

龚建英,龙定建,孙利娜,等. 4种石斛种间杂交、自交亲和性及蒴果生长动态[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):190-192.

4种石斛种间杂交、自交亲和性及蒴果生长动态

龚建英,龙定建,孙利娜,杜铃,廖美兰,黄兴

(广西壮族自治区林业科学研究院,广西南宁 530002)

摘要:以4种石斛原生种为试验材料,采用双裂杂交交配设计,开展石斛种间杂交、自交亲和性及蒴果生长动态研究。结果表明,4种石斛种间自交亲和性大小顺序为大苞鞘石斛>肿节石斛>报春石斛>美花石斛。12个杂交组合中有5个杂交组合收获杂交种子,亲和性大小顺序为报春石斛×美花石斛>大苞鞘石斛×肿节石斛>报春石斛×大苞鞘石斛>肿节石斛×大苞鞘石斛>大苞鞘石斛×报春石斛,其他组合杂交不亲和。宜选择大苞鞘石斛作杂交父本或母本,报春石斛作杂交母本。石斛果实快速生长期为4—5月,8月生长量达最大,杂交果落果时间在授粉后1个月内,自交果落果时间在7—8月。

关键词:石斛;杂交;自交;亲和性;蒴果;动态

中图分类号: S682.310.36 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0190-03

石斛是兰科石斛属(*Dendrobium* spp.)植物的总称,不仅具有药用价值,还具有重要的观赏价值,花形花姿优美、花色鲜艳、花期长、许多种类具有芳香,既可作切花,也可盆栽观赏,深受人们的喜爱,被誉为“四大观赏洋兰”之一,在国际兰花市场上具有重要地位^[1-2]。观赏石斛育种是研究的重点和热点^[3],美国、泰国、日本对石斛的育种研究较早,每年都培育出许多石斛新品种。目前,国内对石斛的资源分布^[3-5]、无菌播种、组织培养^[6-11]以及药用成份和药理作用^[12-13]研究较多,但相关石斛育种研究较少^[14-16],国内尚无具有自主知识产权的石斛新品种。种间杂交是培育石斛新品种的有效手段,广西有石斛原生种约30种,为石斛重要的中心产区。本研究充分利用本地及其他省份引进的丰富石斛种质资源,对石斛属4个种进行正反交和自交,摸索不同种间杂交和自交亲和性,为石斛属杂交育种亲本的选择以及杂交组合的选配提供重要理论依据,并对杂交果生长动态进行研究,以期有效促进杂交果发育以及进行杂种胚挽救提供技术依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为4种石斛原生种,即大苞鞘石斛(*D. wardianum*)、肿节石斛(*D. pendulum*)、报春石斛(*D. primulinum*)、美花石斛(*D. loddigesii*)。

1.2 试验地概况

试验地位于广西壮族自治区林业科学研究院花卉研究所花卉种质创新试验区内(22°56'N,108°21'E),海拔80~145 m,属南亚热带季风气候区,年平均气温21.8℃,1月均温12.8℃,7月均温27.8℃,≥10℃的年积温7 200℃,极

收稿日期:2013-10-09

基金项目:广西自然科学基金(编号:2011GXNSFB018039);广西林业科技专项(编号:桂林科学[2010]第一号)。

作者简介:龚建英(1978—),女,广西三江人,硕士,工程师,主要从事园林花卉研究。E-mail:282305221@qq.com。

通信作者:王华新,博士,高级工程师,主要从事园林花卉研究。E-mail:wanghuaxin2000@163.com。

端最低温-1.5℃,极端最高温39.4℃,年降水量为1 350 mm,年平均相对湿度为80%。

1.3 试验方法

采用双裂杂交交配设计(表1),共设计16个授粉组合,其中种间杂交组合12个,自交组合4个。

表1 4种石斛双裂杂交交配设计

亲本	大苞鞘石斛	肿节石斛	报春石斛	美花石斛
大苞鞘石斛	A11	A12	A13	A14
肿节石斛	A21	A22	A23	A24
报春石斛	A31	A32	A33	A34
美花石斛	A41	A42	A43	A44

