

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2018.03.008

美洲黑杨与山杨远缘杂交技术的研究

彭儒胜

(辽宁省杨树研究所, 辽宁 盖州 115200)

摘要:用5种不同处理方法对克服辽宁杨×山杨(正交)和山杨×辽宁杨(反交)的杂交障碍进行研究,并用形态学标记法对杂种进行亲子鉴定。研究表明:正交杂种子代表现出偏母本型、中间型和偏父本型3种类型,而反交杂种子代表现出偏母本型和偏父本型两种类型,证明杂种子代是其真正的杂种,辽宁杨与山杨远缘杂交取得了成功,用正己烷熏蒸柱头后再用花粉提取液处理柱头是克服其正、反交杂交障碍的方法之一。

关键词:美洲黑杨;山杨;远缘杂交;花粉提取液;正己烷

中图分类号:S792.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5508(2018)03-0040-04

Technology of Intersectional Crossing between *Populus deltoides* and *P. davidiana*

PENG Ru-sheng

(Poplar Research Institute of Liaoning Province, Gaizhou 115200, China)

Abstract: The technology of intersectional crossing between *P. deltoides* and *P. davidiana* was studied by five different treatments. And the hybrids and their parents were identified using morphological marker. The results showed that hybrids offspring of *P. liaoningensis* × *P. davidiana* were inclined to partial parent type, intermediate type and paternal parent type, while hybrids offspring of *P. davidiana* × *P. liaoningensis* were inclined to partial parent type and paternal parent type, which meant the hybrid progeny was true hybrids. The effect was better to break incompatible barriers by fumigating stigma with n-hexane followed by brushing stigma with the fluid extracted from pollen.

Key words: *Populus deltoides*, *P. davidiana*, Distant hybridization, The fluid extracted from pollen, Normal hexane

杨树是重要的工业用材和绿化造林树种,由于生长快、生长周期短、分布广,其研究与开发利用受到许多国家和育种学者的重视^[1]。目前,应用于造林的杨树良种大多是通过杂交培育的,已经产生了巨大的经济效益、生态效益和社会效益^[2]。但杨属各派之间亲缘关系远近不同,导致杂交亲和性也不同,亲缘关系较近的容易杂交,而亲缘关系较远的杨树存在杂交障碍。Willing R R. 和 Pryor L D.^[3]研究了多种杨树的种间杂交的可配性关系,研究结果表

明:青杨派、黑杨派、大叶杨派三派之间可配性高,而白杨派与其它四派之间可配性差,很难杂交。国内外不少育种学家曾经对黑杨派与白杨亚派之间杂交进行了研究,有些取得了成功,部分组合还选育出了新品种,但实践证明,黑杨与白杨之间存在严重的杂交障碍。国外学者 Knox^[4]、Guries^[5]、斯塔罗娃^[6]等对美洲黑杨×银白杨、美洲山杨×美洲黑杨、欧洲黑杨×欧洲山杨的远缘杂交进行研究,发现其杂交不亲和,花粉管在柱头表面扭曲盘绕或花粉发芽不正

收稿日期:2018-03-19

基金项目:国家林业公益性行业科研专项经费项目(200904040)

作者简介:彭儒胜(1976-),男,安徽桐城人,硕士学位,教授级高级工程师,主要从事杨树良种选育研究及新品种推广工作。e-mail: pengrusheng@126.com。

常。而 Ronald^[7] 用派内种间杂种作亲本获得了在形态上介于两亲本之间、能扦插生根的杂种。国内研究的主要有:徐纬英^[8] 做了银白杨×欧洲黑杨、毛白杨×欧美杨等组合的杂交,用银白杨花粉的糖蛋白处理柱头,但幼胚仍败育;张绮纹^[9] 等做了银白杨×美洲黑杨、银白杨×欧洲黑杨等组合的杂交,用正己烷处理了花粉和柱头,但未获得成功;吴鸿锦^[10] 等开展了沙兰杨与毛白杨的杂交,选育出沙毛杨;张金凤^[11] 等做了 21 个黑杨派与白杨之间的杂交组合,单交组合没有得到苗木,但 20% 的三交组合和 67% 的双交组合获得了杂种苗,张金凤^[12] 等将黑杨与青杨的杂交种作为中介亲本,与白杨杂交,成功地获得了派间杂交子代;庞金宣^[13] 等培育出窄冠黑白杨,其杂交组合为 I-69 杨×(响叶杨×毛新杨);高建社^[14] 用正己烷处理柱头,成功获得了美洲黑杨 57 号×新疆杨、河北杨×美洲黑杨陕林 3 号杨的杂种苗。但对美洲黑杨与山杨亚派之间的远缘杂交研究较少,为此我们开展了美洲黑杨与山杨的远缘杂交研究,试图研究出克服其杂交障碍的最佳方法,为选育山地杨树优良新(品)系打下基础。

