

百合远缘杂交育种及其真实性鉴定

杨利平¹, 李蕊², 程千钉³

(¹长江师范学院生命科学与技术学院, 重庆 408100; ²河北农业大学园林与旅游学院, 保定 071001; ³河北农业大学园艺学院, 保定 071001)

摘要:以5种野生百合与2个杂种系百合品种为亲本,设计6个杂交组合进行远缘杂交,通过子房与田间培养成功获得远缘杂交种并采用形态学与RAPD分子标记对其真实性进行综合鉴定。结果显示,杂交组合麝香百合×条叶百合通过子房培养获得杂交苗3株;条叶百合×王百合、条叶百合×雪皇后、细叶百合(黑龙江种源)×雪皇后、细叶百合(黑龙江种源)×西伯利亚与细叶百合(承德种源)×西伯利亚各杂交组合均获杂交种子,结子率分别为27.0%、1.4%、31.5%、0.04%与0.08%。杂交种株型在苗期表现为偏母植株与中间型植株,其他形态学指标介于亲本之间或优于亲本;RAPD分子标记鉴定表明,杂种植株既扩增出相加性带型、单亲本带型,又扩增出融合双亲的特异性带型。获得杂交种为真杂种可用于百合品质育种。

关键词:百合;远缘杂交;真实性;形态学;RAPD分子标记

Wide Cross Breeding of Lily and Identification of Authenticity

YANG Li-ping¹, LI Rui², CHENG Qian-ding³

(¹College of Life Science and Technology, Yangtze Normal University, Chongqing 408100;

²College of Landscape Architecture and Tourism, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001;

³College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: Using five wild lily and two lily cultivars as parents. Designing six cross-combination for wide cross breeding. Distant hybrids was obtained successfully by field planting way and ovary culture finally. They were identified by morphology and RAPD molecular identification. The results showed that crossing combination *Lilium longiflorum* × *Lilium callosum* obtaining three hybrid seedlings by ovary culture, *Lilium callosum* × *Lilium regale*, *Lilium callosum* × 'Snow Queen', *Lilium pumilum* (Provenance of Heilongjiang) × 'Snow Queen', *Lilium pumilum* (provenance of Heilongjiang) × 'Siberia', *Lilium pumilum* (provenance of Chengde) × 'Siberia' obtaining hybrid seeds. The seed set ratio were 27.0%, 1.4%, 31.4%, 0.04% and 0.08% respectively. Plant type of hybrid seedlings are matroclinous plants and intermediate plants. The other indexes of morphology lies between parents or better than parents. RAPD molecular identification showed that the hybrids has not only additive banding, solo-parent banding, but also extraordinary banding which is the fusion of its parents, and new bandings appearing in the patterns. The hybrids are true hybrid and can be used to quality breeding of Lily.

Key words: Lily; Wide cross breeding; Authenticity; Morphology; RAPD molecular identification

百合类植物在国际花卉贸易份额中的不断提高,促进了其新品种的选育和推广。种内与种间杂交是百合育种最重要的途径,可人为将有利的遗传性状自由组合,在田间得到表现后即可获得新品种^[1]。但百合杂交具有明显的不亲和性,主要表现为受精前与受精后障碍,常使杂种胚早期败育,致使在田间很难得到杂种种子并加以繁

殖,即使获得杂交种子也可能是由于假杂交所致。鉴于育种中杂种胚和胚乳的不亲和导致的杂种胚败育,可采用胚挽救技术来解决,但在培养过程中,外植体所携带母体组织也可能诱导成苗。因此,克服杂交障碍获得杂交种并对其真实性进行鉴定对于百合育种工作具有非常重要的意义。

收稿日期:2010-09-08 修回日期:2011-05-19

基金项目:重庆市自然科学基金(CSTC,2011BB1001);长江师范学院科研启动基金

作者简介:杨利平,教授,研究方向为花卉种质资源及育种。E-mail:ylp1962@yahoo.com.cn

对于克服百合杂交障碍的研究,目前主要集中在柱头涂抹激素^[2]、KCl 处理柱头使其变性^[3]、柱头嫁接^[4]、花粉蒙导^[5]和切割花柱授粉^[6]等,其中以切割花柱授粉方法简单、易操作、无严格技术要求,并且对克服百合杂交障碍具有一定效果。

基于 PCR 基础上的 RAPD 标记分析技术可在 DNA 水平上鉴定体细胞杂种,其速度快,稳定性好,准确性高。李富生等^[7]用染色体和 RAPD 技术在幼苗期鉴定了甘蔗杂交种;马鸿翔等^[8]用 GISH 和 RAPD 检测黄毛草莓 × 凤梨草莓种间杂种;Abe 等^[9]在研究亚洲百合杂种系花色素苷形成的基因分析中,利用 17 个 10bp、37 个 15bp、14 个 20bp 的随机引物和 33 个 ISSR 引物,绘制出遗传图谱,这些引物在百合染色体上得到锚定,有确切位点,可以作为百合 RAPD 分析的基础;Persson 等^[10]和 Wen 等^[11]用 RAPD 标记分析了星叶百合和麝香百合居群内和居群间的遗传变异,研究表明,RAPD 分子标记在杂种鉴定领域已得到成熟的发展与应用。花色、香气和抗性品种的获得一直是百合育种的热点,本试验以不同花色、香气与抗性的百合为亲本,采用切割花柱授粉进行远缘杂交,结合形态学与 RAPD 分子标记对杂交种真实性进行综合鉴定,旨在获得花色丰富、花香淡雅,同时具有一定抗性的百合新种质,为百合资源创新提供基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以 5 种野生百合与 2 个杂种系百合品种为试验材料。分别为原生种麝香百合 (*Lilium longiflorum*) (Ty)、条叶百合 (*Lilium callosum*) (T)、王百合 (*Lilium regale*) (W)、细叶百合 (*Lilium pumilum*) (Xh-黑龙江种源与 Xc-承德种源)、雪皇后 (*Lilium longiflorum*, 'Snow Queen') ('SQ')、西伯利亚 ('S')。

