, which were 19.75%, 4.15%, 10.10%, 9.38%, and 43.92% higher than those of the diploid, respectively. The stomatal length and density were 7.35 μm and 520.40/mm², respectively, which were 7.36% and 15.76% lower, respectively. The stomatal width was 3.33 μm, which was 5.09% higher. **【Conclusion】** In this study, a new mixoploid germplasm of Orah with diploid and tetraploid was identified. There were significant differences

between the mixoploid and diploid in leaf, flower, seed, fruit morphology, fruit quality, and leaf microstructure. Overall, the mixoploid showed larger and thicker leaves, increased petal length and width, increased seed weight, transverse and longitudinal diameters, but reduced number of seeds per fruit. The thicknesses of the leaf, upper and lower epidermis, palisade tissue, and spongy tissue were increased, while the stomatal length and density were decreased and the stomatal width was increased. Additionally, there were increases in single fruit weight, fruit transverse and longitudinal diameters, and vitamin C content. This mixoploid can be used as a new type of single-embryo type of small-nucleus large-fruit Wugang, and can also be further used as a new germplasm resource for breeding work.

Keywords: Orah; Diploid; Mixed ploidy; Morphological characteristics; Fruit quality; Microstructure

沃柑 (*Citrus Reticulata* Blanco ‘Orah’) 为单胚性的二倍体品种^[1], 具有树势强、早结丰产、晚熟、品质优良、外观漂亮等优点。该品种于 2012 年首次引种到广西南宁种植, 因其优异的表现而成为当前我国发展速度最快、种植面积最广、影响力最大的晚熟柑橘品种, 截止 2022 年全国沃柑种植面积已超过 20 万 hm^2 。但沃柑在生产上的主要问题是果实种子较多, 平均单果种子数约 18.9 粒^[2], 严重影响其食用性和商品性, 且沃柑对溃疡病敏感, 该病已然成为沃柑种植中最严重的病害^[3]。

混倍体 (Mixed ploidy) 是在同一生物组织中有二倍性与非二倍性组织混存的现象^[4]。在果树中, 混倍体可自然发生, 也可以通过嫁接、基因突变、转座子作用、原生质体培养、转基因等获得^[5]。混倍体植株由于具有更多的染色体组, 相关基因表达量得到提升, 其性状也会因此发生变化, 往往表现为根、茎、叶、花、果的巨型性, 具有果实增大、种子数减、品质改良、抗逆性增强等优势。刘颖等^[6]从冬枣中发现 3 个二、四混倍体 ($2x+4x$) 大果型变异材料, 表现出叶片变宽、叶形指数变小, 果实变大, 果实维生素 C 含量增加等特性; 人工诱导的混倍体桑树鲁诱 1 号细胞染色体以四倍体为主, 混有少量的二倍体, 表现出嵌合体效应, 既有四倍体叶质优、叶片大、叶肉厚的特点, 又有二倍体母本生长旺盛的优点^[7]; 陈立松等^[8]首次报道了一个稳定遗传的椪柑突变体“桂林良丰”, 是四倍体与二倍体两种倍性的混倍体, 表现出果皮增厚、果实增大、叶片变厚、气孔密度减少等性状^[9]; 二倍体和四倍体的嵌合体品种脆蜜金柑表现出大果、高糖、无核、品质极优等特点^[10], 已经成为广西金桔主栽品种。

近年来, 柑橘倍性育种及研究取得了较大进展, 尤其是大量同源、异源多倍体的筛选和创制, 为柑橘新品种选育和基础研究提供了丰富的材料, 然而, 单胚类型的柑橘多倍体仍然较少^[11]。本团队前期从沃柑中挖掘到一株沃柑芽变材料, 为进一步确定和利用该种质, 本研究对其倍性进一步进行鉴定, 并系统比较其与沃柑在叶片、花、种子、果等器官的表型、果实品质及叶片显微结构的差异, 为未来更好地开发利用该多倍体新种质提供数据基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

2017年在广西百色市平果县沃柑果园中发现1株沃柑芽变材料,该材料树势强健,叶片卵圆形、大、厚而浓绿,果实大,种子较少。当天剪取芽变接穗进行嫁接扩繁,同时嫁接对照品种沃柑,砧木均为香橙,成活后种植在广西南宁市武鸣区广西农业科学院里建科学研究中心基地内,2020年开花结果,于2022年选择该材料及对照品种沃柑开展评价。

1.2 测定方法

1.2.1 倍性鉴定

参照解凯东等^[12]的方法进行。

1.2.2 形态特征比较

参照《柑橘种质资源数据质量控制规范》进行,比较叶片、花、种子、果实主要形态特征,利用万深多功能植物图像分析仪 LA-S 扫描测量叶片的长度、宽度、周长、面积等指标,计算叶形指数,叶形指数=叶片长/叶片宽;用托普云农 GY-4 硬度计测定果实硬度。叶片、花、种子、果实每10个为1个生物学重复,每个测定指标3次重复。