杂交试验在辽宁省杨树研究所(坐落于辽宁盖州)温室内进行。盖州市位于北纬 40°13′-41.57′ 东经 E122°27′-55.78′,渤海辽东湾东岸,属于北温带半湿润、季风气候。年平均气温为 6.9℃~9.5℃,年无霜期为 170 d~186 d,年降水量为 600 mm~790 mm。全年日照时数平原 2 761 h,山区 2 100 h。全年平均风速为 3.1 m·s⁻¹。全市的气候特征是光照充足、气候温和、四季分明。

1 材料与方法

1.1 材料

2015 年 2 月末,从辽宁凌海金城原种场采集美洲黑杨辽宁杨(*Populus liaoningensis*)雌、雄株花枝,从辽宁桓仁库区林场采集山杨(*Populus davidiana*)雌、雄株花枝,采回后放入地窖冷藏备用。搭配成杂交组合辽宁杨×山杨(正交)和山杨×辽宁杨(反交)。

1.2 方法

1.2.1 克服杂交障碍的方法

3 月初对花枝进行室内切枝水培,雄花枝入室水培,室温控制在 15℃~25℃,相对湿度为 50%~70%。散粉前套袋隔离,分品种收集花粉,干燥后放入经消毒的培养皿内用医用胶布密封,按品种贴好标签,再放入 0℃~4℃冰箱中的干燥器内备用。待

将要收集花粉时将雌花枝入室水培,室温 20℃左右,相对湿度 60%~80%。花芽苞片裂开后即套袋隔离,待雌花开放柱头发亮(正交)、雌花序露出苞片 2 cm~3 cm(反交)时进行杂交处理试验。水培至蒴果变黄即将开裂吐絮时套袋,待絮吐出时采收种子,所采收的种子在温室于播种盘内采用点播方式育苗,1 穴播 1 粒种子,裸播不用覆土,播种土壤用高温消毒的腐殖土,保持土壤湿润,温度控制在 20℃~25℃,待小苗长出 3 片真叶后移到营养杯,当幼苗长至 8~10 片真叶时移入大田栽植。水培及苗木管理期间观测每个处理所获得的种子数、种子饱满度、发芽率及成苗率等。

每个组合设计 5 种处理方法,1 是正交时辽宁杨花粉提取液点涂柱头、反交时山杨花粉提取液点涂柱头后授粉;2 是正己烷熏柱头后授粉;3 是用正己烷熏柱头后再用辽宁杨花粉提取液点涂柱头(正交)、山杨花粉提取液点涂柱头(反交)后授粉;4 是用正己烷点涂柱头后授粉;5 是对照,正常授粉。每个处理 2 根花枝,10~12 个花序。

花粉提取液点涂柱头时,用毛笔尖蘸取花粉提取液,轻轻地涂于雌花柱头,点涂时必须均匀且充分,放置 1.0 h 左右待提取液干后授粉

正己烷熏柱头时,将雌花序伸入盛有正己烷的试管中,用其挥发物熏蒸雌花柱头 8 min 左右后授粉。

正己烷点涂柱头时,操作方法同花粉提取液点涂柱头。

花粉提取液的制备方法:按 1 g 花粉与 25 mL~30 mL 蒸馏水的比例混合并进行充分搅拌,静置 30 min,再充分搅拌静置,如此反复 1 次,然后以定性滤纸过滤,所得浅黄色滤液即为花粉提取液。

