

# 百合种间杂交受精前障碍的研究

刘 春 穆 鼎 明 军 董 玲

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘 要:** 以 ‘山丹’ (*Lilium pumilum*)、‘西伯利亚’ (*Siberia*)、‘白狐’ (*White Fox*)、‘粉完美’ (*Pink Perfection*)、铁亚杂种系品种 ‘达诺’ (*Ceb Dazzle*) 和 ‘维多利亚瀑布’ (*Victoria Falls*) 为试材, 对花粉的活力、萌发力、贮存条件及授粉方式进行了研究, 结果表明适宜的蔗糖浓度有利于百合花粉萌发; 花粉贮存适宜温度为 5℃; 不同的授粉方式影响花粉的萌发, 授粉 48 h 后, 花粉管停止生长, 切花柱授粉方式的花粉处于不萌发状态; 试管受精 24 h 后, 花粉管即可进入胚珠, 45 d 果实明显膨大, 经胚培养获得杂交苗。

**关键词:** 百合; 受精前障碍; 花粉活力; 萌发力; 切割柱头

中图分类号: S 682.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 03-0653-04

## The Pre-fertilization Barriers Research of *Lilium* Interspecific Hybridization

Liu Chun, Mu Ding, Ming Jun, and Dong Ling

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Effects of pre-fertilization barriers including the viability, germination ability, preservation conditions of pollen and pollination methods on interspecific *Lilium* crosses was studied in *L. pumilum*, ‘Siberia’, ‘White Fox’, ‘Pink Perfection’, ‘Ceb Dazzle’ and ‘Victoria Falls’. The results showed that the optimum concentration of sucrose contributes to the pollen germination. Two techniques of pollination were studied comparatively for pollen germination. It appeared that pollen tubes stopped growth and the pollen was not able to germinate on cut-style 48 h after pollination. The use of in vitro pollination showed that the pollen tubes can penetrate ovary into ovules 24 hours after pollination and the strong swelling of ovary happened 45 days after pollination. The hybrid seedlings were attained by embryo rescue.

**Key words:** *Lilium*; Pre-fertilization barrier; Pollen viability; Germination; Cut-style

## 1 目的、材料与方法

远缘杂交是百合育种的重要手段, 但其具有明显的不亲和性, 常表现在受精前和受精后障碍<sup>[1]</sup>。受精前障碍主要表现为花粉活力低、萌发力差、花粉管在花柱内不能正常生长或长度达不到胚珠不能完成受精作用, 主要采用切割花柱方式克服<sup>[2]</sup>; 受精后障碍为杂种胚发育不完全或中途败育, 通常采用胚抢救克服<sup>[3]</sup>。本试验探讨不同蔗糖浓度、贮存温度对百合花粉活力、萌发力的影响, 同时对不同授粉方式及试管受精技术进行研究, 为克服百合杂交受精前障碍提供理论参考和实际指导。

试验材料为百合野生种 ‘山丹’ (*Lilium pumilum*)、东方百合品种 ‘西伯利亚’ (*Siberia*)、麝香百合品种 ‘白狐’ (*White Fox*)、喇叭百合品种 ‘粉完美’ (*Pink Perfection*)、铁亚杂种系品种 ‘达诺’ (*Ceb Dazzle*) 和 ‘维多利亚瀑布’ (*Victoria Falls*)。花粉活力测定采用孔雀绿-酸性品红-桔红 G 混合试剂染色法<sup>[4]</sup>, 将少许花粉埋入染色剂中, 保持湿度, 在室温放置 7~8 h, 有活力的花粉被染成红色, 无活力的花粉为绿色, 显微镜下镜检、计数, 每品种取 3 个视野观察。花粉萌发力测定

收稿日期: 2005-12-16; 修回日期: 2006-04-14

基金项目: 科技部科技基础性工作项目 (2003DEB6J079); 国家 ‘863’ 计划项目 (2002AA24I051); 科技部社会公益项目 (2005D B3J022)