1.2.3 果实品质测定

果实成熟期,取树冠外围中部生长大小、均匀一致、有代表性的成熟果实,采用日本 ATAGO 公司的 PAL-1 便携式数显折光仪测定可溶性固形物,酸碱滴定法测定果汁可滴定酸含量,2,6-二氯酚法测定果汁维生素 C 含量,计算可食率、出汁率,每10个果实为1个生物学重复,每个测定指标3次重复。

1.2.4 叶片解剖结构观测

采用石蜡切片观察叶片解剖结构:摘取待测叶片,将叶片避开叶脉切成 0.5 cm² 小块状,用 FAA 固定液(福尔马林 5 mL+乙酸 5 mL+70%乙醇 90 mL)固定样品1周,脱水,透明后石蜡包埋,切片,脱蜡,复水。显微镜镜检合格后使用 Eclipse Ci-L 拍照显微镜(Nikon,日本)选取组织的目的区域进行200倍成像。成像完成后使用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件,以 um 作为标准单位,测量叶片厚度、上表皮厚度、下表皮厚度、栅栏组织厚度、海绵组织厚度。

叶片气孔特征和密度观测:利用扫描电镜进行叶片表皮气孔特征观察。选取同一节位处的叶片,将其切成 0.5 cm² 小块状,用 2.5%戊二醇固定,后经脱水、干燥,再进行导电处理,最后用 SU8100 扫描电子显微镜(Hitachi,日本)观察叶片下表皮的的气孔形态特征,应用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量计算气孔长度、宽度以及气孔密度(个·mm⁻²)。

1.3 数据统计分析

采用 Excel 2016 处理试验数据,使用 DPS 20.0 版本以 Duncan 新复极差法进行指标间的

差异性测验。

2 结果与分析

2.1 倍性分析

以二倍体“沃柑”为对照，沃柑在荧光强度 100 处只有 1 个二倍体主峰（图 1-A），而沃柑少核大果型芽变材料有 2 个主峰，峰位置分别在荧光强度 100 和 200 处，且第 2 个峰强度为第 1 个峰强度的 2 倍，为四倍体峰，说明其为二、四混倍体，而且以 4x 细胞占优势（图 1-B），其中 2x 细胞数 1199 个，占比 39.1%，4x 细胞数量 1867 个，4x 细胞占 60.9%。

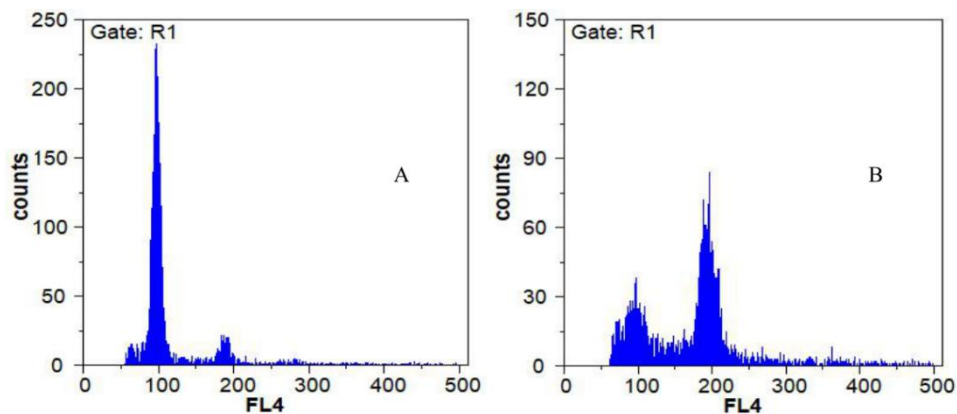


图 1 流式细胞仪检测沃柑及其芽变材料倍性

Fig. 1 Flow cytometry detection of ploidy in Orah and its bud mutation material

2.2 形态特征比较

2.2.1 叶片形态特征比较

叶片形状如图 2，混倍体沃柑叶片为卵圆形，叶尖短尖，叶片颜色也更加浓绿，二倍体沃柑叶片为阔披针形，叶尖渐尖。混倍体沃柑的叶片长度为 101.68 mm、宽度 54.29 mm、周长 266.02 mm 及叶片面积为 3 598.92 mm²，与二倍体沃柑相比分别增加 14.75%、31.01%、19.38%及 46.09%，差异显著，而叶形指数为 1.87，与二倍体沃柑相比减少 12.61%（表 1）。可见随着倍性的增加，叶片表现变长、变宽，叶形指数变小。



图 2 混倍体及二倍体叶片形态
Fig. 2 Morphology of mixed ploidy and diploid leaves

表 1 混倍体及二倍体叶片指标比较
Table 1 Comparison of leaf indices between mixedploidy and diploid

