



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101411304 B

(45) 授权公告日 2011. 08. 10

(21) 申请号 200810301666. 5

(22) 申请日 2008. 05. 19

(73) 专利权人 贵州省园艺研究所

地址 550006 贵州省贵阳市小河区金竹镇

专利权人 云南大学

云南省农业科学院花卉研究所

(72) 发明人 郑思乡 刘妍 刘飞虎 王继华

刘武林 赵宁 张朝君

(74) 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所

52100

代理人 程新敏

(51) Int. Cl.

A01H 1/02 (2006. 01)

A01H 1/04 (2006. 01)

A01H 4/00 (2006. 01)

C12N 5/04 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101040600 A, 2007. 09. 26, 全文.

CN 1994067 A, 2007. 07. 11, 全文.

罗建让等. 克服百合杂交及杂交障碍方法的初步研究. 《西北农业学报》. 2007, 第 16 卷 (第

4 期), 260-263.

刘武林等. 百合离体授粉组间杂交研究初报. 《云南农业大学学报》. 2008, 第 23 卷 (第 1 期), 122-125.

樊金萍等. 百合远缘杂交胚胎发育情况的研究. 《中国林副特产》. 2005, (第 2 期), 5-7.

屈云慧等. 离体胚培养技术在百合育种中的应用. 《云南农业大学学报》. 2004, 第 19 卷 (第 2 期), 206-210.

审查员 吴涛

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

远源百合杂交植株的培育方法

(57) 摘要

本发明提供了一种远源百合杂交植株的培育方法, 克服了现有技术种远源杂交不易亲和的问题, 本发明将子房和花药的进行离体培养, 然后采用将子房切断的非常规授粉方式进行离体授粉, 此后进行胚培养即可得杂交植株, 采用本发明的方法得到了杂种苗, 证明本发明方法成功的克服了远源杂交不亲和的问题, 能较好的提高种子结实率, 具有很好的推广应用价值。

1. 一种远源百合杂交植株的培育方法,包括如下步骤:

(1) 子房和花药的离体培养:将百合切花材料插入水中,采开花前1~2天的花蕾,分离花蕾中成熟但尚未开放的花苞,灭菌后剥去花瓣,将子房和花药分别接入MS培养基+0.02mg/1 萘乙酸的培养基中培养;

(2) 离体授粉:4~7天后,将母本的子房切掉1~2mm,直接授粉于子房的切断面上,将授粉后的子房置于MS培养基+0.02mg/1 萘乙酸的培养基中培养;

(3) 胚培养:45~50天后,取出膨大而变黄的子房,剥出胚珠接种于诱导培养基中,培养100~120天后将胚珠中的胚剥取,接种至MS培养基+0.02mg/1 萘乙酸的培养基中,7~10天后即得杂交植株;其中诱导培养基的组成为:以MS为基本培养基,含6%蔗糖、0.01~0.05mg/1 萘乙酸、7g/1 琼脂,PH值为5.8;

其中,所述远源百合杂交植株的母本为L型百合,父本为OT型或O型百合。

2. 按照权利要求1所述远源百合杂交植株的培育方法,其特征在于:步骤(2)中,授粉后的子房的培养条件为25℃、光照强度1500lux、光照时间12小时。

3. 按照权利要求1所述远源百合杂交植株的培育方法,其特征在于:步骤(1)为:将百合切花材料插入水中,采开花前1~2天的花蕾,分离花蕾中成熟但尚未开放的花苞,置于75%酒精中浸泡1~2分钟,取出,无菌水清洗3次,0.1% HgCl₂ 消毒4~6分钟,无菌水再清洗3次,用无菌滤纸吸干水份,剥去花瓣,将子房和花药分别接入MS培养基+0.02mg/1 萘乙酸的培养基中培养。