以蒸馏水为对照, 设蔗糖浓度为 7%、10%、13%、16%、20%, 采用正交试验设计, 以生长出花粉管的花粉为准。将各试材的新鲜花粉分别贮存在室温 (25 ℃)、5 ℃、- 20 ℃ 条件下, 在 0、5、10、15、20、25、30 d, 采用上述方法测定花粉活力和萌发力。

将 5 cm 长的达诺花朵去雄并套袋, 4~5 d 后, 当柱头分泌粘液时, 授以白狐新鲜花粉。采用两种授粉方式, 一是将花粉直接授于柱头上, 二是在子房上部 3 mm 处切掉花柱, 将花粉授在切割后的花柱上。授粉后 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、24、48、72 h, 取下花柱和子房放入 FAA 固定液 (甲醛 醋酸 50%酒精 =1 1 18 体积比) 中, 经 24 h 后用 50%酒精清洗 3 次, 每次 10 min。然后将样品放于 24 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液中, 60 ℃ 下进行软化至全部呈透明状, 再以蒸馏水漂洗 3 次去除 NaOH, 放入含 0.2 g/L 苯胺蓝 (aniline blue) 的 10.4 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸钾 (K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 中进行染色 3 h 以上, 将染色完全的材料置于载玻片上, 并用载玻片挤压<sup>[5]</sup>, 利用荧光显微镜观察、照相记录。

取 4~5 cm 长维多利亚瀑布和白狐的花蕾, 接种在含有 BA 0.1 mg/L 的 MS 培养基上, 4~5 d 后, 当柱头分泌粘液时, 将维多利亚瀑布的花柱在子房上部 3 mm 处切掉, 授白狐花粉, 按照与植株授粉相同的方法, 进行取样、固定、观察和照相。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 蔗糖浓度对百合花粉活力、萌发力的影响

从图 1 可看出, 蔗糖 10% 时山丹、西伯利亚和粉完美的花粉萌发率为最高, 分别达到 92%、42% 和 83%。当蔗糖浓度小于 7% 或大于 13% 时, 萌发率反而下降; 蔗糖浓度为 0 时, 花粉萌发率降至最低。可见, 在花粉萌发过程中, 适宜的蔗糖浓度对花粉的萌发和生长起着至关重要的作用。

