

秋水仙素诱导新铁炮百合 2n 花粉方法的优化

孙晓梅, 王潇潇, 贾 莲, 高昊丹, 孙华凯

(沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:以新铁炮百合种子为试材,采用正交实验设计探索利用秋水仙素处理新铁炮百合种子的诱导 2n 花粉方法和可能性。结果表明:种子萌发处理时间 5 d、秋水仙素浓度 0.05%或 0.2%时新铁炮百合种子出苗的效果最好;经对大花粉率极差分析,秋水仙素处理浓度是诱导大花粉的最主要因子,秋水仙素浓度 0.1%、处理时间为 24 h,种子萌发处理时间 7 d 种子品种富田 3 号是诱导新铁炮百合大花粉有效方法。

关键词:新铁炮百合;种子;2n 花粉;正交实验;秋水仙素

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2011)14—0126—03

新铁炮百合属百合科百合属多年生球根花卉,由铁炮百合和高砂百合杂交而成^[1]。染色体 $2n=2x=24$ 。新铁炮百合播种到开花时间短,11 月温室播种,翌年 7、8 月份就能见花,其叶片较细,花被的外侧略带褐色,花粉橘红或红色,花瓣较薄,具有香气,但芳香程度不及铁炮百合,受亚洲人青睐。正是由于新铁炮百合自交亲和性大,结实率高,种子繁殖开花快,耐热力强,是中国新兴的外来百合品种,适合中国市场需求,近年来人们对新铁炮百合切花利用量逐年增多,因此,发展前景广阔,所以使得其在大花型、无花粉等性状遗传改良迫在眉睫,以期更好的适应市场,满足人民对新铁炮百合的需求。不过目前国内在这方面起步较晚,多数只局限于在现有品种的萌发、主要性状相关性分析等理论基础研究。因此,借鉴张楠楠等^[2]、李开隆等^[3]、程金新等^[4]对其它植物和百合品种(系)倍性育种成功经验,在新铁炮百合品种改良中采用多倍体育种,尤其是 2n 花粉育种方法,在染色体加倍后带来的形态和生理方面巨大性变化,以期创造出更优良的品种。目前,尚未有关于新铁炮百合花粉加倍相关方面文献报道,但孙晓梅等在进行亚洲百合花粉染色体加倍育种时,取得一定的进展,说明了新铁炮百合花粉加倍育种的可能性^[5]。因此该研究以新铁炮百合的种子为材料,从体细胞加倍这一方面,诱导获得 2n 花粉,探索利用秋水仙素诱导出加倍花粉的方法和可能性,选择优化的方法,为用二倍体花粉与正常百合授粉培育三倍体打下基础。

第一作者简介:孙晓梅(1970-),女,山东昌邑人,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事园林植物遗传育种的教学与科研工作。
E-mail: xiaomei7280@126.com.
收稿日期: 2011—04—11

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为 2008 年由日本富田公司引进的新铁炮百合(*Lilium formolongi*)品种‘雷山 3 号’、‘富田 3 号’和‘富田白光’的种子。

1.2 试验方法

1.2.1 2n 花粉的诱导 挑选颜色较深、内部饱满且胚轴明显的种子进行处理。采用四因素(处理品种、种子萌发处理时间、秋水仙素处理浓度和处理时间)三水平处理的正交实验设计。种子萌发处理时将种子置于铺放了用蒸馏水浸润过的滤纸的培养皿中。萌发处理结束再将种子浸泡于不同浓度的秋水仙素溶液中,浸泡时间按试验设计进行。处理后播种到草炭基质中。每个处理 50 粒种子。正交实验因子水平见表 1,处理见表 2。

表 1 正交设计的因子与水平

因素	水平		
	1	2	3
处理种子的品种	富田 3 号	富田白光	雷山 3 号
种子萌发处理时间/d	5	7	9
秋水仙素处理浓度/%	0.05	0.1	0.2
秋水仙素处理时间/h	12	24	36

表 2 正交实验设计表

编号	因素 1 处理种子的品种	因素 2 种子萌发 处理时间/d	因素 3 秋水仙素 处理浓度/%	因素 4 秋水仙素 处理时间/h
1	富田 3 号	5	0.05	12
2	富田 3 号	7	0.1	24
3	富田 3 号	9	0.2	36
4	富田白光	5	0.1	36
5	富田白光	7	0.2	12
6	富田白光	9	0.05	24
7	雷山 3 号	5	0.2	24
8	雷山 3 号	7	0.05	36
9	雷山 3 号	9	0.1	12

