

亚洲百合与青岛百合杂交及其 FISH 快速鉴定

任贵玲, 张线线, 周树军*

(浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 农业部园艺植物生长发育与品质调控重点开放实验室, 杭州 310058)

摘 要: 利用切柱头授粉和胚抢救技术获得亚洲百合 ‘Petit Brigitte’ × 青岛百合的 14 个杂交后代, 以 45S rDNA 为探针对亲本和其中 4 个后代进行了荧光原位杂交 (FISH) 分析, 结果表明, 亲本和后代都为二倍体 ($2n = 2x = 24$); ‘Petit Brigitte’ 有 10 个 45S rDNA 位点, 分别位于 1、2、4、5 和 7 号染色体上; 青岛百合有 8 个 45S rDNA 位点, 分别位于 3、4、5 和 10 号染色体上; 4 个杂种后代有 9 个 45S rDNA 位点, 分别源于 ‘Petit Brigitte’ 和青岛百合。

关键词: 百合; 远缘杂交; rDNA; 荧光原位杂交

中图分类号: S 682.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 03-0588-05

Hybridization and Identification Between Asiatic Lily and *Lilium tsingtauense* Using FISH

REN Gui-ling, ZHANG Xian-xian, and ZHOU Shu-jun*

(The Key Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development and Quality Improvement, the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China; Department of Horticulture, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Hybridization between Asiatic lily ‘Petit Brigitte’ × *Lilium tsingtauense* was conducted with cut style pollination and embryo rescue. Fourteen progenies were obtained, and the parents and 4 progenies were analyzed using FISH with 45S rDNA as probe. The results showed that all of them are diploid ($2n = 2x = 24$); ‘Petit Brigitte’ has 10 loci of 45S rDNA distributed on chromosome CH-1, CH-2, CH-5 and CH-7 and *Lilium tsingtauense* has 8 on CH-3, CH-4, CH-5 and CH-10 respectively, $2n = 2x = 24$ for *Lilium tsingtauense* and $2n = 2x = 24$ for hybrids, respectively; all four progenies have 9 loci of 45S rDNA, unambiguously, coming from ‘Petit Brigitte’ and *Lilium tsingtauense* respectively.

Key words: *Lilium*; distant hybridization; rDNA; fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

亚洲百合 (Asiatic Lily) 是栽培百合中一个最大的品种类群, 源于百合属 (*Lilium*) 卷瓣组 (Sinomartagon), 而青岛百合 (*Lilium tsingtauense*) 属于轮叶组 (Martagon), 二者在形态特征上差异很大。由于百合不同组间的性状差异较大, 因此利用远缘杂交技术将不同组间百合杂交, 培育有商业价值的新品种, 是百合育种的重要方向之一。育种实践表明, 百合属中组内杂交比较容易, 组间杂交比较困难。然而, 依靠切柱头授粉和胚抢救技术已实现了麝香百合与亚洲百合、东方百合与

收稿日期: 2011 - 11 - 28; **修回日期:** 2012 - 01 - 10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871730, 31071821); 教育部留学回国人员科研启动基金项目 (教外司留[2009]8 号); 浙江省钱江人才项目 (2010R10092)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhou2007@zju.edu.cn)

亚洲百合、麝香百合与东方百合之间的杂交，并已有大量品种投放市场（Asano, 1982; van Tuyl et al., 2000; Zhou et al., 2008; Li et al., 2011）。

青岛百合原产山东青岛崂山等地，是重要的野生百合资源，目前鲜有青岛百合和亚洲百合杂交成功的报道（王奎玲 等，2010）。考虑到二者亲缘关系较远，性状差异较大，实现二者杂交对百合新品种的培育具有重要的价值。

但是由于百合生长缓慢，幼苗和成苗之间差异很大，从幼苗到开花通常需要 2 ~ 3 年时间，通过形态特征进行早期鉴定效果有限。近年来对百合杂种鉴定的报道表明荧光原位杂交技术（FISH）可以为百合的杂种鉴定提供一种快速的手段（Marasek et al., 2004; 胡凤荣 等，2009）。