1.3.1 人工授粉 石斛花朵开放后2 d,于09:30—11:30或16:30—17:30进行授粉。授粉时用牙签除去药帽,取下花粉,将花粉块移至母本合蕊柱顶端的柱头上,让蕊腔分泌的黏液将花粉块黏住,去除唇瓣,挂牌标明父母本和授粉时间^[17]。

1.3.2 种胚培养 取石斛成熟果实,流水冲洗30 min后,用75%乙醇消毒30 s,再于0.1%氯化汞溶液中消毒10~15 min,无菌水冲洗得到无菌外植体。无菌条件下将种皮切开,取种胚均匀播种于预先筛选的培养基中,培养基采用MS+活性炭1 g/L+马铃薯60 g/L+香蕉40 g/L+NAA 0.05~0.4 mg/L+6-BA 0.05~0.4 mg/L。培养条件为光照2 000~3 000 lx,温度(24±1)℃,种胚离体培养45 d后统计萌发率^[6]。

1.3.3 数据处理 授粉30 d后每月定期测定蒴果的长、宽,统计坐果数、落果数,直至蒴果停止生长。蒴果长取膨大果实长度平均值,蒴果宽取膨大果实最宽部位的平均值,萌发率按萌发面积与培养面积的比值计算。以坐果率、膨大率、萌发率综合评价亲和性。坐果率=蒴果数/授粉花朵总数×100%;膨大率=蒴果横径/纵径;萌发率=萌发面积/培养面积×100%。

2 结果与分析

2.1 石斛种间自交、杂交、正反交坐果率

4个自交组合中,大苞鞘石斛自交的坐果率最高,达91%;其次是肿节石斛,为69%,美花和报春石斛坐果率较

低,分别为16%和20%。

12个石斛种间杂交组合中有5个杂交组合获得杂交种子,7个杂交组合坐果率为0,杂交不亲和。大苞鞘石斛×肿节石斛结实率最高为55%、报春石斛×美花石斛次之结实率为50%、大苞鞘石斛×报春石斛、报春石斛×大苞鞘石斛、肿节石斛×大苞鞘石斛坐果率均较低,分别为20%、18%、11%。以大苞鞘石斛为母本杂交,获得2个杂交种的组合,坐果率分别为55%和20%;以肿节为母本杂交,获得1个杂交组合,坐果率仅为11%;以报春为母本杂交,获得2个杂交组合,坐果率分别为18%和50%,以美花为母本杂交,未获得杂交组合,表明大苞鞘石斛和报春石斛是良好的母本材料,极有可能培育出大量杂种后代,肿节石斛作为母本材料,对父本的选择性较强,在育种中可考虑增加样本量,以期获得较多杂交果,美花石斛作为母本,杂交不亲和。大苞鞘石斛为父本进行杂交,获得2个杂交组合,坐果率分别为11%和18%;肿节石斛为父本杂交,获得1个杂交组合,坐果率为55%;以报春石斛为父本杂交,获得1个杂交组合,坐果率为20%;以美花石斛为父本杂交,获得1个杂交组合坐果率为50%。大苞鞘石斛也是较好的父本材料,而肿节、报春和美花石斛作为父本时,对母本的选择性较强,需对母本进一步筛选。

6组正反交组合,大苞鞘与肿节石斛、大苞鞘与报春石斛正反交均获得了杂交种,大苞鞘与肿节石斛正、反交坐果率分别为55%和11%。大苞鞘与报春石斛正、反交坐果率分别为20%和18%。报春与美花石斛正反交坐果率分别为50%和0。大苞鞘与美花石斛、肿节与报春石斛、肿节与美花石斛无论正交还是反交,表现为杂交不亲和,杂交坐果率均为0。

根据结实率大小评价亲和性,4个自交组合亲和性大小顺序为大苞鞘石斛>肿节石斛>美花石斛>报春石斛;5个杂交组合亲和性大小顺序为大苞鞘石斛×肿节石斛>报春石斛×美花石斛>大苞鞘石斛×报春石斛>报春石斛×大苞鞘石斛>肿节石斛×大苞鞘石斛。