1.2 试验方法

1.2.1 杂交方法 设计麝香百合 × 条叶百合、条叶百合 × 王百合、条叶百合 × 雪皇后、细叶百合(黑龙江种源) × 雪皇后、细叶百合(黑龙江种源) × 西伯利亚与细叶百合(承德种源) × 西伯利亚 6 个杂交组合进行杂交,开花前 3d 对母本进行去雄、套袋,开花当天 9:00 - 10:00 时采用切割柱头授粉,授粉后继续套袋。授粉后 20d 左右,部分雌蕊用来作为子房培养,部分留在植株上直到其完全成熟或干枯,作为田间对照试验。

1.2.2 培养方法 授粉后 20d 左右切取膨大子房,首先用 70% 乙醇消毒 1min,0.1% HgCl₂ 灭菌 8min,无菌水冲洗 5 次。将子房切成 0.3cm 厚度圆形切片,再沿直径方向切为半圆形,接入子房培养基 (MS + 0.01mg/L NAA) 中培养,蔗糖浓度为 3.0% (W/V),用 0.65% (W/V) 琼脂粉固化。接种子房在温度 25℃,光照 16h/d,光照强度 2000lx 条件下培养。20 ~ 30d 后,将其含有发育膨大胚珠的切片剖开,剥离出膨大胚珠,在 MS 培养基上进行培养。田间获得种子经消毒后于 MS 培养基上进行培养。最终在快繁培养基 (MS + 0.5mg/L 6-BA + 0.1mg/L NAA) 进行快繁培养,当幼苗长至约 5cm 时转入生根培养基 (1/2MS + 0.25mg/L NAA) 中培养。

1.2.3 计算方法 坐果率 (%) = 坐果数/授粉花朵数 × 100%;有胚种子率 (%) = 有胚种子数/胚珠数 × 100%;成苗率 (%) = 成苗数/接种数 × 100%。

1.2.4 形态学鉴定 对获得的百合杂种及部分亲本幼苗在同等温度与光照条件下进行组培快繁,部分亲本采用种子快繁。将快繁后的大量幼苗转入生根培养基,25d 后对百合组培苗进行形态学指标观察与统计并照相,分析杂交种及亲本株高、叶形、根数、根长、生根率等形态学指标参数,每形态指标观察统计 200 棵幼苗。分别观察 50 个视野统计叶片气孔密度。

1.2.5 RAPD 分子标记 供试材料总 DNA 提取采用改良 CTAB 法^[11]。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测样品 DNA 的有无和分子量的大小。用紫外/可见分光光度计检测 DNA 浓度和纯度:取 5μl 样品,加 1995μl 重蒸馏水,分别测定 260nm 和 280nm 处的吸光度。根据下式计算样品 DNA 的含量:浓度 (μg/μl) = OD₂₆₀ × 50 × 稀释倍数/1000。式中:50 为校正系数,根据平均碱基组成的 DNA 的摩尔吸光系数而定。根据公式:纯度 = OD₂₆₀/OD₂₈₀ 计算样品 DNA 的纯度,如果比值在 1.5 与 2.0 之间,样品则被认为是纯的。

供试材料的 RAPD 引物筛选。供试引物为上海生物工程公司生产的 lw698251 ~ lw698351 共 100 条随机引物。采用单引物进行 PCR 扩增筛选引物的方法,根据扩增产物在 1.6% 琼脂糖电泳条件下条带有无、条带多少、可重复性,确定扩增效果较好的 14 条引物为扩增引物,重新排序命名为 1 ~ 14 号引物(表 1)。

表 1 供试的随机引物及序列

Table 1 Random primers employed in the experiment and their sequences

引物 Primers	引物序列 (5'-3') Sequences	引物 Primers	引物序列 (5'-3') Sequences
1	CCCCGGTAAC	8	CTCTGTTCCG
2	GGACCCTTAC	9	TGGTCGCAGA
3	CCACAGCAGT	10	CCCGCTTTCC
4	TCCCGCCTAC	11	GTGACGTAGG
5	AGATCCCGCC	12	CCCTGTCGCA
6	CAATGCCCGT	13	AAAGCTGCGG
7	CCCAGCTAGA	14	ACCCCGGAAG

PCR 扩增反应条件。PCR 反应体系为 25 μ l 体系, 10 \times PCR buffer (不含 $MgCl_2$) 2.5 μ l, 25mM Mg^{2+} 2.0 μ l, 2.5mM dNTP 混合液 1.0 μ l, TaqDNA 聚合酶 0.3 μ l, DNA 模板 1.0 μ l, 引物 1.0 μ l, 灭菌重蒸水 17.2 μ l。PCR 反应在 PCR 热循环仪上进行, PCR 反应程序为:

94 $^{\circ}C$ 30s
 94 $^{\circ}C$ 10min \rightarrow 36 $^{\circ}C$ 40s
 72 $^{\circ}C$ 60s
 } 40 个循环 \rightarrow 72 $^{\circ}C$ 10min \rightarrow 4 $^{\circ}C$ 保存