4. 按照权利要求1所述远源百合杂交植株的培育方法,其特征在于:步骤(3)为:45~50天后,取出膨大而变黄的子房,剥出胚珠接种于诱导培养基中,在25℃下暗培养21天,然后25℃、1500lux白炽灯条件下全天光照培养21天,此后晚上八点打开白炽灯、早上八点关闭进行培养,100~120天后将胚珠中的胚剥取,接种至MS培养基+0.02mg/1 萘乙酸的培养基中培养,7~10天后即得杂交植株。

5. 按照权利要求1所述远源百合杂交植株的培育方法,其特征在于:所述L型百合为新铁炮。

6. 按照权利要求1所述远源百合杂交植株的培育方法,其特征在于:所述OT型百合为黄色风暴。

7. 按照权利要求1所述远源百合杂交植株的培育方法,其特征在于:所述O型百合为蒂伯。

远源百合杂交植株的培育方法

技术领域

[0001] 本发明涉及杂交植株培育方法,特别是涉及远源百合杂交植株的培育方法。

背景技术

[0002] 百合是百合科 (Liliaceae) 百合属 (Lillium) 植物的总称,多年生草本。目前,全球约有 115 种,我国已发现有 55 个种,18 个变种,占世界百合属植物的一半。20 世纪初,国外以荷兰、日本和美国为中心,开展了百合的育种工作,利用本身已经优良的东方系、麝香系和亚洲系百合进行组间和种间杂交,培育出具有良好商业性状的新品种,推出 OT 和 LA 系列杂交新品种。目前市场上主要的百合切花品种集中在亚洲系 (Asiatic hybrids)、东方系 (Orientalhybrids)、麝香系 (Longiflomm hybrids)、OT 型、LA 型等 5 个品系上。我国对百合杂交后代的培育,仅局限于百合野生资源的种质之间,进行种间杂交,到现在三十多年来没有新品种获得商业价值。

[0003] 种间杂交及多倍化育种是国外花卉育种的重要途径,百合育种更是如此。在百合常规杂交育种过程中,所选配的许多杂交组合或者完全不亲和,或者虽然亲和,但胚发育不全,致使杂交不易成功。百合种间杂交的不亲和一直是困扰国内外百合杂交育种的技术难题。国外对 AO、OT 和 LA 曾经采用柱头离体受精的方法进行过组间杂交,但目前还未见 LOT 和 OTL 型杂交新种质的报道。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术中百合种间杂交的不亲和的缺陷,提供一种远源百合杂交植株的培育方法,该方法能较好的解决种间杂交的不亲和问题

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明采用如下的技术方案:

[0006] 远源百合杂交植株的培育方法,包括如下步骤:

[0007] (1) 子房和花药的离体培养:将百合切花材料插入水中,采开花前 1~2 天的花蕾,分离花蕾中成熟但尚未开放的花苞,灭菌后剥去花瓣,将子房和花药分别接入 MS 培养基 +0.02mg/1 萘乙酸的培养基中培养;

[0008] (2) 离体授粉:4~7 天后,将母本的子房切断,直接授粉于子房的切断面上,将授粉后的子房置于 MS 培养基 +0.02mg/1 萘乙酸的培养基中培养;

[0009] (3) 胚培养:45~50 天后,取出膨大而变黄的子房,剥出胚珠接种于诱导培养基中,培养 100~120 天后将胚珠中的胚剥取,接种至 MS 培养基 +0.02mg/1 萘乙酸的培养基中,7~10 天后即得杂交植株;其中诱导培养基的组成为:以 MS 为基本培养基,含 6%蔗糖、0.01~0.05mg/1 萘乙酸、7g/1 琼脂,PH 值为 5.8。

[0010] 在上述的步骤 (2) 中,母本的子房最好在距离顶端 1~2cm 处切断。授粉后的子房的培养条件为 25℃、光照强度 1500lux、光照时间 12 小时。

[0011] 上述步骤 (1) 具体为:将百合切花材料插入水中,采开花前 1~2 天的花蕾,分离花蕾中成熟但尚未开放的花苞,置于 75%酒精中浸泡 1~2 分钟,取出,无菌水清洗 3 次,