2.2 石斛种间自交、杂交蒴果膨大率

4个石斛自交种中蒴果膨大率最大的是肿节石斛,膨大率为0.56;其次是大苞鞘石斛和报春石斛,膨大率分别为0.39和0.32;最小的是美花石斛,膨大率为0.19(表2)。

表2 石斛自交和杂交组合坐果率、膨大率和萌发率

授粉组合	授粉总数(个)	结果数(个)	坐果率(%)	蒴果横径(cm)	蒴果纵径(cm)	膨大率	萌发率(%)
A11	11	10	91	2.10	5.4	0.39	55
A22	16	11	69	2.23	4.0	0.56	36
A33	19	3	16	1.42	4.5	0.32	85
A44	20	4	20	0.52	2.8	0.19	90
A12	9	5	56	1.71	5.5	0.31	70
A13	5	1	20	1.84	4.5	0.41	0
A14	10	0	0				
A21	9	1	11	1.40	5.0	0.28	80
A23	16	0	0				
A24	8	0	0				
A31	11	2	18	1.32	4.5	0.29	90
A32	13	0	0				
A34	8	4	50	1.01	4.0	0.25	88
A41	9	0	0				
A42	8	0	0				
A43	10	0	0				

5个石斛杂交种中蒴果膨大率最大的是大苞鞘石斛×报春石斛,为0.41;其次是大苞鞘石斛×肿节石斛、报春石斛×大苞鞘石斛以及肿节石斛×大苞鞘石斛,分别为0.31、0.29、0.28;最小的是报春石斛×美花石斛,为0.25。横纵径值越高,说明蒴果膨大程度相对越好,果实发育状况越好,亲和性越高。石斛杂交授粉后存在蒴果假膨大现象,即果实膨大很好却无有胚种子或有胚种子数量极少。蒴果膨大程度往往不能准确反映杂交亲和性高低,仅能作为外观指标。

根据膨大率大小评价亲和性,4个自交组合亲和性大小顺序为肿节石斛>大苞鞘石斛>肿节石斛>美花石斛;5个杂交组合亲和性大小顺序为大苞鞘石斛×报春石斛>大苞鞘石斛×报春石斛>报春石斛×大苞鞘石斛>肿节石斛×大苞鞘石斛>报春石斛×美花石斛。

2.3 石斛种间自交、杂交蒴果萌发率

4个石斛自交种种子萌发率最高的为美花石斛,达90%;其次是报春石斛,为85%;较低的是大苞鞘石斛和肿节石斛,分别是55%和36%(表2)。

5个石斛杂交种种子萌发率最高的组合是报春石斛×大苞鞘石斛为90%;其次是组合美花石斛×报春石斛,为88%;较低的组合是肿节石斛×大苞鞘石斛、大苞鞘石斛×肿节石斛,萌发率分别为80%、70%;最低的组合是大苞鞘石斛×报春石斛,萌发率为0。

根据萌发率大小评价亲和性,4个自交组合亲和性大小顺序为美花石斛>报春石斛>大苞鞘石斛>肿节石斛;5个杂交组合亲和性大小顺序为报春石斛×大苞鞘石斛>美花石斛×报春石斛>肿节石斛×大苞鞘石斛>大苞鞘石斛×肿节石斛>大苞鞘石斛×报春石斛。

研究表明,坐果率和膨大率高,萌发率不一定高,要选择坐果率、萌发率和膨大率作为评价指标对石斛杂交和自交亲和性进行综合评价,4种石斛种间自交亲和性大小顺序为大苞鞘石斛>肿节石斛>美花石斛>报春石斛;5个石斛种间杂交组合亲和性大小顺序为报春石斛×美花石斛>大苞鞘石斛×肿节石斛>报春石斛×大苞鞘石斛>肿节×大苞鞘石斛>大苞鞘石斛×报春石斛。

2.4 石斛自交和杂交种生长发育情况

4个石斛自交果和5个石斛杂交果4—5月为快速生长期,8月生长量达最大,9月果实开始皱缩,生长量略变小。8月自交果大小顺序为肿节2.09 cm>大苞鞘石斛2.05 cm>报春石斛1.33 cm>美花石斛0.64 cm,杂交果大小顺序为大苞鞘石斛×报春石斛1.84 cm>大苞鞘石斛×肿节石斛1.67 cm>肿节石斛×大苞鞘石斛1.40 cm>报春石斛×大苞鞘石斛1.32 cm>报春石斛×美花石斛0.98 cm(表3)。杂交果与自交果比较,大小小于或介于父本和母本自交果之间。