材料 Material	叶片长 Leaf length/mm	叶片宽 Leaf width/mm	叶形指数 Leaf index	叶片周长 Leaf circumference/mm	叶片面积 Leaf area/mm ²
混倍体 Mixed ploidy	101.68 ± 8.81 a	54.29 ± 4.22 a	1.87 ± 0.15 b	266.02 ± 19.17 a	3598.92 ± 528.33 a
二倍体 Diploid	88.61 ± 5.66 b	41.44 ± 3.72 b	2.14 ± 0.02 a	222.83 ± 12.73 b	2463.48 ± 297.51 b
增加率/% Increment rate	14.75	31.01	-12.61	19.38	46.09

2.2.2 花性状分析

混倍体和二倍体沃柑的花均为两性花，其花瓣数、花瓣颜色、雄蕊数、花丝离合状态以及花柱状态均相同（图 3），混倍体沃柑花瓣长度为 14.48 mm，宽度为 8.22 mm，均显著大于二倍体沃柑，分别增加 34.32%和 49.18%（表 2），混倍体沃柑表现出花朵较大的特性。



图 3 混倍体及二倍体沃柑花形态

Fig. 3 Morphology of mixedploidy and diploidflowers

表 2 混倍体及二倍体沃柑花指标比较
Table 2 Comparison of flower indices between mixedploidy and diploid

材料 Material	花性 Flower sex	花瓣颜色 Petal color	花丝离合状 态 Filament clutch state	花柱状 态 Style state	花瓣数 Petal number	花瓣长 Petal length/mm	花瓣宽 Petal width/mm	雄蕊数 Stamen number
混倍体 Mixed ploidy	两性花 Bisexual flowers	白色 White	分离 Separation	直立 Erect	5	14.48 ± 0.18 a	8.22 ± 0.08 a	18.43 ± 0.98 a
二倍体 Diploid	两性花 Bisexual flowers	白色 White	分离 Separation	直立 Erect	5	10.78 ± 0.10 b	5.51 ± 0.05 b	18.29 ± 1.11 a
增加率/% Increment rate	-	-	-	-	0	34.32	49.18	0.77

2.2.3 种子性状

混倍体和二倍体沃柑的种子棒形或卵圆形,均为单胚(图4),混倍体的种子粒质量0.17g、横径6.39 mm、纵径14.64 mm,均显著大于二倍体,分别比二倍体的增加30.77%、8.12%和26.64%(表3),可以看出混倍体种子数减少但种子变大。



图 4 混倍体及二倍体沃柑种子形态
Fig. 4 Morphology of mixedploidy and diploidseeds

表 3 混倍体及二倍体沃柑种子指标
Table 3 Indices of mixedploidy and diploidseeds

材料 Material	单粒质量 Single grain mass/g	种子横径 Seed transverse diameter/mm	种子纵径 Seed longitudinal diameter/mm	胚类型 Embryo type
混倍体 Mixed ploidy	0.17 ± 0.03 a	6.39 ± 0.75 a	14.64 ± 1.85 a	单胚 Monoembryony
二倍体 Diploid	0.13 ± 0.02 b	5.91 ± 0.47 b	11.56 ± 0.81 b	单胚 Monoembryony
增加率/% Increment rate	30.77	8.12	26.64	-

2.2.4 果实形态比较

如图 5 所示，混倍体沃柑及二倍体沃柑均表现为果皮橙红色，果肉橙黄色，混倍体果实表面光滑度较二倍体稍差，混倍体单果质量 206.16 g，果实纵径 63.37 mm，横径 77.90 mm，果形指数 0.81，果皮厚度 4.26 mm，果实硬度 6.47 kg·cm²，单果种子数 8.2 粒。混倍体的单果质量、果实纵径、果实横径、果形指数、果皮厚度、果实硬度指标均显著大于二倍体，分别增加 29.67%、13.38%、8.57%、3.85%、38.31%和 16.37%，而单果种子数显著减少，减少率高达 61.68%（表 4），可以看出混倍体果实较二倍体显著增大，形状变圆，果皮变厚，果实变硬，种子数变少。