表 2 种间杂交亲和性结果

Table 2 The results of crossing-compatibility between the different hybrid group

杂交组合 Cross combination	培养方法 Culture method	授粉花朵数 No. of pollinated flowers	坐果数 No. of fruit set	坐果率(%) Fruit setting rate	有胚种子数 Embryos number of seed	有胚种子率(%) Embryos rate of seed	成苗数 No. of seedling	接种数 No. of Inoculation	成苗率(%) Seedling rate
Ty \times T	子房培养	25	2	8	—	0	3	0	—
	田间对照培养	30	0	0	0	0	0	0	0
T \times W	子房培养	30	0	0	—	0	0	0	—
	田间对照培养	26	1	4	12	27	2	12	17
T \times 'SQ'	子房培养	35	0	0	—	0	0	0	—
	田间对照培养	33	4	12	26	1.4	7	26	27
Xh \times 'SQ'	子房培养	60	0	0	—	0	0	0	—
	田间对照培养	65	5	8	38	31.5	9	38	24
Xh \times 'S'	子房培养	150	0	0	—	0	0	0	—
	田间对照培养	152	9	6	13	0.04	1	13	7.7
Xc \times 'S'	子房培养	30	0	0	—	0	0	0	—
	田间对照培养	37	7	19	23	0.08	5	23	22

2.2 杂交种及亲本形态学性状

由株型、株高、植株长势观察到 4 种杂交种株型

电泳分离。电泳凝胶是含 EB 的 1.6% 的琼脂糖, 电泳缓冲液为 0.5 \times TBE, 电压为 140V, 电泳结束后, 在 WD-9403C 型紫外透射反射仪下检测扩增谱带效果, 用 Canon-PC1044 型数码相机拍照记录电泳结果并进行谱带分析。谱带分析中字母 M、Z、F 分别指代母本、杂交种与父本, 最右侧 M 指代 Marker。

2 结果与分析

2.1 远缘杂交

6 个杂交组合, 根据实际情况分别授粉不同的花朵数。采用常规人工去雄杂交方法留在田间的杂交组合条叶百合 \times 王百合、条叶百合 \times 雪皇后、细叶百合(黑龙江种源) \times 雪皇后、细叶百合(黑龙江种源) \times 西伯利亚与细叶百合(承德种源) \times 西伯利亚均获得有胚种子, 结子率分别为 27.0%、1.4%、31.5%、0.04% 和 0.08%; 杂交组合麝香百合 \times 条叶百合未获得饱满种子, 结子率为 0。授粉 20d 左右取子房进行离体培养, 仅杂交组合麝香百合 \times 条叶百合通过子房培养获得杂种幼苗 3 株, 其余各杂交组合均未获得杂种幼苗(表 2)。

属于中间型植株(图 1), 条叶百合 \times 王百合与细叶百合(黑龙江种源) \times 西伯利亚两杂交种与母株完

全相似,属偏母植株。从叶形、叶长宽比、叶基部颜色观察到条叶百合×雪皇后与细叶百合(承德种源)×西伯利亚与母本完全相似,属偏母植株,其余4种均介于亲本之间(图2)。由根数,根长、根色统

