

# 油茶异常落花落果现象的生殖特性

陈世明<sup>1</sup>, 王 猛<sup>1</sup>, 赵志珩<sup>1</sup>, 尹加笔<sup>2</sup>, 石卓功<sup>1</sup>

(1. 西南林业大学 林学院, 云南 昆明 650224; 2. 德宏州林业局 中心苗圃, 云南 德宏 678400)

**摘 要:**以往年正常开花结果和异常落花落果的油茶样株为试材, 采用碘-碘化钾溶液测定其花粉活力, 苯胺蓝染色法观察花粉管生长情况, 石蜡切片观察胚囊和雌配子体的发育, 同时通过自然授粉和异花授粉试验观察各样株的坐果率及其动态变化规律。结果表明: 正常开花结果的油茶树花粉活力、花粉管在花柱中的生长比例都明显比异常落花落果的油茶树高。方差分析表明, 油茶坐果率与不同开花结果性状的样株显著相关, 与授粉方式不相关。异常落花落果样株与正常开花结果样株相比, 雌配子体发育更易出现异常和退化, 致使胚珠畸形, 导致花后落花落果严重, 坐果率极低。

**关键词:**油茶; 落花落果; 生殖特性; 德宏州

**中图分类号:**S 794.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)02-0094-05

油茶(*Camellia oleifera*)是我国重要木本油料树种, 与油棕(*Elaeis guineensis*)、油橄榄(*Olea europaea*)、椰子(*Cocos nucifera*)并称为世界四大木本油料树种。油茶主要分布于北纬 18°21'~34°34', 东经 98°40'~121°41', 其北界自秦岭南坡经桐柏山、大别山白山麓至江苏云台山, 南达海南崖县, 东达浙江省镇海, 福建省福安, 西至云南省怒江流域等 18 个省(自治区、直辖市)<sup>[1]</sup>。

茶油清香味美, 营养价值高, 茶油中不饱和脂肪酸含量高达 90%以上, 是一种高级食用油。茶油具有很好的保健功能, 可以降血压、降血脂、降胆固醇、治疗心脑血管疾病<sup>[2]</sup>。其茶籽粕和果壳含有茶皂素、糖类、粗蛋白、粗纤维等, 可制成皂素、活性炭、糠醛、烤胶、饲料、肥料等多种化工产品<sup>[3-5]</sup>, 是很好的化工、医药等原料, 具有很高的利用价值。因此, 油茶被誉为“东方橄榄油”。

目前, 云南省部分油茶栽培区落花落果现象极为严重, 出现开花不整齐、花没有完全开放时就脱落, 且枝上花芽成串而无坐果的现象。开花与坐果对油茶栽培具有十分重要的意义<sup>[6]</sup>。该试验采用生殖生物学方法对云南省德宏州油茶成龄林开花结实特性等开展研究, 旨在揭示油茶落花落果的原因。

**第一作者简介:**陈世明(1986-), 男, 硕士, 研究方向为经济林生殖生物学。E-mail: chenshming@sina.cn.

**责任作者:**石卓功(1957-), 男, 博士, 教授, 现主要从事经济林和果树生殖生物学及其栽培技术等研究工作。E-mail: zgongshi@sina.com.

**基金项目:**云南省重点新产品开发计划资助项目(2009BB004)。

**收稿日期:**2013-09-16

## Cloning and Plant Expression Vector Construction of GA20-oxidase Gene from Pear Dwarfing Mutants and Pingguo Pear

WANG Man, JIN Can, XU Xue, ZONG Cheng-wen, CAO Hou-nan  
(College of Agricultural, Yanbian University, Yanji, Jinlin 133000)

**Abstract:** Taking pear dwarf mutant and ‘Pingguo’ pear as test material, by RT-PCR technique, cloning and sequencing of GA20ox gene was studied. The results showed that two GA20-oxidase genes which full-length cDNA consist 1 179 nucleotides and contain complete open reading frame (ORF) which encoding a protein of 392 amino acids residue were isolated from pear dwarfing mutant and ‘Pingguo’ pear. Moreover named that *PuGA20ox* and *PbGA20ox*. Cloning and plant expression vector construction of GA20-oxidase gene from pear dwarfing mutants and ‘Pingguo’ pear basis for studying the genetic transformation and function of GA20-oxidase gene.