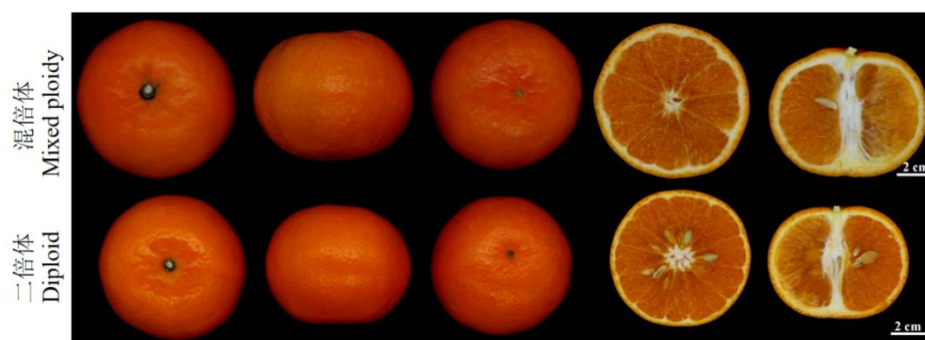


图 5 混倍体及二倍体沃柑果实形态

Fig. 5 Morphology of mixed ploidy and diploid fruits

表 4 混倍体及二倍体沃柑果实指标

Table 4 Indices of mixed ploidy and diploid fruits

材料 Material	单果质量 Single fruit mass/g	果实纵径 Fruit longitudinal diameter/mm	果实横径 Fruit transverse diameter/mm	果形指数 Fruit shape index	果皮厚度 Pericarp thickness/m	果实硬度 Fruit peel hardness/ (kg·cm ⁻²)	单果种子数 量/粒 seed number/Grain
混倍体 Mixed ploidy	206.16 ± 11.00 a	63.37 ± 2.10 a	77.90 ± 1.96 a	0.81±0.02a	4.26 ± 0.79 a	6.47 ± 1.08 a	8.2 ± 2.7 b
二倍体 Diploid	158.99 ± 9.01 b	55.89 ± 1.47 b	71.75 ± 1.41 b	0.78±0.01b	3.08 ± 0.35 b	5.56 ± 0.53 b	21.4 ± 4.2 a
增加率/% Increment rate	29.67	13.38	8.57	3.85	38.31	16.37	-61.68

2.3 果实品质分析

由表 5 可知，混倍体沃柑可溶性固形物含量为 15.10%，可滴定酸含量为 0.58%，与二倍体沃柑相比无明显差异，可食率为 69.94%，与二倍体相比显著降低，减少 8.09%，这可能与有较厚的果皮有关；混倍体沃柑出汁率高，表现出水分更足，但与二倍体沃柑差异不显著；维生素 C 含量显著提高，达到 23.12 mg·100 mL⁻¹，显著高于二倍体沃柑的 16.55 mg·100 mL⁻¹，增加率高达 39.70%，部分营养更加丰富。

表 5 混倍体及二倍体沃柑果实营养品质指标

Table 5 Nutritional quality indices of mixed ploidy and diploid fruits

材料 Material	可溶性固形物含量 Soluble solid content/%	可滴定酸含量 Titratable acid content/%	可食率 Flesh recovery/%	出汁率 Fruit juice content/%	维生素 C 含量 Vitamin C content/ (mg·100 mL ⁻¹)
混倍体 Mixed ploidy	15.10 ± 0.01 a	0.58 ± 0.01 a	69.84 ± 0.97 b	63.71 ± 1.74 a	23.12 ± 0.68 a
二倍体 Diploid	15.27 ± 0.06 a	0.57 ± 0.02 a	75.99 ± 0.71 a	61.06 ± 2.97 a	16.55 ± 1.89 b
增加率/% Increment rate	-1.11	1.75	-8.09	4.34	39.70

2.4 叶片显微解剖结构观测

如图 6 所示，混倍体与二倍体沃柑叶片横切面组织结构的细胞排列顺序基本相同，上、下表皮组织由 1 层圆形或近圆形的细胞组成，排列整齐，栅栏组织和海绵组织分化明显，栅栏组织靠近上表皮，由 2~3 层紧密排布的长条形细胞组成，海绵组织靠近下表皮，形状短圆形，排列不整齐且较为松散。表 6 显示，混倍体的叶片厚 310.96 μm、下表皮厚 12.26 μm、栅栏组织厚 72.89 μm 和海绵组织厚 227.94 μm，均显著高于二倍体，分别增加 19.75%、10.10%、9.38%和 43.92%，上表皮厚度也增厚，但未达到显著差异。

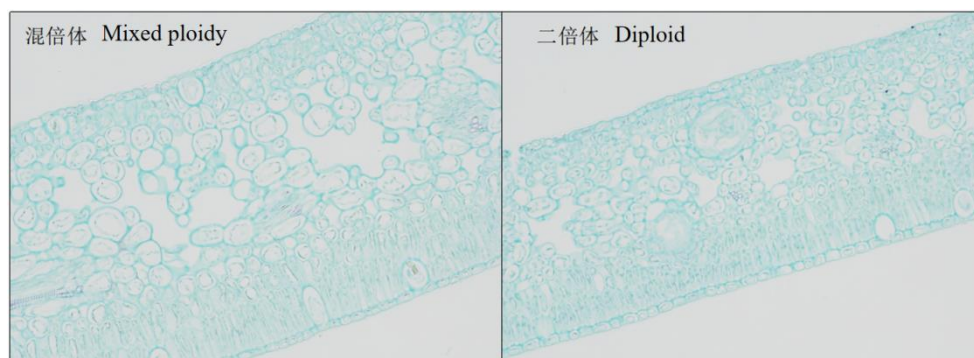


图 6 混倍体及二倍体沃柑叶片横切面组织结构

Fig. 6 Histological structure of cross-section of mixed ploidy and diploid leaves

表 6 混倍体及二倍体沃柑叶片横切面组织结构指标

Table 6 Indices of histological structure of cross-sections of mixed ploidy and diploid leaves