0.1% HgCl₂ 消毒 4~6 分钟, 无菌水再清洗 3 次, 用无菌滤纸吸干水份, 剥去花瓣, 将子房和花药分别接入 MS 培养基 +0.02mg/1 萘乙酸的培养基中培养。

[0012] 上述步骤 (3) 具体为: 45~50 天后, 取出膨大而变黄的子房, 剥出胚珠接种于诱导培养基中, 在 25℃ 下暗培养 21 天, 然后 25℃、1500lux 白炽灯条件下全光照培养 21 天, 此后晚上八点打开白炽灯、早上八点关闭进行培养, 100~120 天后将胚珠中的胚剥取, 接种至 MS 培养基 +0.02mg/1 萘乙酸的培养基中培养, 7~10 天后即得杂交植株。

[0013] 前述远源百合的母本为 L 型百合, 父本为 OT 型或 O 型百合。其中所述 L 型百合为新铁炮, OT 型百合为黄色风暴, O 型百合为蒂伯。国外对 AO、OT 和 LA 进行过组间杂交, 但还未见 L×OT 型杂交新种质的报道。本发明通过离体培养对麝香百合系 L 型“新铁炮”和 OT 型“黄色风暴”及 O 型百合“蒂伯”进行组间杂交, 采用前述子房切断的授粉方式以及离体胚抢救技术来克服受精前后的障碍, 获得了 L×OT、L×O 的新型百合杂交后代。

[0014] 发明人对不同的授粉方式、灭菌方式以及培养基都进行了研究, 具体如下:

[0015] 一、材料和方法

[0016] 材料: 杂交品种 OT 型“黄色风暴”(L. ‘yellowenn’)、麝香百合系 L 型“新铁炮”(L. ‘formolingi’) 及 O 型百合“蒂伯”(L. ‘Tiber’) 三个品种, 无菌条件下接种在培养基中。

[0017] 方法:

[0018] 1.1 子房、花药离体培养

[0019] 在超净工作台上, 取成熟但尚未开放的花苞, 灭菌, 剥去花瓣, 将子房和花药分别接入 MS+0.02mg/1 萘乙酸培养基中, 观察 45 天再进行杂交授粉。杂交组合为 L×OT、OT×L 和 L×O。

[0020] 1.2 授粉方法

[0021] 采用常规授粉和非常规授粉的方法。常规授粉是将花粉直接授在柱头上, 非常规授粉分为切柱头授粉、柱头嫁接和子房切断。其中, 切柱头授粉是将柱头切掉, 直接授粉于花柱上; 柱头嫁接时将花柱切短并将柱头对换; 子房切断是将子房切掉 1~2mm 左右并直接授粉在切断后的子房上面, 将授粉后的子房置于 MS+0.02mg/1 萘乙酸的培养基中, 培养 45-50 天。

[0022] 1.3 胚培养

[0023] 授粉后 45-50 天, 取出膨大的子房, 将种子剥出进行离体培养, 分别置于不同浓度培养基共 9 种: 蔗糖浓度分别为 3%、6% 和 9%, 萘乙酸的浓度分别为 0.01mg/1、0.02mg/1 和 0.05mg/1, 琼脂 7g/1, 调节 PH 值为 5.8。进行三周暗培养, 温度为 25℃。然后全光照在 1500lux 白炽灯下, 温度为 25℃, 保持三周。再次调整光照时间, 晚上八点将白炽灯打开, 早晨八点关闭, 保持 12 小时光照。

[0024] 二、结果与分析

[0025] 2.1 不同灭菌方式对子房离体培养的影响

[0026] 子房、花药的离体培养中, 消毒灭菌是很重要的步骤, 它是影响远缘杂交的外界因素, 直接关系到种子成活率。如果消毒不彻底, 会引起细菌或真菌感染, 导致子房和花药死亡。在实验过程中, 因为接种操作不规范等引起的细菌感染, 可以采取二次灭菌的方式, 将子房根部切断再消毒, 使污染率进一步降低。本次实验为筛选出最适宜的培养基, 先进行前