2.5 石斛自交和杂交挂果数动态变化

4月,肿节石斛获得的自交果最多,达14个;其次是大苞鞘石斛,为10个;报春石斛和美花石斛获得的自交果较少,分别为6、4个(表4)。石斛种间自交授粉后第4个月,肿节石斛和报春石斛开始落果,肿节石斛落果时间主要是7—8月,报春石斛落果时间主要在7月,落果数均达3个。而大苞鞘石斛和美花石斛无落果现象。

表4表明,大苞鞘石斛×肿节石斛获得的杂交果最多,达

表3 石斛自交和杂交蒴果生长发育动态

组合	横径长(cm)						
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月
A11	0.82	1.66	1.95	2.02	2.05	2.02	2.01
A22	0.67	1.58	1.85	2.08	2.09	2.05	2.02
A33	0.70	1.16	1.28	1.32	1.33	1.33	1.29
A44	0.50	0.60	0.62	0.64	0.64	0.62	0.62
A12	0.82	1.40	1.59	1.62	1.67	1.65	1.65
A13	0.60	1.34	1.60	1.72	1.84	1.84	1.82
A21	0.90	1.31	1.37	1.37	1.40	1.40	1.40
A31	0.65	1.12	1.31	1.31	1.32	1.31	1.31
A34	0.50	0.95	0.97	0.97	0.98	0.97	0.97

表4 石斛自交和杂交果挂果数

组合	挂果数(个)						
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月
A11	10	10	10	10	10	10	10
A22	14	14	14	12	11	11	11
A33	6	6	6	6	3	3	3
A44	4	4	4	4	4	4	4
A12	5	5	5	5	5	5	5
A13	1	1	1	1	1	1	1
A14	1	0	0	0	0	0	0
A21	2	1	1	1	1	1	1
A31	2	2	2	2	2	2	2
A34	2	2	2	2	2	2	2

5个;其次是报春石斛×大苞鞘石斛、报春石斛×美花石斛,均为2个,最少是肿节石斛×大苞鞘石斛、大苞鞘石斛×报春石斛,为1个。大苞鞘石斛×肿节石斛、报春石斛×大苞鞘石斛、报春石斛×美花石斛杂交果无落果现象。大苞鞘石斛×肿节石斛、大苞鞘石斛×美花石斛杂交果落果时间为4—5月,即杂交授粉后1个月内落果数均为1个。

3 结论与讨论

无论是石斛自交果还是杂交果,坐果率、膨大率与萌发率并不完全表现为正相关,即坐果率和膨大率高,萌发率不一定高。如肿节石斛坐果率高,萌发率却最低;杂交果大苞鞘石斛×报春石斛蒴果膨大率最大,但萌发率却为0,与前人研究结果一致,许多植物在种间杂交时果实能膨大坐果,但不一定有可育种子^[18]。通过坐果率、膨大率和萌发率3个指标结合更能反映种间杂交和自交亲和性^[18-20]。种胚发育不良可能与石斛人工授粉后存在授精后障碍有关,如何通过优化种胚培养基配方及在杂交果落果前对杂种胚进行挽救,培养出杂交子代成苗植株,对获得石斛杂交新种质和材料尤为重要。

综合考虑坐果率、膨大率和萌发率3个指标,4种石斛种间自交亲和性大小顺序为大苞鞘石斛>肿节石斛>报春石斛>美花石斛。12个杂交组合中有5个杂交组合亲和性大小顺序为报春石斛×美花石斛>大苞鞘石斛×肿节石斛>报春石斛×大苞鞘石斛>肿节石斛×大苞鞘石斛>大苞鞘石斛×报春石斛,其他7个组合的杂交不亲和。宜选择大苞鞘石斛作为杂交父本或母本,报春石斛作为杂交母本,报春石斛×美花石斛是亲和性最高的杂交组合。石斛种间杂交亲和性可能与父母本亲缘关系的远近、花粉的质量、花粉与柱头的识别、花粉在柱头及子房的行为等相关,上述问题是今后研究工作的重点,以期种间杂交亲和性及障碍克服提供理论依据^[21]。