材料 Material	叶片厚度 Leaf thickness/μm	上表皮厚度 Thickness of upper epidermis/μm	下表皮厚度 Thickness of lower epidermis/μm	栅栏组织厚度 Thickness of palisade tissue/μm	海绵组织厚度 Thickness of sponge tissue/μm
混倍体 Mixed ploidy	310.96 ± 13.66 a	13.41 ± 1.06 a	12.26 ± 1.14 a	72.89 ± 3.27 a	227.94 ± 16.15 a
二倍体 Diploid	259.68 ± 8.95 b	12.88 ± 0.57 a	11.13 ± 1.16 b	66.64 ± 3.68 b	158.38 ± 5.85 b

增加率/%	19.75	4.15	10.10	9.38	43.92
Increment rate					

扫描电镜观察气孔特征显示（图 7，表 7），混倍体的叶片气孔长度为 7.35 μm ，宽度为 3.33 μm ，气孔密度为 520.40 个 $\cdot\text{mm}^{-2}$ ，与二倍体相比，气孔长度和气孔密度分别减少 7.36% 及 15.76%，差异显著，而气孔宽度较二倍体显著增加 5.09%。

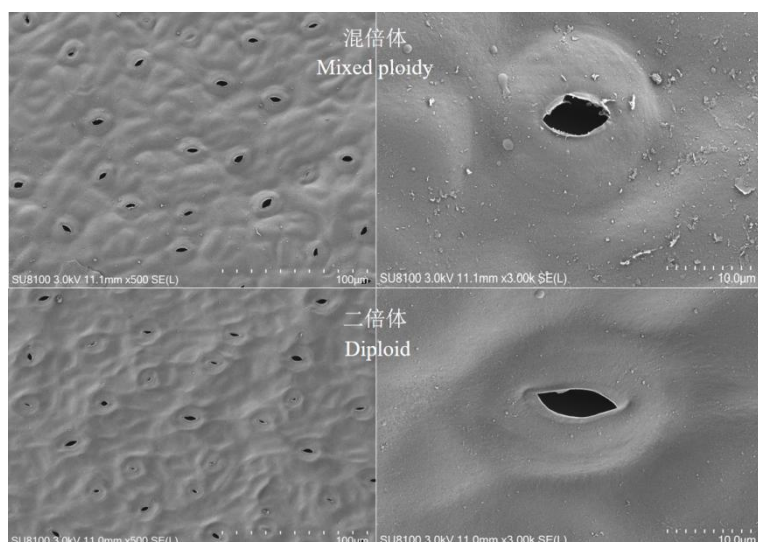


图 7 混倍体及二倍体沃柑叶片气孔特征比较
Fig. 7 Comparison of stomatal characteristics between mixed and diploid leaves

表 7 混倍体及二倍体沃柑叶片气孔指标
Table 7 Indices of stomata in mixed ploidy and diploid leaves

材料	气孔长度	气孔宽度	气孔密度
Material	Stomatal length/ μm	Stomatal width/ μm	Stomatal density/ (个 $\cdot\text{mm}^{-2}$)
混倍体	7.35 \pm 0.02 b	3.33 \pm 0.04a	520.40 \pm 36.26 b
Mixed ploidy			
二倍体	7.94 \pm 0.01 a	3.16 \pm 0.03b	617.76 \pm 39.41a
Diploid			
增加率	-7.36	5.09	-15.76
Increment rate/%			

3 讨论

倍性鉴定是果树倍性育种的重要环节，目前，倍性鉴定的方法有很多，一般可以通过形态特征、细胞学、染色体计数法、分子标记法、流式细胞仪法等中一种或多种方法进行鉴定^[13]。Galbraith 等^[14]科学家首次报告了利用流式细胞术快速、准确地测定植物倍性水平，经过多年的不断发展，现如今已被广泛应用并已逐步替代了传统的染色体计数法^[15]。研究人员利用该方法对苹果、柑橘^[16]、枣、柿、葡萄、猕猴桃、梨^[17]等果树资源鉴定出不同倍性材料。对于混倍体植株，流式细胞术可以快速检测出不同倍体细胞类型和各种细胞类型所占的比例。本研究中，从二倍体沃柑中发现叶片增大、果实变大、种子数减少等性状的变异材

料，初步认为具有多倍性性状，再通过流式细胞仪对其倍性进行确认，结果变异材料为二、四混倍体，且二倍体与四倍体细胞比例约为 4:6，与亲本沃柑的倍性存在差异。因此，通过形态学鉴定方法初选出多倍体变异植株后，再进一步利用流式细胞仪进行倍性检测是一种快速且有效的方法。

混倍体植物常表现出异于正常倍性植株的特性，出现一些器官“巨大化”，主要表现在叶片、花朵、果实、种子以及气孔等特征上。吴改娥^[18]分析了二倍体与四倍体枣树叶片形态，发现四倍体枣树的叶片比二倍体枣树的叶片更大更宽。汪卫星等^[19]研究发现三倍体枇杷的树体干周、枝条、叶片和花器官性状均显著大于二倍体。四倍体杂交鹅掌楸与二倍体相比形态上发生明显变化，包括叶片变大变厚、叶色加深、气孔变大等^[20]。本研究中，随着沃柑倍性增加，出现植株叶片显著变大增厚、叶形指数减小、叶色加深、花朵增大、果实增大、种子减少等变化特点，与上述研究有类似结果，可作为前期倍性鉴定的重要筛选依据，在大规模倍性鉴定中能较大程度减少育种人员的工作量。