1.2.2 杂交子代亲子鉴定

形态学标记是亲子鉴定最直接、最简便易行的方法^[15],主要是根据亲本与子代形态特征的相似性来验证是否获得了杂种^[16-17]。在杂交试验当年及第 2 年,观察亲本及杂种子代叶、芽、茎等的表型性状,对其进行亲子鉴定。

2 结果与分析

2.1 不同处理方法对杂交效果的影响

在美洲黑杨与山杨远缘杂交试验中,经不同方法处理后,所获得的种子数及品质(种子饱满度、发芽率、成苗率等)调查结果见表 1 和表 2。

表1 不同处理方法对辽宁杨×山杨杂交效果的影响

Tab.1 Effects of different treatments on the hybridization of *P. liaoningensis* × *P. davidiana*

调查项目 处理方法	种子数 (粒)	饱满度	发芽率 (%)	成苗率 (%)
处理1	155	不饱满	5.2 + 0.25 + C	50.0
处理2	242	不饱满	6.2 + 0.11 + C	46.7
处理3	350	饱满	75.7 + 0.10 + A	86.8
处理4	75	不饱满	10.7 + 0.14 + B	62.5
处理5	20	不饱满	0.0 + 0 + D	0.0

表2 不同处理方法对山杨×辽宁杨杂交效果的影响

Tab.2 Effects of different treatments on the hybridization of *P. davidiana* × *P. liaoningensis*

调查项目 处理方法	种子数 (粒)	饱满度	发芽率 (%)	成苗率 (%)
处理1	30	不饱满	6.7 + 0.11 + B	50.0
处理2	0	--	0.0 + 0.0 + C	0.0
处理3	125	饱满	68.0 + 0.31 + A	76.5
处理4	0	-	0.0 + 0.0 + C	0.0
处理5	0	-	0.0 + 0.0 + C	0.0

由表1得知,在辽宁杨×山杨试验中,处理1至处理4都获得了不同数量的种子与杂种苗,各处理间发芽率差异达到极显著(1%),处理5仅获得75粒种子且不饱满,而处理3获得了350粒饱满种子,发芽率也最高,达到75.7%。由表2得知,在山杨×辽宁杨试验中,只有处理1和处理3获得了杂种苗,各处理间发芽率差异达到极显著(1%),处理1仅获得30粒不饱满种子,而处理3获得125粒饱满种子,发芽率达到68.0%。由此可以初步判断,正己烷有机溶剂熏蒸柱头后再用花粉提取液处理柱头是克服美洲黑杨与山杨之间杂交障碍的方法之一。

2.2 亲子鉴定结果

从亲本及杂种子代表型性状的观测结果来看,辽宁杨与山杨的正、反交都获得了真正杂种,远缘杂交取得了成功。正交的杂种苗表现为3种类型,即偏母本型、中间型和偏父本型,但偏母本型和中间型苗木数量较多,偏母本型的苗木叶为菱状卵形,先端长渐尖,基部截形,边缘具圆锯齿,并有半透明狭边,两面皆为绿色,叶柄长而侧扁,芽宽而尖,有粘质,茎有棱线;中间型的苗木叶卵形或阔卵形,基部浅心形或截形,边缘波状锯齿,叶柄短而扁,叶背面微绒毛,芽宽卵形,茎稍具棱线;偏父本型的苗木叶卵形或阔卵形,基部浅心形或截形,边缘波状锯齿,叶柄短而扁,叶背面微绒毛,芽宽卵形,茎稍具棱线。反交的杂种苗主要表现为偏母本型和偏父本型两种类型,但偏母本型苗木数量较多,偏母本型苗木的叶为卵

圆形,先端钝尖或短渐尖,基部截形或圆形,边缘有浅齿,叶背白色,叶柄侧扁,芽卵形,茎光滑;而偏父本型的苗木叶为三角形,先端宽渐尖,基部微心形,边缘具圆锯齿,叶柄侧扁,芽宽而尖,有粘质,茎稍有棱线。