**Key words:** pear dwarf mutant; GA20-oxidase gene; cloning; sequence analysis; plant expression vect

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地概况

试验地位于德宏州梁河县竹坪山,地处北纬 24°42', 东经 98°16', 属亚热带季风气候。海拔 1 300~1 400 m, 年平均气温 18.3℃, 年降雨量 1 396.2 mm, 年日照时数 2 385 h, 土壤为赤红壤土, 土层较厚。

### 1.2 试验材料

供试油茶林为树龄 30 a 左右的实生树, 树高 3~4 m。根据近 3 a 结果情况, 在同一立地条件下选取异常落花落果和正常开花结果的样株各 3 株(异常落花落果样株用“B”表示, 正常开花结果样株用“N”表示), 并对所选单株进行挂牌标记。于 2011 年 10 月下旬花开放时采集花粉, 将样品花粉分别储存在不同的棕色瓶中, 4℃低温保存, 用于测定花粉活力和花粉萌发能力。于花芽期、花蕾期和花期分别采集 10 余朵花, 固定在 FPA70 溶液中, 用于胚胎发育状况观察, 并对花期的花粉管生长进行荧光显微观察。

### 1.3 试验方法

1.3.1 花粉活力的测定 采用碘-碘化钾染色法。将 2 g KI 溶解于 10 mL 蒸馏水中, 放入 1 g I<sub>2</sub>, 待完全溶解后定容至 200 mL。将处理好的花粉放在载玻片上, 加入 1~2 滴碘-碘化钾溶液, 用镊子搅拌均匀, 于低倍镜下观察。每个制片取 5 个视野, 每次 2 个制片, 取平均值。凡被染成蓝色的为含有淀粉的活力较强的花粉粒, 呈黄褐色的为发育不良的花粉粒。

1.3.2 坐果率调查与授粉试验 在每株树冠中下部东南西北 4 个方向选择 4 个样枝, 做挂牌标记, 定期调查开花数和坐果数, 调查期为 2011 年 10 月 25 日至 2013 年 5 月 3 日, 调查 9 次。同时进行油茶样株与授粉方式 2 因素试验。以开花结果正常样株和落花落果严重样株作对比试验, 分别作异花授粉和自然授粉 2 个处理, 各 3 次重复, 每样株异花授粉和自然授粉花朵数各 30 个。

1.3.3 花粉管生长的观察 将采集的盛花期油茶花子房从 FPA70 固定液中取出, 于自来水中冲洗 8 h, 再加入 8 mol/L NaOH 溶液软化 8~10 h, 充分水洗, 然后放进苯胺蓝染色液, 浸泡 10 h。将样品压碎, 用荧光显微镜进行观察。

1.3.4 胚囊异常发育的观察 采用常规石蜡制片法, 将固定材料用 Johansen Gem 脱水液逐级脱水、抽真空、叔丁醇清洗、浸蜡、包埋后切片, 切片厚度 5~10 μm, 苏木精染色, 中性树脂封片, 在 Nikon E100 型光学显微镜上进行观察、照相。

### 1.4 数据分析

采用 Excel 2003 和 SPSS 17.0 软件进行数据处理和统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同样株花粉活力比较

从表 1 可以看出, 使用碘-碘化钾染色法检测花粉活

力, 坐果正常的花粉粒活力高达 84.1%, 坐果率低的花粉粒活力为 63.3%, 二者之间具有明显的差异。

表 1 花粉活力测定结果

Table 1 The determination results of pollen viability with iodine-potassium iodide solution dying assay