多倍体植物的表型变异在一定程度上反映了植物对环境的生理适应性，通过改变组织结构来提高植株的抗病抗逆性，其中，植物叶片组织结构是种质资源评价的重要依据之一^[21]。多倍体显微结构发生改变，巨大化特征表现突出^[22]，二、四混倍体芽变品种金冠酥的叶片、茎细胞比二倍体母本酥梨大^[23]。溃疡病作为沃柑最主要病害，气孔作为病原菌侵入的重要途径，其密度、面积与柑橘对溃疡病的抗性呈显著负相关，叶片厚度及叶片栅栏组织、海绵组织、上下表皮厚度等在内的多项形态学指标均与柑橘抗溃疡病能力呈极显著正相关^[24]。本研究结果显示，沃柑混倍体的叶片厚度、叶片上下表皮、栅栏组织和海绵组织的厚度均大于二倍体，气孔密度显著降低，意味着有较强的抗逆性，且在实际生产中，笔者也观察到田间混倍体植株对溃疡病的抗性明显高于二倍体，这可能与混倍体叶片结构的改变有关，混倍体的抗病性将作为下一步的研究目标。

植株果实营养品质的优劣是衡量其价值的重要指标，植物多倍体不仅改变了植株的形态，而且改变了植株的营养品质。黄金艳等^[25]对不同倍性甜瓜果实品质进行比较研究，发现四倍体维生素 C 含量高于三倍体和二倍体，可溶性蛋白和可溶性糖含量具有相同趋势，依次为三倍体、四倍体、二倍体。亦有研究学者发现四倍体茄子的果实维生素 C、蛋白质、脂肪含量较二倍体品种分别增加了 74.38%、34.22%和 31.30%^[26]；维生素 C 是一种具有多功能的代谢物质，人体不能自身合成，必须从食物中获取，因此维生素 C 含量已成为衡量果实品质和影响人们选购果品的重要指标。人类日常膳食摄入的维生素 C 也主要来源柑橘类水果^[27]，本研究中，混倍体沃柑的维生素 C 含量达到 $23.12 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ，显著高于二倍体沃柑的 $16.55 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ，增加率高达 39.70%，表现出营养物质更加丰富。

4 结 论

混倍体与二倍体沃柑在叶、花、种子、果实形态、果实品质以及叶片显微结构等方面存在较大差异,具体表现在混倍体沃柑叶片变大变厚,花瓣长度和宽度增大,种子单粒质量、横径和纵径增加而单果种子数减少,叶片、叶片上表皮、下表皮、栅栏组织、海绵组织厚度增厚,气孔长度和密度减小,气孔宽度增加,单果质量、果实横纵径、维生素 C 含量增加。该混倍体既可作为单胚型少核大果沃柑的新类型加以利用,也可作为新的种质资源进一步用于育种工作。

参考文献 References:

[1] 袁东亚. 以 12 个柑橘四倍体为父本倍性杂交培育三倍体[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.

YUAN Dongya. Production of citrus triploid plants by interploidy crossing with twelve tetraploids as pollen parents[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018.

[2] 黄其椿, 刘吉敏, 何新华, 黄克, 冉志林, 吴荣伦, 罗捷, 李初英. 晚熟杂柑“沃柑”在广西武鸣的栽培表现初报[J]. 中国南方果树, 2014, 43(3): 86-88.

HUANG Qichun, LIU Jimin, HE Xinhua, HUANG Ke, RAN Zhilin, WU Ronglun, LUO Jie, LI Chuying. Preliminary study of performance of late maturing hybrid citrus “Orah” during the cultivation in Wuming of Guangxi[J]. South China Fruits, 2014, 43(3): 86-88.

[3] 赵洪涛, 陈东奎, 陈香玲, 欧智涛, 黄其椿, 张兰, 李果果, 刘要鑫, 叶云峰, 付岗. 沃柑溃疡病病原菌分离鉴定及防治药剂筛选[J]. 南方农业学报, 2019, 50(12): 2703-2712.

ZHAO Hongtao, CHEN Dongkui, CHEN Xiangling, OU Zhitao, HUANG Qichun, ZHANG Lan, LI Guoguo, LIU Yaixin, YE Yunfeng, FU Gang. Pathogen identification and bactericide screening of Orah citrus canker[J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(12): 2703-2712.

[4] 黎月娟. 桑树种质资源倍性测定及诱导研究[D]. 南宁: 广西大学, 2019.

LI Yuejuan. Ploidy determination and induction study of mulberry germplasm resources[D]. Nanning: Guangxi University, 2019.