本研究中利用切柱头授粉和胚抢救技术获得亚洲百合 ‘Petit Brigitte’ × 青岛百合的 14 个杂交后代，以 45S rDNA 为探针对亲本和其中 4 个后代进行了 FISH 鉴定，为百合的杂交育种早期鉴定提供一种简便快速的检测手段。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为亚洲百合 ‘Petit Brigitte’ 和青岛百合，种植于浙江大学温室中并进行常规管理。

1.2 授粉方式

由于青岛百合材料少且花期早于 ‘Petit Brigitte’ 1 周之多，因此，首先对青岛百合的花粉进行收集并贮藏于干燥器中，于 2010 年 5 月 11 日待 ‘Petit Brigitte’ 开花去雄后，对其中 4 朵常规授粉，9 朵切柱头授粉，然后用锡箔轻轻包裹柱头以防被其它花粉污染。

1.3 胚抢救

授粉 8 ~ 10 周后果实开始变黄或变软。剪取果实到组培室中的超净台上，用 70% 的酒精对其表面消毒。切开果实后，将胚囊有明显发育的种子直接放到胚抢救培养基中培养（Zhou et al., 2011），6 ~ 8 周后将萌发的种子转到繁殖培养基上，再经 6 ~ 8 周后待幼苗根生长较好，即可进行杂种染色体鉴定。

1.4 杂种鉴定

染色体制片采用周桂雪等（2011）方法。探针 45S rDNA（Gerlach & Bedbrook, 1979）标记采用罗氏公司生产的生物素缺口转移试剂盒标记（Roche, Germany）。

原位杂交参照周树军（2003）的方法进行。每个材料选择 3 ~ 5 个较好的分裂相在奥林帕斯荧光显微镜（BH-41）下观察并照相。

2 结果与分析

常规授粉的 4 个果实败育，没有获得任何杂交后代。切柱头授粉的 9 个果实只有一个败育，其它 8 个有一定程度的发育，通过胚抢救初步获得了 14 株幼苗。

随机选取了其中的 4 株和父、母本进行了荧光原位杂交分析，如图 1 所示。亚洲百合 ‘Petit Brigitte’ 和杂交后代皆为二倍体（ $2n = 2x = 24$ ），然而，所观察的青岛百合细胞似乎为 $2n = 2x = 25$ ，可能是其中一条较长的染色体在制片过程中断开了，也可能是其中一条较短的染色体为 B 染色体。