样株	染色花粉数/粒	花粉总数/粒	花粉活力/%
N	599	712	84.1
B	592	935	63.3

### 2.2 不同样株坐果数和坐果率比较

由图 1 可知, 2012~2013 年正常开花结果样株和异常落花落果样株的坐果数都呈现先上升后下降的趋势: 当年 11 月至次年 1 月为坐果数增加阶段, 在次年 1 月达到最高, 次年 1~9 月的坐果数逐渐下降, 其中, 1~7 月下降明显。这段时间内, 胚胎发育和授粉受精不良引起坐果初期落果, 干湿季交替、病虫害加剧引起裂果和蛀果, 影响果实正常发育。

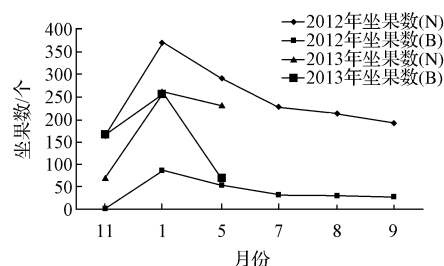


图 1 不同样株月平均坐果数比较(2012~2013)

Fig. 1 Comparison of different samples number of average fruit setting of *C. oleifera* in 2012~2013 monthly

由图 2 可知, 坐果率和坐果数曲线相似, 2012 年 9 月正常开花结果样株坐果率为 41.9%, 坐果率低的样株坐果率为 4.9%。2013 年异常落花落果样株花芽分化较多而坐果数少, 1~5 月落果严重, 坐果率明显下降。截至 2013 年 5 月, 开花结果正常的样株坐果率为 53.3%, 落花落果样株的坐果率为 8.5%。

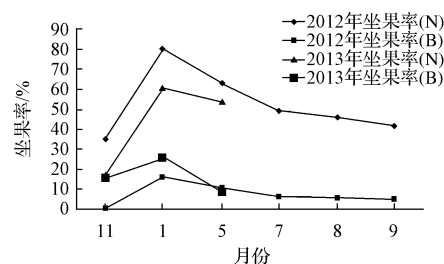


图 2 不同样株月平均坐果率比较(2012~2013)

Fig. 2 Comparison of different samples average fruit setting rate of *C. oleifera* in 2012~2013 monthly

对比 2012、2013 年油茶的坐果情况, 相同结果性状油茶样株的坐果数和坐果率差异不大, 且表现趋于一致, 而不同结果性状样株间的坐果率差异显著。对正常开花结果和异常落花落果样株进行异花授粉和自然授粉试验, 将所得数据作反正弦转换并进行方差分析。由表 2



可知,2类样株对油茶坐果率的影响达到了极显著水平,而授粉方式、植株与授粉方式的交互作用对油茶坐果的影响差异不显著。说明影响油茶坐果的主要原因在于油茶不同样株间的差异,与授粉方式相关性不大。

表 2 油茶坐果率方差分析

Table 2 Variance analysis of fruit setting rate of *C. oleifera*

差异来源	离差平方和 (SS)	自由度 (df)	均方 (MS)	F 值	P 值
样株	3 342.234	5	668.447	4.538	0.005 **
授粉方式	526.626	1	526.626	3.575	0.071
植株×授粉方式	90.544	5	18.109	0.123	0.986
误差	3 535.365	24	147.307		
总计	36 648.624	35			

### 2.3 不同样株花粉管生长情况比较

由图 3 可知,正常开花结果和异常落花落果样株的油茶花粉管均能在柱头中生长,正常开花结果样株 1(N1)的花粉萌发量较多(图 3-a~c),到达柱头基部的花粉粒大约为总数的 20%,3 个样株花粉管到达柱头基部的平均值为 15%~20%,明显高于异常落花落果样株。异常落花落果样株 1(B1)的花粉萌发量(图 3-d~g)约为 7%;样株 2(B2)的柱头有大量花粉分布,但花粉萌发较少进入柱头基部的花粉管则低于 7%(图 3-h~k),样株 3(B3)则出现柱头表面有花粉粒而不萌发的情况(图 3-l)。