期对比实验,选取 162 个花苞,分别用 75%酒精和 0.1% Hgcl 进行消毒然后清洗,根据消毒时间的不同,筛选出最佳消毒时间为先进行酒精消毒 2min 然后升汞消毒 6min(如表 1 所示),成活率达到 93.75%。通过对比消毒时间,余下的花苞均采用先酒精消毒 2min 然后升汞消毒 6min 的方式进行消毒,以获得较高的花苞成活率。

[0027] 表 1 不同灭菌方式对子房离体培养的影响

消毒方法	消毒时间/min	花苞总数	子房膨大数	成活率%	污染率%
酒精	1	26	12	46.15	53.85
	2	22	11	50	50
升汞	4	24	14	58.33	41.67
	6	27	16	59.26	40.74
先酒精后 升汞	1, 4	31	24	77.42	22.58
	2, 6	32	30	93.75	6.25

[0029] 2.2 不同授粉方式对杂交结实的影响与分析

[0030] 在离体培养条件下,为克服授精障碍采取的非常规授粉方法是很有效的,子房膨大率达到 42.6%,且获得有胚的种子。而作为对照组常规授粉的母本,在子房膨大之前就出现枯萎现象,12 天便枯萎了,几乎没有出现膨大,不能得到正常发育的种子。由表 2 可以看出,切割子房的方法种子结实率相对较高。

[0031] 表 2 不同授粉方式的杂交结果

[0032]

授粉方式	授粉子房数目	子房膨大数	从授粉到膨大子房枯萎时间 /d	形成蒴果数
常规授粉	30	-	12	-
切割柱头	128	58	10 ~ 65	20
柱头嫁接	82	33	10 ~ 62	15
子房切断	102	42	15 ~ 55	24

[0033] 2.3 诱导培养基的蔗糖浓度和萘乙酸浓度对种子培养的影响与分析

[0034] 由表 3 可以看出,蔗糖浓度对种子培养的影响比较显著,6%的培养基最适宜种子的培养,当萘乙酸浓度为 0.02mg/l 时,种子成活率比较高。本次实验中,种子在蔗糖浓度为 6%的培养基中成活率均在 50%以上,比较适合种子的生长发育。经过 100-120 天的胚珠培养,可获得少量胚,将胚剥出胚珠接种在培养基上,7-10 天即可萌发成苗。

[0035] 表 3 不同浓度培养基对种子成活的影响

[0036]

蔗糖浓度	萘乙酸浓度 (mg/l)	种子数	成活种子数	成活率 (%)
3%	0.01	12	4	33.3
	0.02	31	12	38.7
	0.05	17	6	35.2
6%	0.01	27	14	51.8
	0.02	32	26	81.25
	0.05	21	11	52.3
9%	0.01	15	3	20
	0.02	33	9	27.3
	0.05	13	2	15.3

[0037] 三、结论与讨论

[0038] 国外对 AO、OT 和 LA 曾经采用柱头离体受精的方法进行过组间杂交,但未见 LOT 和 OTL 型杂交新种质。本发明对此进行研究,选取的材料麝香百合 L “新铁炮”具有生长周期较短、茎强度和花朵品质的维持较好、多数情况下对缺光不敏感的优点。而本身为杂交品种的 OT “黄色风暴”花呈淡黄色且花朵大、生命力强、花型美丽、具芳香气息。期望把两者间的有益性状结合在一起,培育出生长周期较短,茎强度和花朵品质好,对缺光的敏感性小,且花色、花型都比较丰富的新品种。

[0039] 通过实验室条件下的花药离体培养,对 L×OT、OT×L 及 L×O 进行杂交,获得了杂种胚和植株。采用子房膨大率和种子成活率为种间杂交亲和力的判定指标,筛选出最适宜的消毒方法和时间、最佳培养基和最佳授粉方式。经过筛选,采取先用酒精消毒 2min 然后升汞消毒 6min 的方法污染率最低。蔗糖浓度为 6%,萘乙酸浓度为 0.02mg/l 的培养基为最佳培养基,最适合种子的培养。