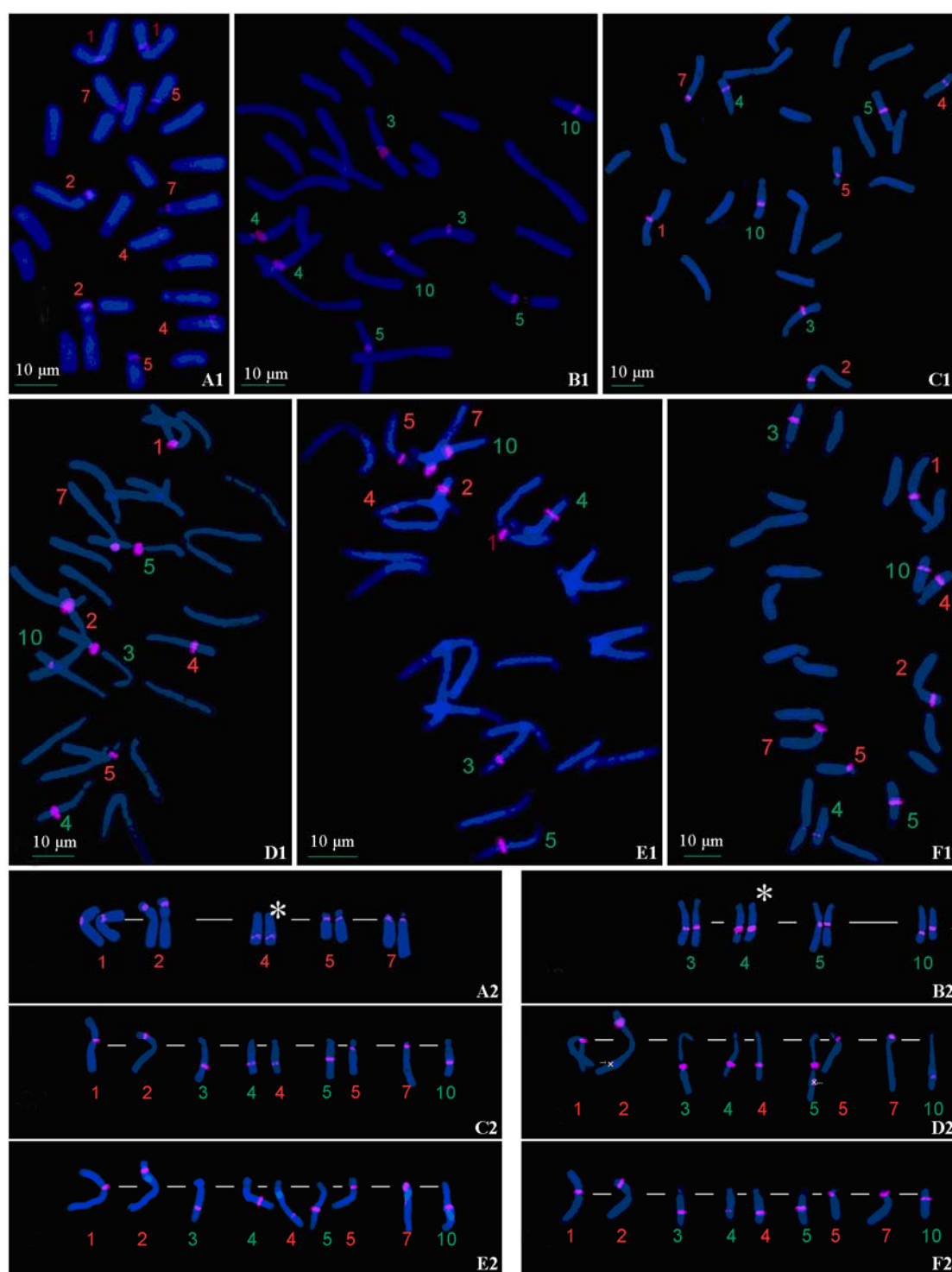


图 1 45S rDNA 与 ‘Petit Brigitte’、青岛百合及杂种染色体荧光原位杂交结果

A1 和 A2: ‘Petit Brigitte’; B1 和 B2: 青岛百合; C1 和 C2, D1 和 D2, E1 和 E2, F1 和 F2: ‘Petit Brigitte’ × 青岛百合杂种后代。
红色数字为 ‘Petit Brigitte’ rDNA 位点, 绿色数字为青岛百合 rDNA 位点。

* 4 号染色体在亚洲百合 ‘Petit Brigitte’ 和青岛百合中难以区分。

Fig. 1 The results of FISH on mitotic metaphase chromosomes using 45S rDNA as probe and aligning the chromosomes with rDNA loci

A1 and A2: ‘Petit Brigitte’; B1 and B2: *L. tsingtauense*; C1 and C2, D1 and D2, E1 and E2, F1 and F2: Progenies of

‘Petit Brigitte’ × *L. tsingtauense*. * It is difficult to identify CH-4 between ‘Petit Brigitte’ and *L. tsingtauense*.

母本 ‘Petit Brigitte’ 有 10 个 45S rDNA 位点 (图 1, A1、A2), 分布于 5 对染色体上, 分别位于 1、5 和 7 号染色体的着丝点附近, 2 号染色体的短臂末端, 以及 4 号染色体的长臂末端。

父本青岛百合有 8 个 45S rDNA 位点 (图 1, B1、B2), 分布于 4 对染色体上, 分别位于 3 号和 5 号染色体的长臂中部, 4 号和 10 号染色体的长臂末端。

4 个杂种后代都有 9 个 45S rDNA 位点, 从图 1 中可以明显看到 5 条红色数字标记的染色体来源于母本 ‘Petit Brigitte’, 而 4 条绿色数字标记的染色体来源于父本青岛百合 (图 1, C1 ~ F1、C2 ~ F2)。通过比较其亲本后代中带有 rDNA 位点的染色体, 可以表明这 4 株后代皆为 ‘Petit Brigitte’ 和青岛百合的杂交种。