3 结论与讨论

3.1 在辽宁杨与山杨正、反交试验中,用正己烷有机溶剂熏蒸柱头后再用花粉提取液处理柱头的方法,试验效果最好。通过形态学标记对其进行亲子鉴定表明,所获得的杂种子代是其真正杂种,说明杂交获得成功,此方法是克服黑杨派与山杨亚派远缘杂交障碍的方法之一。

3.2 本研究所采用的方法是克服其受精前障碍的方法之一,有些处理获得的种子不饱满,可能是幼胚败育,如果结合胚挽救等克服受精后障碍的方法,能进一步提高杂交效果。

3.3 在辽宁杨×山杨试验中,处理1至处理4都获得了不同数量的杂种苗,而在山杨×辽宁杨试验中,只有处理1和处理3获得了杂种苗,但都以处理3的效果为最好,且正交比反交的效果好,能否说明辽宁杨×山杨比山杨×辽宁杨的可配性要高,需进一步研究。

3.4 随着现代技术的发展与运用,远缘杂交障碍克服方法也得到了发展,如体细胞杂交、原生质体融合、转基因及花粉管通道法导入外源基因等新技术^[18,19]。本研究采用传统意义上的远缘杂交障碍克服方法,取得了较好效果,因此在今后的研究中,应将传统技术与现代技术结合起来,以提高远缘杂交育种效率,加快育种进程,以缩短育种周期。

参考文献:

- [1] 张金凤,朱之梯. 杨树分派的分子系统学与派间杂交研究进展[J]. 安徽农学通报,2007,13(1):48~51.
- [2] 李志新,戴福. 杨树杂交育种研究进展[J]. 林业科技情报,2015,27(3):27~31.
- [3] Willing R R, Pryor L D. Interspecific hybridization in poplar[J]. Theoretical and Applied Genetics,1976(47):141~151.
- [4] Knox R B, Willing R R, Ashford A E. Pollen wall proteins: role as recognition substances in interspecific incompatibility in poplars[J]. Nature,1972,237:381~383.
- [5] Guries R P, Stettler R F. Pre-fertilization barriers to hybridization in the poplars[J]. Silvae Genet,1976,25:37~44.

- [6] 斯塔罗娃 H B. 杨柳科育种 [M]. 马常耕, 译. 北京: 科学技术出版社, 1984.
- [7] Ronald W G. Intersectional hybridization of populus sections, leuce-aigeiros and leuce tacamahaca [J]. *Silvae Genet*, 1982, 31: 94 ~ 99.
- [8] 徐纬英. 杨树 [M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 1988.
- [9] 张绮纹, 苏晓华. 克服杨树远缘杂交受精前障碍的研究 [J]. *林业科学研究*, 1988(2): 201 ~ 205.
- [10] 吴鸿锦, 刘志光, 韩克展, 等. 新杂交种沙毛杨的选育 [J]. *北京林业大学学报*, 1996, 18(3): 48 ~ 53.
- [11] 张金凤, 朱之梯, 张志毅. 黑白杨派间杂交试验研究 [J]. *北京林业大学学报*, 1999, 21(1): 6 ~ 10.
- [12] 张金凤, 朱之梯, 张志毅等. 中介亲本在黑白杨派间杂交中的应用 [J]. *北京林业大学学报*, 2000, 22(6): 35 ~ 38.
- [13] 庞金宣, 郑世锴, 刘国兴等. 窄冠型杨树新品种的选育 [J]. *林业科学通讯*, 2001(4): 8 ~ 9.
- [14] 高建社. 黑杨与白杨远缘杂交技术的研究 [D]. 西北农林科技大学, 2005.
- [15] 葛颂, 王海群, 张灿明, 等. 八面山银杉林的遗传多样性与群体分化 [J]. *植物学报*, 1997, 39(3): 266 ~ 271.
- [16] 彭儒胜, 赵鑫闻, 王胜东, 等. 美洲黑杨与胡杨杂交及其杂种子代亲子鉴定 [J]. *辽宁林业科技*, 2013(5): 1 ~ 4.
- [17] 杨成超. 银白杨 × 白榆亲子鉴定及子代利用研究 [D]. 中国林业科学研究院, 2005.
- [18] 张妍, 杨成超, 冯连荣, 等. 杨树远缘杂交障碍克服及亲子鉴定技术研究进展 [J]. *辽宁林业科技*, 2015(3): 55 ~ 58.
- [19] 赵鑫闻. 利用花粉管通道技术奖外源银白杨 DNA 导入黑杨 [J]. *植物学报*, 2016, 51(4): 533 ~ 541.