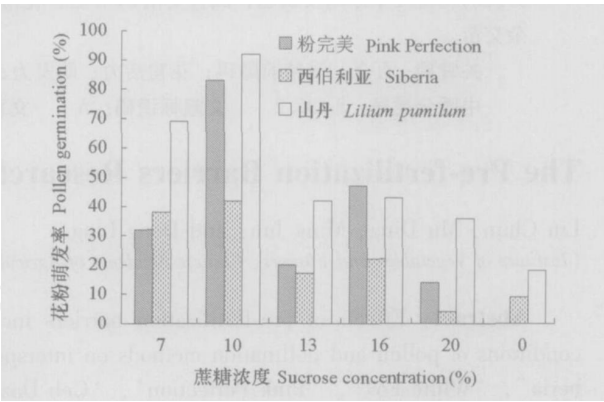


图 1 蔗糖浓度对百合花粉萌发的影响

Fig. 1 Effects of sucrose concentration on germination of Lilium pollen

### 2.2 不同贮存温度、时间对花粉活力、萌发力的影响

从表 1 可看出, 山丹的花粉在室温和 - 20 ℃ 条件下, 经 20 d 后, 萌发力急剧下降, 而 5 ℃ 下, 则

表 1 不同贮存温度、时间对百合不同品种花粉活力、萌发力的影响

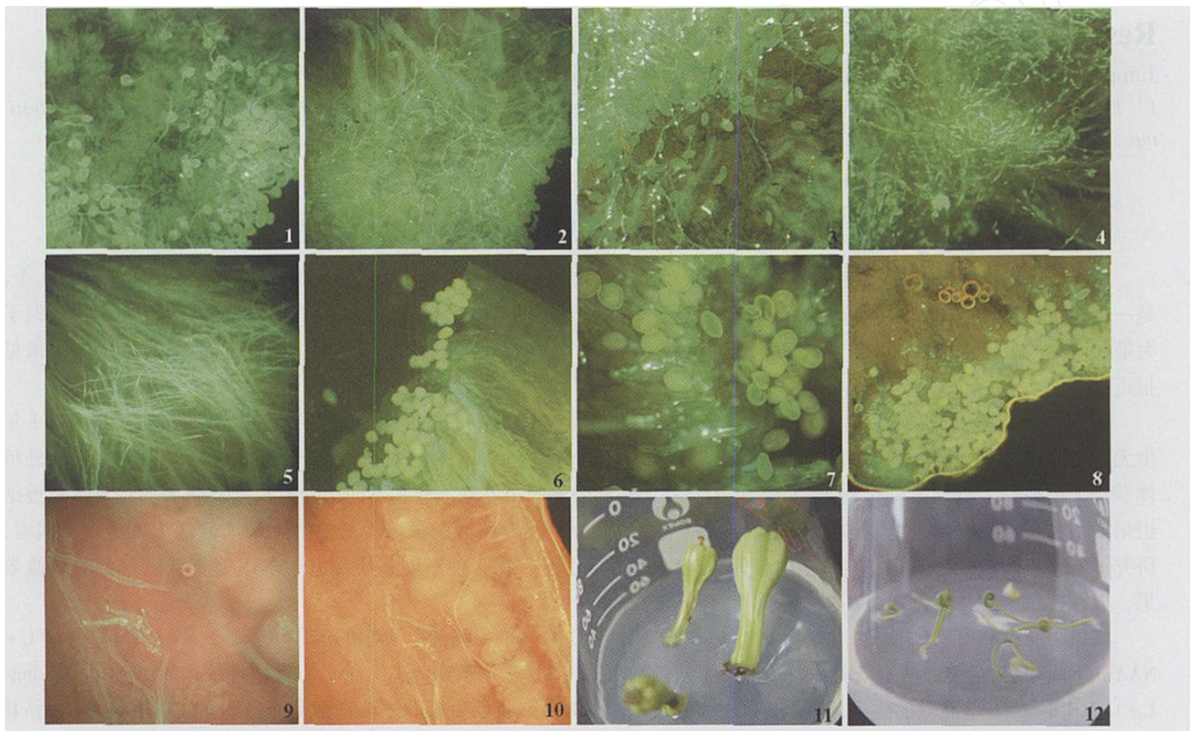
Table 1 The effects of temperature and time on germination and viability of Lilium pollen (%)

时间 Time (d)	温度 Temperature (℃)	萌发率 Germination				活力 Viability			
		山丹 <i>Lilium pumilum</i>	粉完美 Pink Perfection	西伯利亚 Siberia	白狐 White Fox	山丹 <i>Lilium pumilum</i>	粉完美 Pink Perfection	西伯利亚 Siberia	白狐 White Fox
0	25	91	89	82	82	98	95	97	90
5	25	60	87	13	93	90	96	93	93
	5	47	74	25	84	92	92	90	78
	- 20	45	85	40	78	95	92	91	74
10	25	56	65	14	84	96	69	92	91
	5	48	83	17	80	95	83	94	82
	- 20	43	80	5	87	95	88	92	90
15	25	46	59	15	85	98	88	91	88
	5	42	89	21	73	96	88	94	80
	- 20	46	83	6	83	85	88	92	87
20	25	39	46	18	79	95	97	92	87
	5	42	82	35	69	89	96	95	93
	- 20	39	83	4	88	81	81	89	89
25	25	9	30	17	65	94	90	89	88
	5	42	79	19	76	96	87	93	96
	- 20	5	79	4	73	97	84	91	76