[5] 朱雪云, 陈利萍. 植物嵌合体的研究与应用[J]. 核农学报, 2010, 24(6): 1185-1191.

ZHU Xueyun, CHEN Liping. Studies and applications of plant chimeras[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2010, 24(6): 1185-1191.

[6] 刘颖, 冯春芳, 于洪长, 王玖瑞, 刘孟军. ‘冬枣’天然二、四混倍体的发现与评价[J]. 园艺学报, 2016, 43(5): 966-974.

LIU Ying, FENG Chunfang, YU Hongchang, WANG Jiurui, LIU Mengjun. Discovery and evaluation of natural mixoploid ($2x + 4x$) variants in *Ziziphus jujuba* Mill. ‘Dongzao’[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(5): 966-974.

[7] 黎明芝. 桑树人工诱导混倍体品种‘鲁诱 1 号’选育[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.

LIANG Mingzhi. Breeding of artificial-induced mixoploid mulberry variety ‘Luyou1’ [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005.

- [8] 陈立松, 万蜀渊. 1 个新的椪柑突变体: “桂林良丰” 无核椪柑的细胞学鉴定[J]. 武汉植物学研究, 1996, 14(1): 1-5.
- CHEN Lisong, WAN Shuyuan. Cytological identifications on “Guilin Liangfeng” seedless ponkan (*Citrus reticulata* blanco): A new type mutant of ponkan[J]. Plant Science Journal, 1996, 14(1): 1-5.
- [9] 陈立松, 万蜀渊. 柑混倍体的形态学和细胞学特性研究[J]. 武汉植物学研究, 1998, 16(1): 89-92.
- CHEN Lisong, WAN Shuyuan. Studies on the morphological and cytological characteristics of ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) mixoploid[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 1998, 16(1): 89-92.
- [10] 唐志鹏, 高兴, 秦荣耀, 孙宁静, 蓝惠国, 韦日机, 邓光宙, 刘冰浩. 金柑新品种 ‘脆蜜金柑’ 的选育[J]. 果树学报, 2018, 35(1): 131-134.
- TANG Zhipeng, GAO Xing, QIN Rongyao, SUN Ningjing, LAN Huiguo, WEI Riji, DENG Guangzhou, LIU Binghao. A new *Fortunella crassifolia* cultivar ‘Cuimi Kumquat’ [J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(1): 131-134.
- [11] 崔璐璐, 党江波, 韩国辉, 郭启高, 向素琼, 梁国鲁. 梨橙有性多倍体发掘及遗传鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2021, 22(4): 1000-1008.
- CUI Lulu, DANG Jiangbo, HAN Guohui, GUO Qigao, XIANG Suqiong, LIANG Guolu. Exploitation and genetic characterization of sexual polyploids from Licheng[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2021, 22(4): 1000-1008.
- [12] 解凯东, 王惠芹, 王晓培, 梁武军, 谢宗周, 伊华林, 邓秀新, Grosser Jude W, 郭文武. 单胚性二倍体为母本与异源四倍体杂交大规模创制柑橘三倍体[J]. 中国农业科学, 2013, 46(21): 4550-4557.
- XIE Kaidong, WANG Huiqin, WANG Xiaopei, LIANG Wujun, XIE Zongzhou, YI Hualin, DENG Xiuxin, GROSSER J W, GUO Wenwu. Extensive citrus triploid breeding by crossing monoembryonic diploid females with allotetraploid male parents[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(21): 4550-4557.
- [13] 陈敏敏, 张永春, 蔡友铭, 杨柳燕, 聂功平. 利用流式细胞术快速鉴定 61 份百合品种倍性[J]. 上海农业学报, 2020, 36(6): 13-17.
- CHEN Minmin, ZHANG Yongchun, CAI Youming, YANG Liuyan, NIE Gongping. Ploidy identification of 61 lily cultivars by flow cytometry[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2020, 36(6): 13-17.
- [14] GALBRAITH D W, HARKINS K R, MADDOX J M, AYRES N M, SHARMA D P, FIROOZABADY E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues[J]. Science, 1983, 220(4601): 1049-1051.
- [15] 逢洪波, 高秋, 李玥莹, 马纯艳, 刘宏鑫, 杨成瑶, 吕瑞雪. 利用流式细胞仪测定鬼针草基因组大小[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(7): 1800-1804.
- PANG Hongbo, GAO Qiu, LI Yueying, MA Chunyan, LIU Hongxin, YANG Chengyao, LV Ruixue. Genome size estimation of *Bidens bipinnata* L. by using flow cytometry[J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(7): 1800-1804.
- [16] 周锐, 解凯东, 王伟, 彭珺, 谢善鹏, 胡益波, 伍小萌, 郭文武. 依据多倍体形态特征快速高效发掘柑橘四倍体[J]. 园艺学报, 2020, 47(12): 2451-2458.
- ZHOU Rui, XIE Kaidong, WANG Wei, PENG Jun, XIE Shanpeng, HU Yibo, WU Xiaomeng, GUO Wenwu. Efficient identification of tetraploid plants from seedling populations of apomictic citrus genotypes based on morphological characteristics[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(12): 2451-2458.
- [17] 齐丹, 田路明, 董星光, 张莹, 霍宏亮, 徐家玉, 刘超, 张小双, 詹俊宇, 张思梦, 曹玉芬. 梨多倍体种质资源的鉴定[J]. 中国果树, 2023(6): 10-15.

