

杜鹃园艺品种‘王妃’与黄杯杜鹃远缘杂交亲和性研究

郝梓瑶^{1*}, 宋杰², 关文灵^{1#}

¹云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明

²云南省农业科学院花卉研究所, 云南 昆明

收稿日期: 2024年4月17日; 录用日期: 2024年5月20日; 发布日期: 2024年5月31日

摘要

为了更好地利用杜鹃野生资源开展远缘杂交育种, 本试验以杜鹃园艺品种‘王妃’和野生黄杯杜鹃为研究对象, 通过测定花粉活力, 采取不同授粉方法克服种间杂交受精前障碍, 并通过花粉管生长荧光观察确定其杂交不亲和的细胞学特性。结果表明: MTT染色法与离体培养法检测花粉活力差异较大, 黄杯杜鹃花粉经加热培养后, 活力显著降低; 但加热授粉方式坐果率仍然较高。在4种授粉方式中, 常规授粉方式最适合, 坐果率最高。将种胚进行无菌培养后, 其种子不萌发, ‘王妃’与黄杯杜鹃杂交后不亲和。通过荧光观察, 远缘杂交组合在授粉后2 d开始出现大量胼胝质, 最终仅少量花粉管进入胚珠, 该组合存在一定的受精前障碍。

关键词

园艺品种, 黄杯杜鹃, 亲和性, 荧光观察

Study on the Compatibility of Distant Hybridization between *Rhododendron* Horticultural Varieties of ‘Empress’ and *R. wardii*

Ziyao Hao^{1*}, Jie Song², Wenling Guan^{1#}

¹College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan

²Institute of Flowers, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming Yunnan

Received: Apr. 17th, 2024; accepted: May 20th, 2024; published: May 31st, 2024

*第一作者。

#通讯作者。

Abstract

In order to better utilize the wild resources of *Rhododendron* and carry out distant hybrid breeding, this experiment took the horticultural variety *Rhododendron* 'Empress' and the wild *Rhododendron* of *R. wardii* as the research objects, and overcame the prezygotic barrier of interspecific hybrid by different pollination methods, and determined the cytological mechanism of hybrid incompatibility by fluorescence observation. The results showed that there was a conspicuous difference in pollen viability between MTT staining method and pollen germination in vitro method, and the viability of *R. wardii* pollen was significantly reduced after heated culture; however, the fruiting rate of the heated pollination method was still higher. Among the four pollination methods, the conventional pollination method was the most suitable and had the highest fruit set rate. After the seed embryo was aseptically cultured, its seeds did not germinate, and its hybrid incompatibility between *Rhododendron* 'Empress' and *R. wardii*. By fluorescence observation, the distant hybrid combination began to show a large amount of callus 2d after pollination, and eventually only a small amount of pollen tubes entered the ovule, and there was a certain pre-fertilisation barrier in this combination.

Keywords

Horticultural Variety, *R. wardii*, Hybrid Compatibility, Fluorescence Observation

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

安酷杜鹃(Encore® azalea)为映山红亚属的常绿多季开花的园艺杜鹃品种系列,具有长势旺盛、抗逆性好、适应性较强等特点,是理想的盆栽和园林绿化植物,被誉为21世纪销售最好的杜鹃花类群[1] [2] [3]。‘王妃’(*Rhododendron* ‘Empress’)为其市场销售的优秀重瓣品种,应用形式丰富多样,花期可持续半年之久。目前我国市场销售的安酷杜鹃缺少黄色花品种,而我国野生杜鹃花种质资源丰富,其中,黄杯杜鹃(*Rhododendron wardii*) [4]为我国高海拔地区特有的野生杜鹃,具有花朵美丽,颜色鲜艳的特点,是百余种园艺杜鹃品种的母本[5]。尽管我国杜鹃花属植物资源丰富,但园艺品种在花色、花香、株型等方面还有待改良,通过跨亚属的远缘杂交,有利于综合不同亚属多样的优良性状,选育新的优良品种。

培育黄花常绿杜鹃品种已有众多研究,并且一直都是育种工作者的重要目标。有研究者利用开白花的喇叭杜鹃(*Rhododendron discolor*)和火红杜鹃(*Rhododendron neriflorum*)杂交,选育出了较好的黄色品种;用白色或粉色的极大杜鹃(*Rhododendron maximum*)和似血杜鹃(*Rhododendron haematodes*)进行杂交,其后代中也出现了黄色花的植株[6]。由此可见,通过粉色的安酷杜鹃与其他黄色杜鹃杂交培育黄花品种的常绿杜鹃同样具有一定的创新性。

不过迄今为止,我国还未有学者通过杂交成功培育出优秀的黄花常绿杜鹃。一方面我国对杜鹃的现代化育种研究起步较晚[7],另一方面,常绿杜鹃与不同属植物的属间杂交亲和性及其细胞学机理仍不完全明确,相关的受精障碍克服技术远未成熟。因此,探寻常绿杜鹃与黄色杜鹃杂交亲和性的相关机理研究尤为重要。本试验以安酷杜鹃‘王妃’为母本,以黄杯杜鹃为父本,进行远缘杂交亲和性研究,杂交组合同时存在生殖隔离与地理隔离,对于映山红亚属常绿杜鹃远缘杂交育种具有重要意义。同时,通过