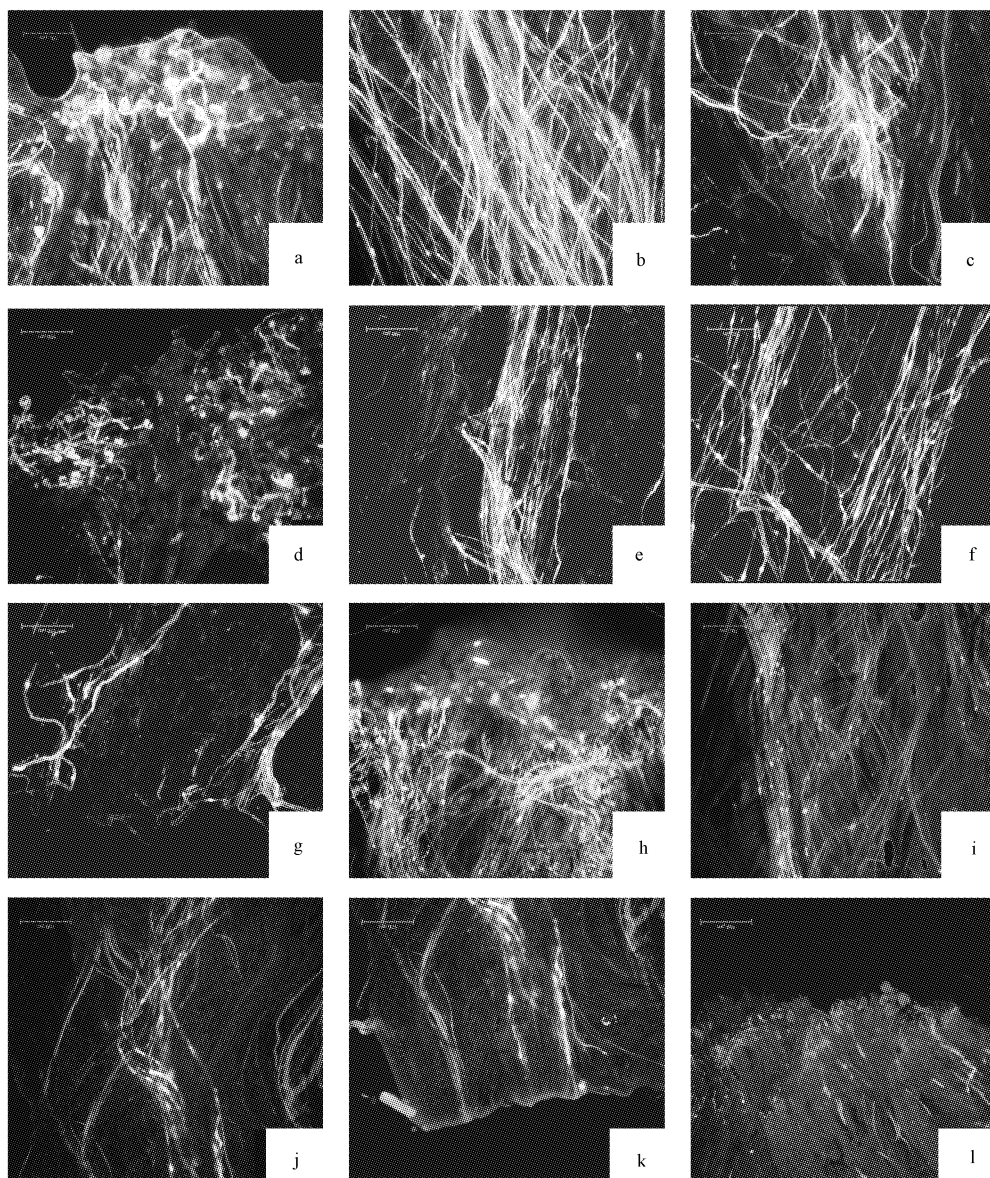


图 3 花粉管在花柱中的生长情况

注:a~c:N1 样株花粉管生长进入柱头基部×100;d~g:B1 样株少量花粉管生长进入柱头基部×100;h~k:B2 样株少量花粉管生长进入柱头基部×100;l:B3 样株花粉未萌发×100。