1.2.2 2n 花粉的统计 处理后,待植株成熟,取花粉

粒制片,观察测量花粉粒直径,以花粉粒直径显著增大作为诱导成功的初步鉴定指标,并对 2n 花诱导频率进行估测。具体方法:将每个处理所得花粉混合均匀,制成 3~5 个临时涂片,每片观察 5 个视野,统计花粉中的大花粉百分率。于 Motic 显微镜下进行显微照相。

1.2.3 分析方法 采用 DPS 7.50 软件进行正交实验统计分析。由于极差是判定各因子或交互作用对结果影响,最终分析极差寻找出试验处理最优组合即试验方法的优化。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素诱导对幼苗出苗的影响分析

幼苗能否顺利出苗是决定能否获得有效加倍花粉的前提,因此该试验首先找出适宜植株出苗的试验最优组合。将 3 种新铁炮百合的种子分别以 5、7、9 d 萌发处理。萌发处理后的种子再经不同浓度秋水仙素溶液处理不同时间后播种到基质中,试验采用正交设计方法。处理后种子的出苗情况见表 3。由表 4 可知,种子萌发处理时间是影响种子出苗的最主要因素,秋水仙素处理浓度和处理时间为次之因素。根据各试验因素平均数可以看出,种子萌发处理时间 5 d、秋水仙素浓度 0.05% 或 0.2%、处理时间为 24 h 时,为最优组合。试验编号 1 和 7 为出苗率最高的 2 个组,符合试验最优组合。试验编号 7 说明了高浓度秋水仙素处理种子后,可能由于受秋水仙素毒害而导致出苗率略低于试验编号 1。

表 3 处理后种子出苗情况						
编号	因素 1 处理种子的 品种	因素 2 种子萌发 处理时间	因素 3 秋水仙素 处理浓度	因素 4 秋水仙素 处理时间	种子数	出苗率 / %
1	富田 3 号	5	0.05	12	50	96
2	富田 3 号	7	0.1	24	50	86
3	富田 3 号	9	0.2	36	50	22
4	富田白光	5	0.1	36	50	36
5	富田白光	7	0.2	12	50	72
6	富田白光	9	0.05	24	50	54
7	雷山 3 号	5	0.2	24	50	92
8	雷山 3 号	7	0.05	36	50	36
9	雷山 3 号	9	0.1	12	50	46

表 4 诱导种子出苗率各因素极差分析				
	因素 1 处理种子的 品种	因素 2 种子萌发 处理时间	因素 3 秋水仙素 处理浓度	因素 4 秋水仙素 处理时间
极差 R	0.1400	0.6578	0.8267	0.4600
调整 R	0.1261	0.9907	0.5580	0.4143

2.2 秋水仙素处理后花粉粒大小的检测与 2n 花粉频率的测定

将新铁炮百合的种子经不同浓度秋水仙素溶液浸泡处理不同时间后播种到草炭基质中。9 组处理中有

5 组出现肉眼可见的明显变异,花蕾发育发生变异畸形,叶片变厚,染色变深(图 1)或花蕾直接腐烂死亡(图 2)。取 9 组处理后发育良好的植株花粉,经镜检有 8 组处理中发现大花粉(图 3),同时其中 4 组大花粉比率(表 5)较多,研究表明,新铁炮百合的正常花粉粒为椭圆体至长椭圆体,加倍后的 2n 花粉体积明显增大且颜色较深,多为圆球型(图 3)。根据前人研究经验,将花粉粒巨大者作为 2n 配子诱导成功的间接判别指标。