计观察到条叶百合×王百合、条叶百合×雪皇后、细叶百合(黑龙江种源)×雪皇后、细叶百合(黑龙江种源)×西伯利亚属中间型植株(图3),其余两种属偏母植株。

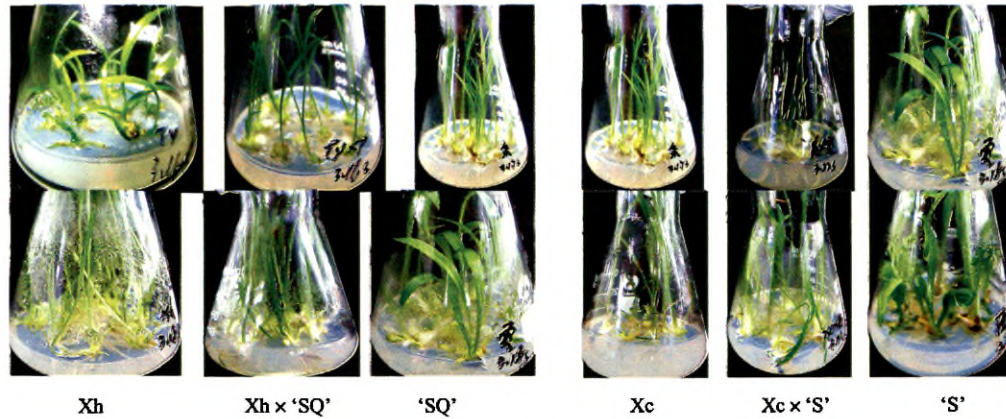


图1 杂交种与亲本植株形态特征

Fig.1 The morphological traits of hybrid and parentstrain

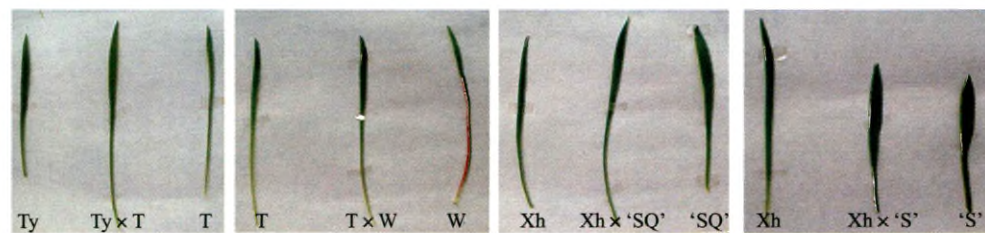


图2 杂交种与亲本基生叶形态特征

Fig.2 The traits of leaf shapes in hybrid and parentstrain

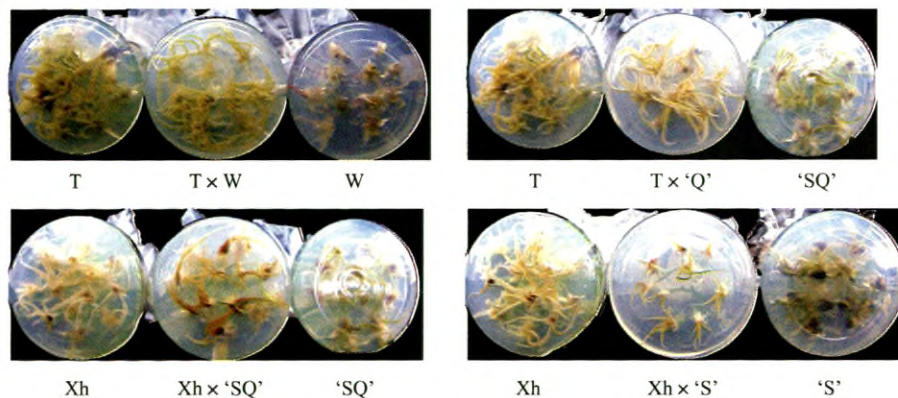


图3 杂交种与亲本根形形态特征

Fig.3 The rooting traits of hybrid and parentstrain

各杂交种形态学指标见表3。条叶百合×王百合、条叶百合×雪皇后株高均优于亲本;条叶百合×王百合、细叶百合(黑龙江种源)×西伯利亚与细叶百合(承德种源)×西伯利亚生根数较亲本多;麝香百合×条叶百合、细叶百合(承德种源)×西伯利

亚较亲本根系长;条叶百合×雪皇后、细叶百合(黑龙江种源)×雪皇后生根率优于亲本;条叶百合×王百合气孔密度较亲本大。其余参数介于亲本之间,表现出一定的杂交优势。

表 3 亲本及杂交种形态学性状

Table 3 the morphological traits of Parentsand and Offspring

亲本及杂交种	株高 (cm)	根数 (条)	根长 (cm)	生根率 (%)	气孔密度 (个/mm ²)
Parentsand and offspring	Stem length	Toot number	Toot length	Tooting rate	Stomatal density
Ty	4.58 ± 0.13	3.5 ± 0.19	0.74 ± 0.06	87.48 ± 0.01	5.7 ± 0.01
Ty × T	5.56 ± 0.07	6.2 ± 0.19	1.48 ± 0.08	97.10 ± 0.02	6.8 ± 0.03
T	7.91 ± 0.24	6.8 ± 0.26	1.42 ± 0.06	98.99 ± 0.01	12.3 ± 0.02
T × 'SQ'	6.90 ± 0.19	6.5 ± 0.16	1.63 ± 0.03	98.99 ± 0.01	8.9 ± 0.04
'SQ'	5.88 ± 0.07	6.0 ± 0.29	1.81 ± 0.08	94.61 ± 0.01	8.2 ± 0.02
T × W	7.96 ± 0.06	6.8 ± 0.34	1.20 ± 0.03	96.82 ± 0.01	12.9 ± 0.03
W	7.49 ± 0.13	2.4 ± 0.10	1.04 ± 0.01	95.03 ± 0.02	11.5 ± 0.03
Xh	9.32 ± 0.08	4.2 ± 0.26	1.40 ± 0.03	95.62 ± 0.00	6.4 ± 0.02
Xh × 'SQ'	9.29 ± 0.06	5.0 ± 0.25	1.64 ± 0.06	96.61 ± 0.02	6.9 ± 0.04
Xh × 'S'	6.61 ± 0.30	5.1 ± 0.04	1.25 ± 0.06	97.53 ± 0.02	7.6 ± 0.05
'S'	5.38 ± 0.12	4.6 ± 0.21	1.16 ± 0.06	98.32 ± 0.01	10.8 ± 0.03
Xc	7.25 ± 0.07	3.4 ± 0.16	1.24 ± 0.04	92.02 ± 0.03	4.7 ± 0.02
Xc × 'S'	6.43 ± 0.14	5.2 ± 0.12	1.49 ± 0.02	94.11 ± 0.05	6.4 ± 0.05

2.3 RAPD 分子鉴定

2.3.1 样品 DNA 分子量检测 检测结果表明:从百合中提取到了 DNA,并且可以看出点样孔处发亮,表明供试 DNA 样品中含有杂蛋白(图 4)。

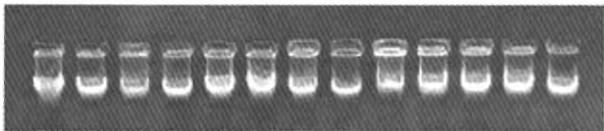


图 4 DNA 经 0.8% 琼脂糖电泳检测

Fig. 4 DNA examined by 0.8% agar

2.3.2 样品 DNA 纯度及浓度检测 表 4 可以看出,百合杂交种及亲本 DNA 样品纯度与浓度均很高,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.5 ~ 2.0 之间,DNA 含量在 0.6 ~ 0.8 μg/μl,可用于 RAPD 分析。