[0040] 与现有技术相比,本发明采用非常规的授粉方式即将子房切割直接授粉在子房切割面上,花粉管不用通过柱头和花柱,而是直接进入子房最后到达胚囊,释放精子并分别与卵细胞及极核结合形成完整的胚及胚乳,通过此授粉方式可以得到有胚的种子,并能成功获得杂交苗,证明该方法可以克服远源杂交不亲和的问题,能较好的提高种子结实率,具有很好的推广应用价值。

具体实施方式

[0041] 本发明的优选实施方式:

[0042] 取材:从市场上购买麝香百合系 L 型“新铁炮”和 OT 型百合“黄色风暴”及 O 型百合“蒂伯”切花材料,插入水中,选择无病虫害的花枝,采开花前 1-2 天的花蕾。

[0043] 灭菌:在超净工作台上,选取花蕾种成熟但尚未开放的花苞,置于 75%酒精浸泡 1 分钟,无菌水清洗 3 次,再用 0.1% HgCl 消毒 5min,无菌水再清洗 3 次。无菌滤纸吸干水分,剥去花瓣,将子房和花药分别接入 MS 培养基 +0.02mg/l 萘乙酸的培养基中培养,培养条件

为 25℃、光照强度 1500lux、光照时间 12 小时。灭菌是关键之一，灭菌时间太长，花粉及子房易受到伤害，灭菌时间太短又会因污染而失败，故操作应特别小心。

[0044] 离体授粉：培养 6 天后，选择无菌的子房和花药，花药最好选择已完全开裂的，采用子房切断的方式进行非常规授粉，即将“新铁炮”的子房在距离顶端 1 ~ 2cm 处切断，采无菌的“黄色风暴”和“蒂伯”花粉分别直接授粉于不同的切断后的子房上面，将授粉后的子房置于 MS 培养基 +0.02mg/l 萘乙酸的培养基中在常规组培条件下培养。

[0045] 胚珠培养：授粉后 15 天左右可看出部分子房会开始膨大，大部分会渐渐变黄枯萎，培养 4550 天后，少数子房膨大而开始变黄。此时取出膨大且变黄的子房，将胚珠剥出进行离体培养，接种于以下培养基中：以 MS 为基本培养基，蔗糖浓度为 6%，萘乙酸浓度为 0.03mg/l，琼脂 7g/l，调节 PH 值为 5.8。在 25℃ 下暗培养 21 天，然后 25℃、1500lux 白炽灯条件下全天光照培养 21 天，此后晚上八点打开白炽灯、早上八点关闭进行培养，保持 12 小时光照。

[0046] 胚培养：胚珠培养 100-120 天后，胚珠中可见少数明显的正常胚或球形的胚。剥取其中的胚接种至 MS 培养基 +0.02mg/l 萘乙酸的培养基中，约 7-10 天后可成苗，即可获得其杂种植株，该杂种植株即为 L×O 杂种苗和 L×OT 杂种苗。

[0047] 远源杂种的鉴定：采用核型分析、同工酶及 RAPD 分子标记技术可鉴定出远源杂种的真假，具有亲本核型特征的即为真杂种，同工酶及 RAPD 分析表明，真杂种除了具有父母本的带型外，还会产生不同于亲本的新带型。

[0048] 远源杂种百合的繁育：按常规百合的繁育技术进行，组培快繁的配方为 MS 培养基附加 6% 的蔗糖，生根培养基为 MS 培养基附加 6% 的蔗糖和 0.01mg/l 萘乙酸。试管苗（或球）在 2-4℃ 的低温下处理 37-50 天，然后栽入腐叶土中，在海拔 2000m 左右种植。小籽球采收后，在 2-5℃ 的低温下处理 70-90 天可以打破休眠，然后在海拔 2000-2400m 左右，土壤 pH 值为 5.5-6.5 的地方种植，进行第二次繁球。有多数籽球可形成商品开花种球，开花后可用于新类型百合品种选育。