图 1 花蕾发育发生变异畸形



图 2 花蕾直接腐烂死亡

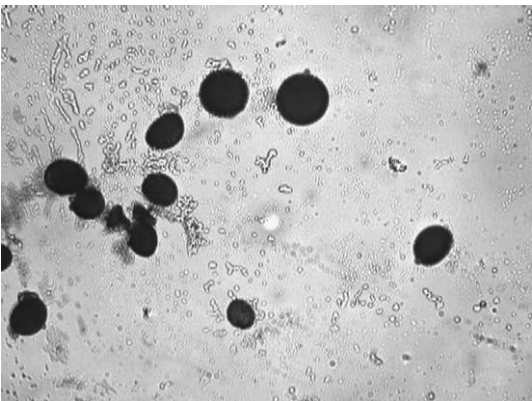


图 3 大花粉与正常花粉

表 5 处理后出现大花粉情况					
编号	因素 1 处理种子的品种	因素 2 种子萌发 处理时间	因素 3 秋水仙素 处理浓度	因素 4 秋水仙素 处理时间	大花粉率 /%
1	富田 3 号	5	0.05	12	0
2	富田 3 号	7	0.1	24	83
3	富田 3 号	9	0.2	36	0.1
4	富田白光	5	0.1	36	65
5	富田白光	7	0.2	12	0.8
6	富田白光	9	0.05	24	16.7
7	雷山 3 号	5	0.2	24	0.2
8	雷山 3 号	7	0.05	36	42
9	雷山 3 号	9	0.1	12	35

由表 6 可知,秋水仙素处理浓度是诱导大花粉的最主要因子,其次是种子萌发处理时间,再次是秋水仙素处理时间,最后是种子的品种。根据各试验因素平均数可以看出,秋水仙素浓度 0.1%、处理时间为 36 h (24 h 平均数差距极小),种子萌发处理时间 7 d,种子品种富田 3 号为最优组合。根据试验,编号 2 为大花粉率最高的 1 组,符合试验最优组合。

表 6 诱导大花粉率各因素极差分析					
	因素 1 处理种子的品种	因素 2 种子萌发 处理时间	因素 3 秋水仙素 处理浓度	因素 4 秋水仙素 处理时间	
极差 R	0.0182	0.3030	0.80000	0.2372	
调整 R	0.0164	0.4564	0.5400	0.2136	

3 结论与讨论

种子的出苗是获得诱导 2n 花粉的前提和基础,也

是该试验的重点研究目标之一。虽然 5 d 为其最佳出苗萌发时间,但与后面秋水仙素水溶液浸泡时间累积为 7 d 左右时为其出苗率最高 2 组,说明单一作种子萌发处理时,7 d 浸润可能是种子萌发处理最佳时间。

在新铁炮百合大花粉诱导试验中富田 3 号种子萌发处理 7 d、秋水仙素为 0.1%、处理时间 24 h 为最优处理组合。但是通过镜检观察,经过秋水仙素浓度为 0.2%处理 12 h 获得大花粉虽然比率低,但花粉直径增加明显,这有可能是受秋水仙素毒害深,变异率加大,有待进一步对花粉 DNA 含量的测定。

用秋水仙素诱导多倍体方法在许多植物上获得成功,其方法简便、成功率高。通过试验证明了该方法在新铁炮百合的种子处理上同样适用,种子处理适宜浓度为 0.05%~0.1%,种子萌发处理时间 7~9 d,秋水仙素处理时间 24~36 h。

参考文献

[1] 王新颖,李智辉,邢致远,等.新铁炮百合种子萌发的研究[J].种子,2006,25(9):14-16.
[2] 张楠楠,孙晓梅.秋水仙碱诱导紫花地丁多倍体[J].安徽农业科学,2007,35(7):3012-3013.
[3] 李开隆,肖静,刘桂丰,等.秋水仙素处理诱导大青杨 2n 花粉方法的优化[J].核农学报,2006,20(4):282-286.
[4] 程金新,李云,王勇,等.秋水仙碱诱导银杏花粉染色体加倍的研究[J].北京林业大学学报,2006,28(6):15-21.

Optimization of Inducing 2n Pollen of *Lilium formolongi* by Colchicines

SUN Xiao-mei, WANG Xiao-xiao, JIA Lian, GAO Hao-dan, SUN Hua-kai
(College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: Seeds of *Lilium formolongi* were used as material to explored the method and possibility of use colchicine disposed seeds of *Lilium formolongi* of and induced 2n pollen by the method of orthogonal test design. The results showed that the average treatment time for seed germination of 5 days, colchicine concentration of 0.05% or 0.2% were optimal combination for seed germination of *Lilium formolongi*. At the same time, the rate of orthogonal range analysis of large pollen, the concentration of colchicine was the most important factor induced large pollen, 0.1% colchicine concentration, treatment time was 24 h, 7 d of the treatment time of seed germination, the optimal combination induced large pollen were Tomita No.3.

Key words: *Lilium formolongi*; seed; 2n pollen; orthogonal test; colchicine