- QI Dan, TIAN Luming, DONG Xingguang, ZHANG Ying, HUO Hongliang, XU Jiayu, LIU Chao, ZHANG Xiaoshuang, ZHAN Junyu, ZHANG Simeng, CAO Yufen. Identification of pear polyploid germplasm resources[J]. China Fruits, 2023(6): 10-15.
- [18] 吴改娥. 二倍体和四倍体枣的比较研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2011.
- WU Gaie. Comparative study on diploid and autotetraploid Chinese jujube[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2011.
- [19] 汪卫星, 李晔, 李晓林, 向素琼, 郭启高, 何桥, 梁国鲁. 天然三倍体枇杷与其二倍体植株的形态学比较[J]. 果树学报, 2011, 28(6): 1090-1092.
- WANG Weixing, LI Ye, LI Xiaolin, XIANG Suqiong, GUO Qigao, HE Qiao, LIANG Guolu. Morphological comparison between natural triploids and diploids in loquat[J]. Journal of Fruit Science, 2011, 28(6): 1090-1092.
- [20] CHEN T T, SHENG Y, HAO Z D, LONG X F, FU F F, LIU Y, TANG Z H, ALI A, PENG Y, LIU Y, LU L, HU X Y, SHI J S, CHEN J H. Transcriptome and proteome analysis suggest enhanced photosynthesis in tetraploid *Liriodendron sino-americanum*[J]. Tree Physiology, 2021, 41(10): 1953-1971.
- [21] 陈雪峰, 景晨娟, 赵习平, 武晓红. 植物叶片组织结构在抗逆研究中的应用进展[J]. 河北农业科学, 2018, 22(3): 50-53.
- CHEN Xuefeng, JING Chenjuan, ZHAO Xiping, WU Xiaohong. Advances in application of plant leaf tissue structure in the research of stress tolerance[J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2018, 22(3): 50-53.
- [22] 崔华蕾, 郭欢欢, 杨丽晓, 马小欣, 李探, 陈彩霞, 梁海永. 二倍体及多倍体白榆叶片形态与光合特性分析[J]. 黑龙江农业科学, 2023(3): 68-72.
- CUI Hualei, GUO Huanhuan, YANG Lixiao, MA Xiaoxin, LI Tan, CHEN Caixia, LIANG Haiyong. Leaf morphology and photosynthetic characteristics analysis of diploid and polyploid *Ulmus pumila*[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2023(3): 68-72.
- [23] 邓舒, 张春芬, 肖蓉, 李倩, 李全, 曹秋芬. ‘酥梨’多倍体芽变新品种‘金冠酥’细胞显微结构观察[J]. 分子植物育种, 2023, 21(21): 7171-7177.
- DENG Shu, ZHANG Chunfen, XIAO Rong, LI Qian, LI Quan, CAO Qiufen. Anatomical structure of ‘Jingunsu’ pear, a new polyploid mutant cultivar of ‘Suli’ [J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(21): 7171-7177.
- [24] 潘贞珍, 黄运鹏, 黄桂香, 杨翠红, 何新华. 3个柑橘品种叶片结构和生化物质与柑橘溃疡病抗性的相关性研究[J]. 中国果树, 2020(4): 31-36.
- PAN Zhenzhen, HUANG Yunpeng, HUANG Guixiang, YANG Cuihong, HE Xinhua. Correlation research of leaf structure and biochemical substances of three varieties of citrus with the resistance to citrus canker[J]. China Fruits, 2020(4): 31-36.
- [25] 黄金艳, 王红梅, 覃斯华, 李文信, 何毅, 李天艳, 洪日新, 樊学军, 李凤梅. 不同倍性甜瓜果实品质比较研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(13): 238-241.
- HUANG Jinyan, WANG Hongmei, QIN Sihua, LI Wenxin, HE Yi, LI Tianyan, HONG Rixin, FAN Xuejun, LI Fengmei. Comparison of fruit quality in different ploidy melon[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(13): 238-241.
- [26] 李树贤, 吴志娟, 杨志刚, 李明珠. 同源四倍体茄子品种新茄一号的选育[J]. 中国农业科学, 2002, 35(6): 686-689.
- LI Shuxian, WU Zhijuan, YANG Zhigang, LI Mingzhu. The breeding of autotetraploid eggplant cultivar Xinqie No₁[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2002, 35(6): 686-689.

[27] BORGHI S M, PAVANELLI W R. Antioxidant compounds and health benefits of citrus fruits[J].
Antioxidants, 2023, 12(8): 1526.