保持稳定的萌发力。粉完美的花粉在室温条件下, 25 d后萌发力下降, 而在 5 、 - 20 贮存条件下, 还会保持较高的萌发力。西伯利亚花粉在室温、5 、 - 20 下, 5 d后萌发力急剧下降, 意味着西伯利亚花粉耐贮性较差。白狐的花粉在室温、5 、 - 20 下, 经 25 d后, 都保持着较高的萌发力。所以, 百合不同种、品种之间的花粉活力和萌发力在不同温度、时间贮存下差异很大。从试验结果看, 这 4个种或品种的花粉活力要远远大于同一条件下花粉萌发率, 表明了虽然有活力的花粉具有潜在的萌发力, 但不一定会萌发, 所以在杂交前, 检测百合花粉萌发力是杂交成功保证。

### 2.3 不同授粉方法对花粉萌发、生长及受精的影响

从试验结果看, 露地条件下, 花粉在柱头萌发所需的时间要远远少于在培养液中的时间。授粉后 10 h, 大量形态正常花粉管束即可穿进花柱, 此时花粉管长度大约为花柱长的 1/10 (图版 1, 2, 5), 48 h后, 花粉管的长度变化不大 (图版, 3), 授粉 96 h后, 花粉囊逐渐干瘪, 花粉管呈现断裂趋势 (图版, 4), 表明白狐花粉管本身长度不够, 不能到达子房进行受精, 或者由于不亲和性, 花粉管受到来自花柱阻力而停止生长, 所以切割花柱以缩短花柱长度是克服受精前障碍的一种有效方法。切割柱头授粉方式显示 (图版, 6~8) 授粉后 48 h, 花粉一直处于不萌发状态, 可以推测切割后的花柱缺少了具有良好缓冲能力的柱头及柱头分泌液来促使花粉萌发。由图版, 9~12可知, 采用试管受精方式, 保证受精过程中环境的稳定, 有助于杂交的成功, 提高结果率, 这与 Van Tugl J M等<sup>[6]</sup>的结论相一致的。所以在百合远缘杂交育种中, 将试管受精与胚培养结合起来是获得新品种行之有效的方法。



图版说明: 1. 授粉后 1 h ‘白狐’花粉在 ‘达诺’柱头上发育的情况 (×80); 2~4. 授粉后 10、48、96 h花粉在柱头上的发育 (×80); 5. 授粉后 10 h花粉管在花柱内生长的情况; 6~8. 切割花柱授粉后 1、10、48 h花粉发育的情况; 9、10. ‘白狐’做父本, ‘维多利亚瀑布’做母本, 试管内切割花柱授粉后 24 h花粉管到达胚珠的情况, 其中一部分花粉管生长呈现弯曲形状或达不到胚珠完成受精作用; 11. 授粉后 45 d果实的发育情况; 12. 试管授粉 90 d后经胚培养的杂种胚生长情况。

**Explanation of plates:** 1. The development of ‘White Fox’ pollen on the stigma of ‘Ceb Dazzle’ 1 h after pollination (×80); 2 - 4. The development of pollen on the stigma 10, 48, 96 h after pollination (×80); 5. The growth of pollen tube in the style 10 h after pollination; 6 - 8. The development of pollen pollinated on the cut-style 1, 10, 48 h after pollination; 9, 10. The pollen tube reaches the ovule 24 h after in vitro pollination; 11. The development of pod 45 d after in vitro pollination; 12. The growth of hybrid seedlings by the embryo rescue 90 d after pollination