3 讨论

亚洲百合的 45S rDNA 的位点与已报道的卷瓣组百合野生种的 FISH 核型基本一致 (Sultana et al., 2010), 这说明亚洲百合起源于卷瓣组的种类。亚洲百合和青岛百合 45S rDNA 的位点分布的差异支持了二者亲缘关系较远的观点。

亚洲百合和青岛百合的杂交结果同百合属已报道的其它组间的杂交结果相似, 即: 百合组间杂交通常需要切柱头和胚抢救技术克服受精前后的不亲和性 (Asano, 1982; Fernandez et al., 1996; van Tuyl et al., 1991, 2000)。百合组间杂交中的一个有趣的现象是杂交成功的单向性, 即: 组间杂交的成功往往仅限于一个组的百合为母本, 另一个组的百合为父本, 反之则难以成功。例如, 在铁炮百合和亚洲百合之间的成功杂交组合, 仅限于铁炮百合为母本, 亚洲百合为父本 (van Tuyl et al., 2000)。本试验结果表明亚洲百合 (卷瓣组) 和青岛百合 (轮叶组) 的成功杂交组合是亚洲百合为母本, 青岛百合能否作母本则需要调整二者的花期做进一步的杂交验证。

用于百合杂交后代鉴定的方法有多种, 各有特点。将亲本和后代性状进行比较是最直接的方法, 然而该方法对于生长缓慢的百合而言至少需要 2 ~ 3 年的时间, 因此采用得越来越少。RAPD 等分子标记也用于百合杂种的早期鉴定中 (Wiejacha et al., 2001), 然而, 该方法需要一定量的杂种叶片提取 DNA, 而且 RAPD 方法稳定性差。百合染色体较大, 比较适合染色体制片, 但百合属植物一般为二倍体且具有相似的常规核型 (Stewart, 1947), 因此采用常规染色体技术在百合倍性间杂交中鉴定杂种比较有效 (陈琼 等, 2007; Zhou et al., 2011; 周桂雪 等, 2011), 在二倍体与二倍体百合的杂交中作用较小。

近年来利用染色体 GISH 技术在百合杂种中区分基因组的报道较多 (Karlov et al., 1999), 也有用染色体 FISH 技术鉴定百合杂种的报道 (Marasek et al., 2004; 胡凤荣 等, 2009)。利用 GISH 技术进行杂种鉴定, 亲本的基因组必须分化到一定的程度才能将杂种中不同亲本的基因组区分开来, 而利用 rDNA 进行荧光原位杂交只要其双亲 rDNA 的位点不同即可在杂种中反映出来, 因此, 利用 FISH 技术既能快速鉴定百合杂交种的真实性, 也不会对幼苗的生长带来明显不利的影响。

References

- Asano Y. 1982. Overcoming interspecific hybrid sterility in *Lilium*. J Jpn Soc Hort Sci, 51: 75 - 81.
- Chen Qiong, Mu Ding, Yi Ming-fang, Ming Jun, Liu Chun. 2007. Identification and genetic expressions of lily hybrids obtained by different ploidy cross combinations. Acta Horticulturae Sinica, 34 (6): 1477 - 1484. (in Chinese)
- 陈 琼, 穆 鼎, 义鸣放, 明 军, 刘 春. 2007. 不同倍性百合杂交后代的核型及分子标记鉴定. 园艺学报, 34 (6): 1477 - 1484.
- Fernandez A M, Nakazaki T, Tanisaka T. 1996. Development of diploid and triploid interspecific hybrids between *Lilium longiflorum* and *L. concolor* by ovary slice culture. Plant Breeding, 115: 167 - 171.