石斛4个种间自交果和5个种间杂交果果实生长速度最快的是4—5月,8月生长量达最大,9月果实略有皱缩,横纵径变小。杂交果与自交果相比,其大小小于或介于父本和母本自交果之间。根据石斛果实生长发育规律,适时施用不同配比的养分,科学管理,提高果实质量,促进种胚发育。

杂交果落果时间主要为杂交授粉后1个月内,可能与人工授粉后存在授精后障碍有关;石斛种间自交果落果时间主要为7—8月,南宁7—8月受高温高湿气候影响,田间种植通风差,容易滋生病菌,会使石斛植株和果实腐烂,导致石斛坐果率降低。以期明确石斛落果时间,为有效提高石斛坐果率提供技术支持。

参考文献:

- [1]李振坚,王雁,彭红明,等.濒危石斛兰开花与授粉生物学特性研究[J].广东农业科学,2009(6):43-49.
- [2]龚建英,余雪标,徐大平.石斛兰无土栽培基质优化筛选研究[J].广西林业科学,2007,36(1):82-85.
- [3]潘丽晶,曹友培,肖杨,等.庭观赏石斛育种技术研究综述[J].广东农业科学,2009(9):71-73.
- [4]邓朝义,聂建平,卢永成,等.贵州石斛属植物资源及其开发利用价值评价[J].贵州林业科技,2004,32(1):51-53.
- [5]赵天榜,陈志秀.河南石斛属植物资源的开发利用研究[J].地域研究与开发,1994,13(2):59-61.
- [6]曾宋君,程式君,张京丽,等.五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖研究[J].园艺学报,1998,25(1):76-81.
- [7]张莹,王雁,李振坚.报春石斛的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2007,43(4):749.
- [8]蓝玉甜,刘世勇,罗玉婷,等.鼓槌石斛种子萌发培养与小苗组培快繁技术研究[J].农业科技,2010(11):89-91.
- [9]邓选国,黄俊鹏,宋希强,等.密花石斛无菌播种与茎尖培养研究[J].热带农业工程,2009,33(5):41-43.
- [10]张铭,朱峰,魏小勇,等.铁皮石斛种胚萌发和原球茎质量控制[J].浙江大学学报,2000,27(1):92-94.
- [11]罗岚,关仕港,刘建昌,等.秋石斛离体快速繁殖研究[J].佛山科学技术学院学报,2004,22(2):69-71.
- [12]李妮亚,高培元,王紫.海南石斛属和金石斛属植物多糖及氨基酸含量分析[J].植物资源与环境学报,2004,13(4):57-58.
- [13]陈蕊,崔盛,陶宗娅.三种川产石斛有效成分的测定及其分布规律研究[J].西南农业学报,2010,23(3):986-988.
- [14]练强,李俊.齿瓣石斛人工授粉试验[J].热带农业科技,2003,26(2):44-45.
- [15]李涵,郑思乡,李枝林,等.齿瓣石斛多倍体育种研究初报[J].中国农学通报,2004,20(4):198-199.
- [16]朱根发,王碧青,陈明莉,等.大花蕙兰与兰属植物种间杂交研究[J].植物学报,2005,22(4):445-448.
- [17]吕复兵,周芳,朱根发.文心兰杂交结实性研究[J].广东农业科学,2008(7):52-53.
- [18]王丹菲,赵璐,雷家军.百合种间杂交亲和性的研究[J].沈阳农业大学学报,2006,37(1):26-30.
- [19]赵兴华,苏胜举,王洪波,等.不同百合品种间杂交亲和性研究[J].中国农学通报,2011,27(25):103-107.
- [20]王冲,雷家军,姜闯,等.君子兰种间杂交及自交亲和性[J].中国农业科学,2011,44(18):3822-3829.
- [21]贺佳玉,李云,姜金仲,等.植物胚败育机理及其离体培养挽救技术之研究进展[J].中国农学通报,2008,1(24):141-145.