## 参考文献:

- 1 Stebbins G L. The inviability, weakness, and sterility of interspecific hybrids. *Adv Genet*, 1958, 9: 147~215
- 2 Van Tuyl J M, Straathof T P, Bino R J, Kwakkenbos A A M. Effect of three pollination methods on embryo development and seedset in intra- and interspecific crosses between seven *Lilium* species. *Sex Plant Reprod*, 1998, 1: 119~123
- 3 Van Tuyl J M, Franken J, Jongerius M C, Lock C A M, Kwakkenbos A A M. Interspecific hybridization in *Lilium*. *Acta Hort*, 1986, 177: 591~595
- 4 陈家瑞. 植物孢粉染色技术综述及其应用. *植物学集刊*, 1991, 5: 269~276
- 5 Kho Y O, Bear J. Observing pollen tubes of florescence. *Euphytica*, 1968, 17: 298~302
- 6 Van Tuyl J M, Van Dien M P, van Creijl M G M, Van Kleinwee T C M, Franken J, Bino R J. Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. *Plant Sci*, 1991, 74: 115~126

## 木本婆婆纳 ‘维力镜像’ 的组培快繁技术

蒋亚莲<sup>1</sup> 熊 丽<sup>1</sup> 吴丽芳<sup>1</sup> 屈云慧<sup>1</sup> 陶 磅<sup>2</sup><sup>(1)</sup> 云南省农业科学院花卉研究所, 云南昆明 650205; <sup>(2)</sup> 云南省农业科学院园艺研究所, 云南昆明 650205)

## Research on Tissue Culture Technique of Hebe ‘Wiri Image’

Jiang Yalian<sup>1</sup>, Xiong Li<sup>1</sup>, Wu Lifang<sup>1</sup>, Qu Yunhui<sup>1</sup>, and Tao Pang<sup>2</sup><sup>(1)</sup> Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650205, China; <sup>(2)</sup> Horticultural Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650205, China)

关键词: 木本婆婆纳; 组织培养; 培养基; 外植体

中图分类号: S 68 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 03-0656-01

木本婆婆纳 (*Hebe*) 原产澳洲, 主要分布于新西兰和澳大利亚的东南部, 全属约 100 种, 栽培品种超过 800 个, 是一类观赏常绿花灌木。在澳洲和欧洲, 被广泛应用在观赏园艺和庭院绿化上, 并对 *Hebe* 属植物的育种和栽培做了大量的研究。近年来, 我国也开始逐步认识和引种 *Hebe* 属植物, 并有少量用于生产, 但组培方面的研究国内尚未见报道。

2002 年云南省农业科学院花卉研究所从国外引入木本婆婆纳种苗, 进行了一系列的栽培和繁殖试验。作者以 1 年生无病虫害木本婆婆纳 ‘维力系列’ 中的 ‘维力镜像’ (*Hebe* ‘Wiri Image’) 优选单株为试材, 取幼嫩茎尖作为外植体获得无菌植株, 研究了以 MS 和 Anderson 为基本培养基的不同培养基成分和不同植物生长调节剂水平对木本婆婆纳组培增殖和生根的影响, 以筛选合适的诱导培养基主成分及最佳增殖和生根培养基植物生长调节剂浓度组合。同时, 研究了室外自然光线下闭瓶培养和室内日光灯光线下闭瓶培养后在 3 种不同基质配方中木本婆婆纳组培苗的过渡效果, 以筛选最佳的过渡方式和基质。

结果表明: MS+BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L 是木本婆婆纳 ‘维力镜像’ 理想的诱导培养基, MS+BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L 是适宜的增殖培养基, 20 d 后繁殖系数可达 4.3, 平均苗高为 1.5 cm, 且叶色油绿; MS+NAA 0.3 mg/L+IAA 0.1 mg/L 是有效的生根培养基, 20 d 时生根率为 100%。将已生根的瓶苗置于室外自然光线下培养 7 d 后移栽过渡, 在腐殖土、珍珠岩比例为 3:1 时, 成活率可达 96%。

通过对木本婆婆纳 ‘维力镜像’ 组培技术的研究, 我们已初步掌握木本婆婆纳组织培养的技术和方法, 可在短期内获得大量再生优质植株, 加快繁殖速度, 相信在不久的将来木本婆婆纳将凭借其独有的品种性状、株型、花色在国内园林绿化、庭院栽培中占有一席之地。

收稿日期: 2005-11-16; 修回日期: 2006-01-26