Fig. 3 Growth condition of pollen tubes in style

Note:a~c Pollen tubes of N1 entered the style base×100;d~g: Pollen tubes of B1 entered the style base×100;h~k: Pollen tubes of B2 entered the style base×100;l: Pollen grains of B3 with no germination×100.



## 2.4 不同样株雌配子体发育情况比较

油茶胚囊为蓼型,成熟时形成七细胞八核结构。正常开花结果样株和异常落花落果样株都存在不同程度的异常胚囊,主要分为胚囊结构异常、雌配子体发育异常和雌配子体败育。胚珠由外珠被、内珠被和珠心细胞等组成(图 4-a)。胚囊结构异常表现为内珠被发育畸形(图 4-b~d)、外珠被与内珠被分离,珠心细胞消失,在中央出现空腔,随着子房发育逐渐增大(图 4-e)。雌配子体发育异常表现为珠心细胞从形成胚囊母细胞到八核胚

囊过程中途停止发育,胚珠发育停滞和退化,或是珠心空腔内出现絮状痕迹(图 4-f~g)。雌配子体败育表现为雌配子体退化至逐渐消失(图 4-h~i)。通过对各样株花子房切片观察计数,开花结果正常样株雌配子体发育异常和败育胚珠占 20%左右,而落花落果严重的样株达 40%以上。其中,雌配子体败育在各样株中均比较普遍,是引起花后大量落果的胚胎学原因。异常落花落果的样株雌配子体形成异常,不能形成正常的八核胚囊,大部分在中途停止发育,致使大量落花。