表 4 样品 DNA 纯度及浓度的检测结果

Table 4 DNA purity and concentration of the samples

杂种来源	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	纯度	浓度
Source of hybrids			Purity	Concentration
Ty	0.039	0.020	1.950	0.665
Ty × T	0.037	0.024	1.542	0.636
T	0.032	0.019	1.684	0.694
T × 'SQ'	0.036	0.024	1.500	0.717
'SQ'	0.032	0.020	1.600	0.753
T × W	0.031	0.020	1.550	0.619
W	0.039	0.022	1.773	0.775
Xh	0.034	0.020	1.700	0.682
Xh × 'SQ'	0.038	0.024	1.583	0.756
Xh × 'S'	0.035	0.021	1.667	0.698
'S'	0.033	0.021	1.571	0.649
Xc	0.040	0.021	1.905	0.695
Xc × 'S'	0.039	0.022	1.773	0.775

2.3.3 RAPD 标记进行杂交种真实性鉴定 杂种带型如果同时有父本和母本带型,则确定为真杂种,如仅有母本带型,则是子房壁组织发育而来的幼苗^[12-13],可能为假杂种。

鉴定结果表明,麝香百合 × 条叶百合中(图 5),1 号引物杂交种 3 条谱带同母本,2 条同父本;2 号引物与父母本均有 2 条共有带;3 号引物部分同母本,与父本有 2 条共有带,且在 700bp 处扩增出特异带型;5 号引物部分同父本,部分同母本,此杂交种具有亲本共有带型和新的特异带型。

图 6 表明,杂交种条叶百合 × 王百合 3 ~ 7 号引物谱带均与双亲有一条相加带型。3 号引物与母本有 2 条共有带,与父本有 3 条共有带,在 400bp 处有一特异性带;4 号引物与母本、父本均有 3 条共有带,且在 1500bp 处有一条特异带;5 号引物部分同母本,部分同父本;6 号引物与母本、父本均有 1 条共有带,且在 1000bp 处有一条特异性带;7 号引物部分同母本,部分同父本,在 800bp 有特异性谱带。

条叶百合 × 雪皇后图谱分析中(图 7),4 号和 7 ~ 9 号引物谱带均与亲本有相加带型。4 号引物与父母本均有 2 条共有带;7 号引物与父母本均有一条共有带;8 号引物与母本有 4 条共有带,与父本有 2 条;9 号引物部分同父本部分同母本;10 号引物与父母本均有一条单亲带型,且在 550bp 处有一条特性性带。表明此杂交种具有亲本相加带型和新的特异带。

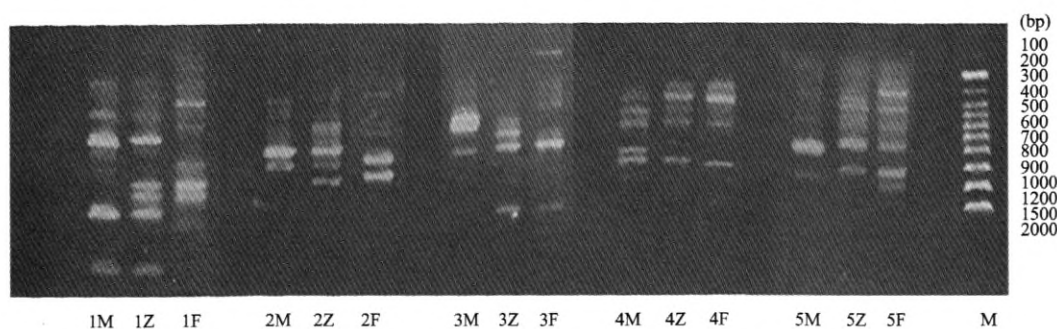


图 5 1~5 号引物对杂交种麝香百合 × 条叶百合的鉴定结果

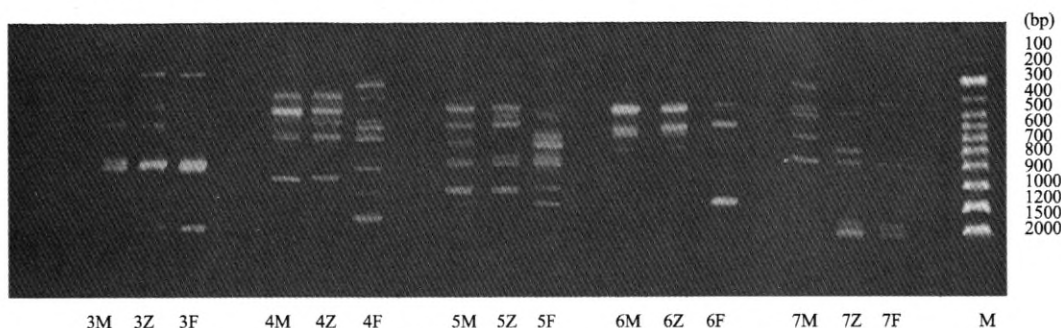
Fig.5 Results of hybrid *Lilium longiflorum* × *Lilium callosum* identified with primer 1-5