(上接第 28 页)

参考文献:

- [1] Jasechko S, Sharp Z D, Gibson J J, et al. Terrestrial water fluxes dominated by transpiration [J]. *Nature*, 2013, 496(7445): 347.
- [2] Ortuno M F, Garciaorellana Y, Conejero W, et al. Stem and leaf water potentials, gas exchange, sap flow, and trunk diameter fluctuations for detecting water stress in lemon trees [J]. *Trees*, 2006, 20(1): 1 ~ 8.
- [3] 赵春彦, 司建华, 冯起, 等. 树干液流研究进展与展望 [J]. *西北林学院学报*, 2016, 30(5): 98 ~ 105.
- [4] Ballester C, Castel J, Testi L, et al. Can heat - pulse sap flow measurements be used as continuous water stress indicators of citrus trees? [J]. *Irrigation Science*, 2013, 31(5): 1053 ~ 1063.
- [5] Steppe K, Vandegehuchte M W, Tognetti R, et al. Sap flow as a key trait in the understanding of plant hydraulic functioning [J]. *Tree Physiology*, 2015, 35(4): 341 ~ 345.
- [6] 许易梅. 复叶槭(糖槭)的应用现状及发展前景的综合评价 [D]. 东北林业大学, 2004.
- [7] 闻婧, 张俊, 孟力力, 等. 夏季遮光对糖槭光合特性和叶绿素荧光动力学特征的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2015(8): 189 ~ 190.
- [8] 马艳丽, 王鹏. 糖槭的应用价值与栽培技术 [J]. *黑龙江农业科学*, 2013, (5): 154 ~ 155.
- [9] 赵宏. 糖槭叶化学成分及抗氧化、抗炎活性研究 [D]. 佳木斯大学, 2008.
- [10] 马履一, 王华田, 林平. 北京地区几个造林树种耗水性比较研究 [J]. *北京林业大学学报*, 2003, 25(2): 1 ~ 7.
- [11] 赵培强, 赵平, 牛俊峰, 等. 华南地区常见树种导管特征与树干液流的关系 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2014, (6): 537 ~ 548.
- [12] 赵春彦, 司建华, 冯起, 等. 胡杨夜间液流量及其影响因子研究 [J]. *干旱区研究*, 2015, 32(6): 1173 ~ 1180.
- [13] 王华田, 赵文飞, 马履一. 侧柏树干边材液流的空间变化规律及其相关因子 [J]. *林业科学*, 2006, 42(7): 21 ~ 27.
- [14] 蒋文伟, 杨广远, 赵明水, 等. 天目山柳杉树干液流的昼夜及季节变化 [J]. *南京林业大学学报自然科学版*, 2012, 36(5): 77 ~ 80.
- [15] 徐利岗, 苗正伟, 杜历, 等. 干旱区枸杞树干液流变化特征及其影响因素 [J]. *生态学报*, 2016, 36(17): 5519 ~ 5527.
- [16] 周翠鸣, 赵平, 倪广艳, 等. 广州地区木荷夜间树干液流补水的影响因子及其对蒸腾的贡献 [J]. *应用生态学报*, 2012, 23(7): 1751 ~ 1757.
- [17] 凡超, 邱燕萍, 李志强, 等. 荔枝树干液流速率与气象因子的关系 [J]. *生态学报*, 2014, 34(9): 2401 ~ 2410.
- [18] 万艳芳, 于澎涛, 刘贤德, 等. 祁连山青海云杉树干液流密度的优势度差异 [J]. *生态学报*, 2013, 37(9): 1771 ~ 1778.
- [19] 常学向, 赵文智. 荒漠绿洲农田防护树种二白杨生长季节树干液流的变化 [J]. *生态学报*, 2004, 24(7): 1436 ~ 1441.