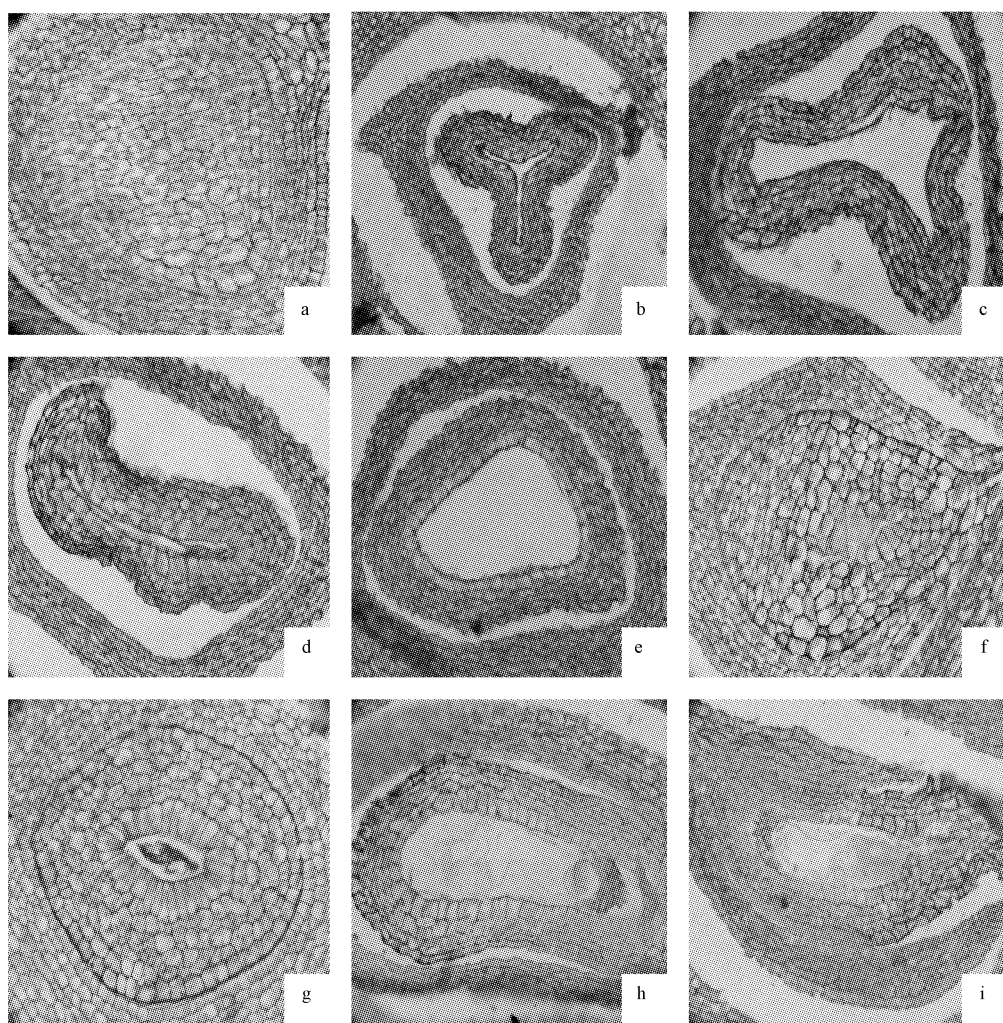


图 4 雌配子体异常发育和败育

注:a:正常胚珠(2012年9月)×400;b~d:雌配子体败育后胚珠畸形发育(2012年10月)×400;e:珠心细胞消失,胚囊中央出现空腔(2012年11月)×400;f:胚珠发育停滞(2012年10月)×400;g:珠心出现絮状痕迹,雌配子体退化(2012年10月)×400;h~i:雌配子体退化至逐渐消失(2012年10月)×400。

Fig. 4 Abnormal development and abortion of embryo sac

Note:a:Normal ovule(Sep,2012)×400;b~d:Developmental malformation of ovule caused by female gamete abortion(Oct,2012)×400;e:Embryo sac with no nucellar cell(Nov,2012)×400;f:Stagnation of ovule development(Oct,2012)×400;g:Degeneration of female gamete (Oct,2012)×400;h~i:Disappearing of female gamete(Oct,2012)×400.

## 3 讨论

花粉活力测定通常分为不萌发测定和萌发测定,该试验中使用的碘-碘化钾染色法属于不萌发测定法,通过花粉内部淀粉的含量来指示花粉的活力,因淀粉含量不同而显示出不同程度的蓝色。花粉活力是花粉管萌发和生长的先决条件,花粉与柱头、花粉管与花柱细胞间的相互作用,对于柱头对花粉的识别,花粉管在雌蕊组织中的正常生长起着重要作用<sup>[7]</sup>。由于自花授粉亲和性的限制,柱头上萌发的花粉多来自其它油茶植株,花粉活力测定数值和样株柱头上花粉管萌发量的相关性不大。花粉活力测定,对生产上选择和配置优良授粉树具有很好的指导意义<sup>[8]</sup>。

花粉管生长直接关系到雌雄配子的结合和果实的发育,增加坐果率。花粉管生长充分表明,花粉管在花柱内生长受阻,难以进入到子房内,致使没有受精而造成异常落花落果现象。引起油茶花粉管生长受阻的原因多种多样,油茶属异花授粉植物,可出现配子体和孢子体不亲和的现象,表现为自花授粉的花粉萌发性状较差,坐果时明显不孕或孕性极低<sup>[9-10]</sup>;花粉管生长具有群体效应,即柱头上花粉越多,进入到柱头内的花粉管就越多,受精的机遇就大。大量授粉还能促进胚的初期发育和防止子房脱落<sup>[11]</sup>;最重要的是雌配子体发育异常,如发育延迟、发育中途停止和败育等都会影响到花柱内的花粉管的生长<sup>[12-13]</sup>。今后需对异常落花落果油茶树的雌配子体和胚胎发育进行较深入的观察试验研究,才能较全面的揭示其生殖特性。