图 6 引物 3~7 号引物对杂交种条叶百合 × 王百合的鉴定结果

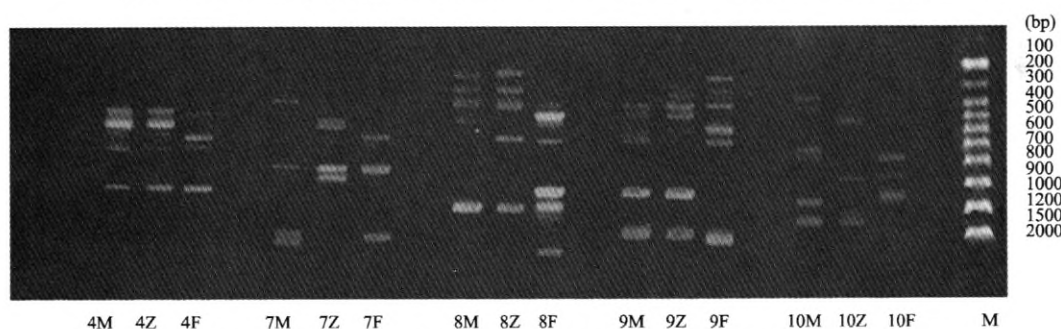
Fig.6 Results of hybrid *Lilium callosum* × *Lilium regale* identified with primer 3-7

图 7 引物 4、7~10 号引物对杂交种条叶百合 × 雪皇后的鉴定结果

Fig.7 Results of hybrid *Lilium callosum* × 'Snow Queen' identified with primer 4,7 and 8-10

图 8 中,杂交种细叶百合(黑龙江种源) × 雪皇后 5 条引物谱带亦均与亲本有相加带型。7 号引物与亲本共有两条带,且在 1500bp 处有一特异带;8 号引物部分同母本部分同父本,且在 400bp 与

800bp 处有两条特异性带;9 号引物与亲本均有 3 条共有带;11 号引物部分同母本,部分同父本,且在 700bp 处有一条特异性带;12 号引物部分同母本,部分同父本。

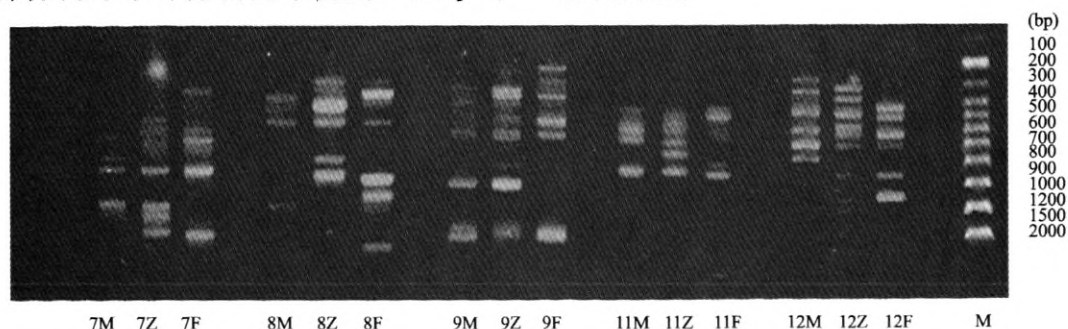


图 8 引物 7~9 号、11、12 号对杂交种细叶百合(黑龙江种源) × 雪皇后的鉴定结果

Fig.8 Results of hybrid *Lilium pumilum* (Provenance of Hei Long-jiang) × 'Snow Queen' identified with primer 7-9 and 11,12

图 9 表明,杂交种细叶百合(承德种源)×西伯利亚除 7、10 号引物外,其他引物谱带均与亲本有相加带型。7、10、13 号引物谱带与亲本均有 2 条共有

带;12 号引物与母本有 4 条共有带,与父本有 3 条共有带;14 号引物与亲本均有 2 条共有带,且在 1300bp、1600bp 处有两条特异性谱带。

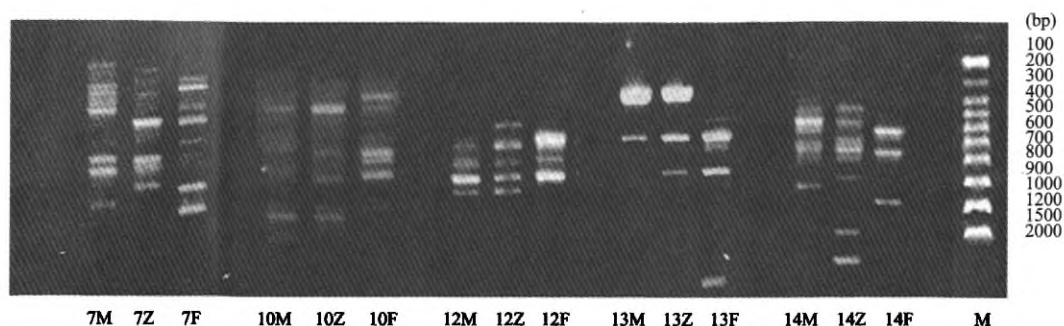


图 9 引物 7 号、10 号、12~14 号对杂交种细叶百合(承德种源)×西伯利亚的鉴定结果

Fig. 9 Results of hybrid *Lilium pumilum* (provenance of ChengDe) × 'Siberia' identified with primer 7, 10 and 12-14

在细叶百合(黑龙江种源)×西伯利亚图谱分析中(图 10),5 条引物谱带均与亲本有相加带型。7 号引物与母本有 2 条共有带,与父本有 3 条,且在 1200bp 处有一条特异性带;8、9 号引物部分同母本,