- Gerlach W L, Bedbrook J R. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res*, (7): 1869 – 1885.
- Hu Feng-rong, Liu Guang-xin, Luo Feng-xia, Xi Meng-li, Xu Jin, Shi Ji-sen. 2009. Identification of *Lilium* hybrid by Giemsa C-banding and 45S rDNA FISH. *Journal of Nanjing Forestry University : Nat Sci Ed*, 33: 30 – 34. (in Chinese)
- 胡凤荣, 刘光欣, 罗凤霞, 席梦利, 徐 进, 施季森. 2009. 利用 Giemsa C – 带和 45S rDNA FISH 的方法鉴定百合杂种. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 33: 30 – 34.
- Karlov G I, Khrustaleva L I, Lim K B, van Tuyl J M. 1999. Homoeologous recombination in 2n-gamete producing interspecific hybrids of *Lilium* (Liliaceae) studied by genomic *in situ* hybridization (GISH). *Genome*, 42: 681 – 686.
- Li Ke-hu, Zhou Gui-xue, Ren Gui-ling, Zhang Xian-xian, Guo Fang-qi, Zhou Shu-jun. 2011. Observation on ploidy levels of lily cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (5): 970 – 976. (in Chinese)
- 李克虎, 周桂雪, 任贵玲, 张线线, 郭方其, 周树军. 2011. 百合品种染色体倍性观察. *园艺学报*, 38 (5): 970 – 976.
- Marasek A, Hasterok R, Wiejacha K, Orlikowska T. 2004. Determination by GISH and FISH of hybrid status in *Lilium*. *Hereditas*, 140: 1 – 7.
- Stewart R N. 1947. The morphology of somatic chromosomes in *Lilium*. *Am J Bot*, 34: 9 – 26.
- Sultana S, Lee S H, Bang J W, Choi H W. 2010. Physical mapping of rRNA gene loci and inter-specific relationships in wild *Lilium* distributed in Korea. *Journal of Plant Biology*, 53: 433 – 443.
- van Tuyl J M, van Diën M P, van Creijl M G M, van Kleinwee T C M, Franken J, Bino R J. 1991. Application of *in vitro* pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. *Plant Sci*, 74: 115 – 126.
- van Tuyl J M, van Dijken A, Chi H S, Lim K B, Villemoes S, Van Kronenburg B C E. 2000. Breakthroughs in interspecific hybridization of lily. *Acta Hort*, 508: 83 – 90.
- Wang Kui-ling, Qi Chun-min, Liu Qing-hua, Liu Qing-chao, Wang Wei. 2010. Experiment on cross breeding of *Lilium tsingtauense* Gilg. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 19 (4): 120 – 122. (in Chinese)
- 王奎玲, 齐春敏, 刘庆华, 刘庆超, 王 玮. 2010. 青岛百合有性杂交试验. *西北农业学报*, 19 (4): 120 – 122.
- Wiejacha K, Marasek A, Sabala I, Orlikowska T. 2001. Molecular markers in detection of distant hybrids in *Lilium*. *Acta Horticult*, 546: 281 – 285.
- Zhou Gui-xue, Li Ke-hu, Zhang Xian-xian, Ren Gui-ling, Guo Fang-qi, Zhou Shu-jun. 2011. Studies on ploidy levels, pollen fertility and interploid hybridization of Asiatic lilies. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (4): 733 – 739. (in Chinese)
- 周桂雪, 李克虎, 张线线, 任贵玲, 郭方其, 周树军. 2011. 亚洲百合品种倍性、花粉育性及其杂交研究. *园艺学报*, 38 (4): 733 – 739.
- Zhou Shu-jun. 2003. Discrimination of the genomes in BC₁ progeny of Asiatic lily and Oriental lily using GISH. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (4): 485 – 486. (in Chinese)
- 周树军. 2003. 基因组荧光原位杂交区分百合回交一代的不同基因组. *园艺学报*, 30 (4): 485 – 486.
- Zhou S, Ramanna M S, Visser R G F, van Tuyl J M. 2008. Genome composition of triploid lily cultivars derived from sexual polyploidisation of *Longiflorum* × Asiatic hybrids (*Lilium*). *Euphytica*, 160: 207 – 215.
- Zhou S, Zhou G, Li K. 2011. Euploid endosperm of triploid × diploid/tetraploid crosses results in aneuploid embryo survival in *Lilium*. *HortScience*, 46 (4): 558 – 562.