## 参考文献

- [1] 何方,胡芳名. 经济林栽培学[M]. 北京:中国林业出版社,2004:280-281.
- [2] 贾志邦. 解决突出问题推进油茶产业又好又快发展[J]. 林业经济, 2008(10):3-5.
- [3] 肖志红,陈永忠. 油茶加工利用研究综述[J]. 林业科技开发, 2005, 19(2):10-13.
- [4] 聂海瑜. 油茶籽的综合利用[J]. 精油加工与食品机械, 2004(6): 39-41.
- [5] 邓桂兰,彭超英,卢峰. 油茶饼粕的综合利用研究[J]. 四川食品与发酵, 2005(3):41-44.
- [6] Wang M, Shi Z G, Yin J B, et al. A preliminary investigation of low yield reason of *Camellia oleifera* in Dehong Prefecture[J]. Agricultural Science and Technology, 2012, 13(2):315317.
- [7] Xue Y B. Pollination and fertilization in higher plants and their molecular basis[M]. Beijing: Science Press, 1998:23-38.
- [8] Jia H J, He F J, Xiong C Z, et al. Influences of cross pollination on pollen tube growth and fruit set in Zuli plums (*Prunus salicina*) [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(2):203-209.
- [9] 庄瑞林. 中国油茶[M]. 北京:中国林业出版社, 1988:149-150.
- [10] 廖婷,袁德义,彭邵峰,等. 油茶自交和异交过程花粉管生长的荧光显微观察[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(7):34-37.
- [11] 杨弘远,周嫦. 花粉数量对芝麻受精结实、胚胎发育和后代的作用[J]. 遗传学报, 1975(24):15-23.
- [12] Zeng Y X, Hu C Y, Lu Y G, et al. Abnormalities occurring during female gametophyte development result in the diversity of abnormal embryo sacs and leads to abnormal fertilization in *Indica japonica* hybrids in rice[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2009, 51(1):3-12.
- [13] 杨维才,石东乔. 植物雌配子体发育研究进展[J]. 植物学通报, 2007, 24(3):302-310.

## Study on the Reproductive Characteristics of Severe Blossom and Fruit Dropping of *Camellia oleifera*

CHEN Shi-ming<sup>1</sup>, WANG Meng<sup>1</sup>, ZHAO Zhi-heng<sup>1</sup>, YIN Jia-bi<sup>2</sup>, SHI Zhuo-gong<sup>1</sup>

(1. College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224; 2. Center Nursery, Forestry Bureau of Dehong Prefecture, Dehong, Yunnan 678400)

**Abstract:** Taking normal-yield and low-yield *Camellia oleifera* trees as materials, pollen vitality was measured by iodine-potassium iodide solution, pollen tube growth in style was observed with fluorescent microscope after aniline blue dyeing, and paraffin-embedded sectioning technique was adopted to observe the development of abnormal embryo sac. Meanwhile, fruit setting data of natural pollination and cross pollination were collected to analysis the mechanism of blossom and fruit drops. The results showed that both the pollen vitality and the growth rate of the pollen tube of normal-yield *C. oleifera* trees were better than that of the low-yield one. The ovariance analysis showed fruit setting rate had a remarkable correlation to different sampling trees, yet had no correlation to pollination methods. Both of the two characteristic trees developed female gametophytes, compared with the normal-yield trees, abnormal and degenerated female gametophyte were more apt to appear in low-yield trees, which led to deformed ovule and serious blossom and fruit drops.

**Key words:** *Camellia oleifera*; blossom and fruit drop; reproductive character; Dehong prefecture