且 9 号引物在 1500bp 处有一条特异性带;12 号引物与母本有 5 条共有带,与父本有 3 条共有带;13 号引物与亲本均有 3 条共有带。

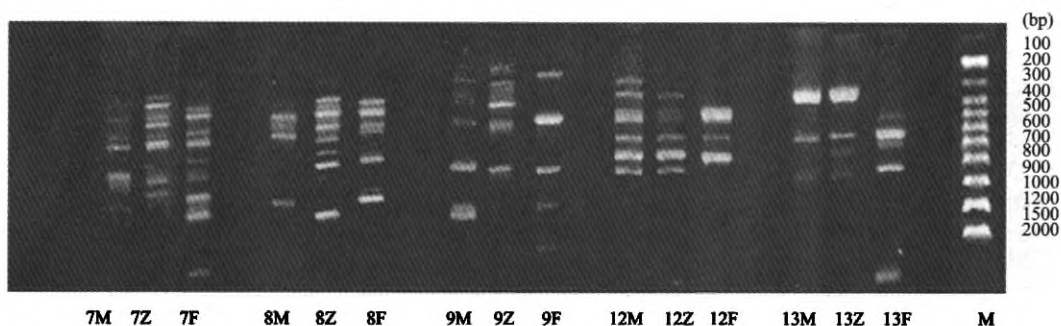


图 10 引物 7~9、12、13 号对杂交种细叶百合(黑龙江种源)×西伯利亚的鉴定结果

Fig. 10 Results of hybrid *Lilium pumilum* (provenance of HeiLong-jiang) × 'Siberia' identified with primer 7-9 and 12, 13

3 结论与讨论

采用切割花柱授粉进行远缘杂交,通过子房培养与田间种植成功获得远缘杂交苗。杂交组合麝香百合×条叶百合通过子房培养获得杂种幼苗 3 株,未获得饱满种子;条叶百合×王百合、条叶百合×雪皇后、细叶百合(黑龙江种源)×雪皇后、细叶百合(黑龙江种源)×西伯利亚与细叶百合(承德种源)×西伯利亚各杂交组合均获得饱满种子,结子率分别为 27.0%、1.4%、31.5%、0.04% 和 0.08%,表明由于杂交组合不同,杂交亲和性与结实率差异较大。形态学鉴定杂交种中存在偏母型植株,可能有假杂种。分子标记鉴定表明,杂种苗与父母本均有相加带型且扩增出特异性带型,6 个远缘杂交种均为真

杂种。

百合杂交不亲和机制主要由花柱控制,切割花柱后便可消除不亲和障碍^[14],但并非所有组合都可以通过切割花柱来克服杂交障碍,多数组合利用柱头直接授粉所得胚的比例要高于切割手段^[15]。研究表明,百合亲本组合方式、花粉活力及花发育时期对杂交结子亦有很大的影响^[16]。本试验采用切割柱头授粉各组合坐果率与结子率差异较大,其中条叶百合×王百合、细叶百合(黑龙江种源)×雪皇后结子率较高,分别达到 27.0% 与 31.5%,条叶百合、王百合、细叶百合属野生种,较其他百合花粉活力高^[17],本身自交结实性较好^[18-19]。雪皇后花粉具较高的生活力,高达 54.5%^[20],通常可保证试验授粉正常进行。但本试验以其作父本较高的结实率与孙

晓梅等^[21]、刘凤栾等^[22]研究结果不一致,可能由于杂交组合不同,因为亚洲百合花粉活力较野生百合低^[17],同时普瑞头与俄维农本身自交结实很差。细叶百合(黑龙江种源)×西伯利亚与细叶百合(承德种源)×西伯利亚结实率仅0.04%、0.08%,结实率偏低,虽然西伯利亚总体花粉活力较高^[23-24],但通常以其作父本进行远缘杂交亲和性很低,不易获得杂交种子,这与刘凤栾等^[22]、夏晶等^[24]、雷家军等^[25]研究结果一致。麝香百合杂种系品种杂交亲和性的研究较多,以其作母本亦可不同程度地获得有胚种子^[26-27]。但对于麝香百合原生种杂交的亲性和性尚未有报道,对于本试验杂交组合中原生种麝香百合×条叶百合杂交未获得有胚种子的现象应进一步进行深入的研究。

由于杂交种的遗传物质异源性很强,杂种一代通常表现为很广泛的分离性,性状大都表现为介于两个亲本性状之间或更靠近某一亲本的性状,如芳香性、颜色、花形、叶形、花着生方向等。在黄济明等^[28]的玫红百合试验中,杂种F₁均结合了双亲的特有性状。杨利平等^[29]做的毛百合×细叶百合试验中,毛百合幼苗属子叶留土类型,细叶百合幼苗属子叶出土类型,杂种幼苗有子叶出土型、子叶留土型及中间类型,其中以中间类型所占比例最大。本试验通过形态学鉴定得出同样的结论,杂交种幼苗以结合双亲特有性状的中间型植株为多,同时存在少量偏母植株,使杂交种的真实性在形态学上有一定的不确定性。


杂交育种过程中,双亲遗传物质的交换与重组是产生变异的基础,但在实践中一直缺乏对这一过程详细了解的有效手段。本研究结果表明 RAPD 标记对百合杂交种的真实性鉴定是快速、有效的,可以弥补形态学鉴定的不足。试验表明,杂种既具有相加性带型、单亲本带型又具有融合双亲的特异带,并出现了新的带型。但 RAPD 技术也存在一定的不稳定性,随机性较高,建议在实际工作中可采用多种鉴定方法对杂种进行辅助鉴定并相互验证,可靠性会更大。

致谢:河北经贸大学齐靖博士在分子鉴定试验期间给予了支持,同时得到河北农业大学兰倩、李芳、赵翠琴等同学在试验中的帮助,在此表示感谢。

参考文献

- [1] Jaap M, Hein C M. Lily breeding in the Netherlands [J]. Acta Horticulturae, 1996, 414: 35-45
- [2] Van Creijl M G M, Kerck Hoffs D M F J, Van Tuly J M. Application of fourpollination techniques and oshormone treatment forby-pass inter-specific crossing barriers in *Lilium* L. [J]. Proc Cadic Acta Hort, 2000, 508: 267-274
- [3] 刘凤栾, 杨利平, 尚爱芹, 等. KCl 处理对百合柱头生理及结实的影响[J]. 武汉植物学研究, 2009, 27(4): 403-406
- [4] Van Tuyt J M, Van Dien M P. Application of in vitro pollination, ovary culture and embryo rescue for overcoming incongruity Barriers in interspecific *Lilium* crosses [J]. Plant Sci, 1991, 74: 115-126
- [5] 罗凤霞, 年玉欣, 孙晓梅, 等. 4 种授粉方法对切花百合不同杂交组合结籽量的影响[J]. 园艺学报, 2005, 32(4): 729-731
- [6] 刘春, 穆鼎, 明军, 等. 百合种间杂交受精前障碍的研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 653-656
- [7] 李富生, 林位夫, 何顺长. 甘蔗杂种的染色体和 RAPD 鉴定研究[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(1): 48-52
- [8] 马鸿翔, 陈佩度, 余桂红, 等. 利用 GISH 和 RAPD 检测黄毛草莓×凤梨草莓种间杂种[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(3): 256-261
- [9] Abe H, Nakano M, Nakatsuka A. Genetic analysis of floral anthocyanin pigmentation in Asiatic hybrid lily using molecular linkage maps [J]. Theor Appl Genet, 2002, 105(8): 1175-1182
- [10] Persson H A, Kjell L, Nybom H. RAPD Analysis of Genetic Variation Within and Among Populations of Turk's-Cap Lily (*Lilium martagon* L.) [J]. Hereditas, 1998, 128(3): 213-220
- [11] Wen C S, Hsiao J Y. Altitudinal Genetic differentiation and Diversity of Taiwan Lily (*Lilium longiflorum* var. *formosanum*; Liliaceae) using RAPD markers and morphological characters [J]. Intern J Plant Sci, 2001, 162(2): 287-301
- [12] 桃联安, 楚连璧, 经艳芬, 等. 云南刺手薯 82-114 种间杂交后代 SSR 分子标记鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(1): 132-135
- [13] 史永忠, 郭文武, 邓秀新. 柑桔 RAPD 技术体系建立与体细胞杂种鉴定[J]. 园艺学报, 1998, 25(2): 105-110
- [14] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999
- [15] 黄济明. 采用切割花柱和幼胚离体培养方法培育百合种间远缘杂交种[J]. 种子, 1983(3): 24-27
- [16] 屈云慧, 熊丽, 陈卫民, 等. 百合育种研究进展[J]. 西南农业学报, 2004(17): 471-478
- [17] 郝瑞娟, 王周峰, 穆鼎. 不同百合花粉活力的测定方法比较[J]. 北方园艺, 2008(11): 95-97
- [18] 杨利平, 张敦方, 丁冰, 等. 条叶百合×王百合种间杂种的育成[J]. 东北林业大学学报, 1998, 26(2): 37-40
- [19] 杨利平, 孙晓玉. 细叶百合的生殖特性和繁育规律研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(5): 918-921
- [20] 罗建让, 张延龙, 张林华. 克服百合自交及杂交障碍方法的初步研究[J]. 西北农业学报, 2007, 16(4): 260-263
- [21] 孙晓梅, 崔文山, 毛洪玉, 等. 不同授粉方法对两种亚洲百合杂交结实影响的研究[J]. 辽宁农业科学, 2001(6): 9-13
- [22] 刘凤栾, 杨利平, 尚爱芹, 等. 百合远缘杂交的胚囊和胚胎发育及胚挽救[J]. 河北农业大学学报, 2009, 32(2): 42-45
- [23] 张永平, 乔永旭, 陈超, 等. 东方百合西伯利亚花粉生活力测定及其主要影响因子[J]. 江苏农业科学, 2009(1): 145-146
- [24] 夏晶, 吴学尉, 崔光芬, 等. 西伯利亚与黄天鹅正反交实验及杂种胚离体培养[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2010, 32(6): 64-68
- [25] 雷家军, 林翼飞. 卷丹与亚洲百合和东方百合种间杂交[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(12): 37-38
- [26] 罗建让, 牛立新, 张延龙, 等. 百合野生种及品种交配亲和性的研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(2): 112-116
- [27] 周厚高, 张西丽, 周焱, 等. 百合品种交配亲和性研究[J]. 广西农业生物科学, 2000, 19(4): 223-227
- [28] 黄济明, 赵晓艺. 玫红百合为亲本育成百合种间杂种[J]. 园艺学报, 1990, 17(2): 153-156
- [29] 杨利平, 马宪红, 丁冰, 等. 百合花卉种间杂交种的培育[J]. 东北林业大学学报, 1997, 25(1): 29-32

百合远缘杂交育种及其真实性鉴定

作者: 杨利平, 李蕊, 程千钉, [YANG Li-ping](#), [LI Rui](#), [CHENG Qian-ding](#)
作者单位: [杨利平, YANG Li-ping\(长江师范学院生命科学与技术学院, 重庆, 408100\)](#), [李蕊, LI Rui\(河北农业大学园林与旅游学院, 保定, 071001\)](#), [程千钉, CHENG Qian-ding\(河北农业大学园艺学院, 保定, 071001\)](#)
刊名: [植物遗传资源学报](#) 
英文刊名: [Journal of Plant Genetic Resources](#)
年, 卷(期): 2011, 12(6)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201106010.aspx