不同授粉方式克服杂交受精障碍,明确属间杂交亲和性及其细胞学机理,为培育黄花常绿杜鹃新种质、新品种奠定理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 植物材料

供试材料为安酷杜鹃园艺品种‘王妃’和黄杯杜鹃,杂交亲本生长特性见表1。杂交育种试验于2023年7~10月在云南卉兴农业有限公司试验大棚(地理坐标:24°95'E, 102°24'N)进行,父本黄杯杜鹃花粉采于云南省迪庆藏族自治州白马雪山。

Table 1. Basic characteristics of hybrid parents

表 1. 杂交亲本基本特性

编号	种或品种名	拉丁名	科属	花色	花型	花期
A	‘王妃’	<i>Rhododendron</i> ‘Empress’	杜鹃花科 杜鹃花属	粉色	重瓣	7~12月
B	黄杯杜鹃	<i>R. wardii</i>	杜鹃花科 常绿杜鹃亚属	黄色	单瓣	6~7月

2.2. 试验方法

2.2.1. 花粉活力及萌发测试方法

采用MTT法[8]与离体萌发法[9]测定父本花粉活力,于体式显微镜下拍照记录(拍照倍数×10),设置3组重复统计花粉染色率与萌发率,花粉统计总数>100粒。本试验中,由于‘王妃’雄蕊瓣化,无花药囊,故以同系列安酷杜鹃‘象牙白’(*Rhododendron* ‘Ivory’)为对照组父本。

$$\text{花粉活力}(\%) = \frac{\text{花粉染色数(或花粉萌发数)}}{\text{统计花粉总数}} \times 100\% \quad (1)$$

2.2.2. 杂交授粉方法及结果统计

开花当天进行去雄处理,早上8:00~11:00采用不同授粉方式开展人工授粉试验,每组授粉数量不少于50朵。授粉一个月后统计膨大率,三个月后统计坐果率,授粉六个月后采收成熟的果实。

主要授粉方法为:(1)提前授粉法:在开花1d~2d进行授粉;(2)常规授粉法:在开花4d~6d进行授粉;(3)延迟授粉法:在开花8d~12d进行授粉;(4)加热授粉法:花粉在40℃培养箱培养1h后用于授粉。

$$\text{子房膨大率}(\%) = \frac{\text{杂交果实膨大数}}{\text{杂交花朵数}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{坐果率}(\%) = \frac{\text{杂交有种子果实数}}{\text{杂交花朵数}} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{种子千粒重}(\text{g}) = \text{种子百粒重} \times 10 \quad (4)$$

2.2.3. 杂交种胚培养

将采集回来的杂交种子从果实取出后,50颗为一组,重复三次,避光浸泡于1000ppm的赤霉素溶液中24h后,转入超净工作台进行无菌播种试验。培养基配方为:MS培养基+2mg·L⁻¹GA₃+0.1mg·L⁻¹NAA+7.5g·L⁻¹琼脂+30g·L⁻¹蔗糖,播种一个月后统计种子萌发率。

$$\text{萌发率}(\%) = \frac{\text{萌发种子数}}{\text{供试种子数}} \times 100\% \quad (5)$$

2.2.4. 花粉管生长动态观察

在母本开花第5~6d天,柱头分泌大量粘液时,对其进行人工授粉。采取授粉后8h、1d、2d、4d、

7 d、8 d、10 d、12 d 及 14 d 的柱头 5~8 个，放入 FAA 固定液(甲醛:冰醋酸:70%酒精 = 1:1:18)中保存于 4℃ 冰箱待用。参照 Williams 等[10]的方法，取出待测柱头，70%酒精 - 50%酒精 - 30%酒精 - 蒸馏水逐级复水漂洗后，于 4 mol·L⁻¹ NaOH、60℃ 培养箱中软化 4 h。蒸馏水漂洗后于 0.1% 苯胺蓝染色液中避光染色 24 h，染色完成后将子房纵切进行压片，并于荧光显微镜(徕卡 MZ16)下观察、拍照。

2.3. 数据分析

数据统计使用 Excel2016, SPSS26.0 (IBM, 美国)进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和最小显著差异法(LSD)进行多重比较。数据分析前，应对数据进行正态分布检验，并验证方差齐次性，数据同时满足正态性与齐次性后进行方差分析。显著性分析基于单因素方差分析和 LSD 多重比较($P < 0.05$)，结果均以平均值±标准差表示。并使用 GraphPad Prism 9.0 绘制柱状图。

3. 结果与分析

3.1. 花粉活力测定结果

MTT 染色液所测定的花粉活力高于花粉离体萌发法所测定的结果(图 1)。从 MTT 染色法所测定的花粉活力结果来看，黄杯杜鹃花粉活力为 84.97%；将花粉加热培养 1 h 后，其花粉活力无显著差异。而花粉离体萌发结果与染色结果差异较大，经花粉离体培养后，黄杯杜鹃活力较低，为 39.55%；加热培养后花粉活力显著下降，为 24.06%。‘象牙白’在两种测定方法下花粉活力相近，在 70%左右。使用 MTT 法所测定的花粉活力在 60%以上，离体萌发法测定结果在 20%以上，可用于杂交授粉。

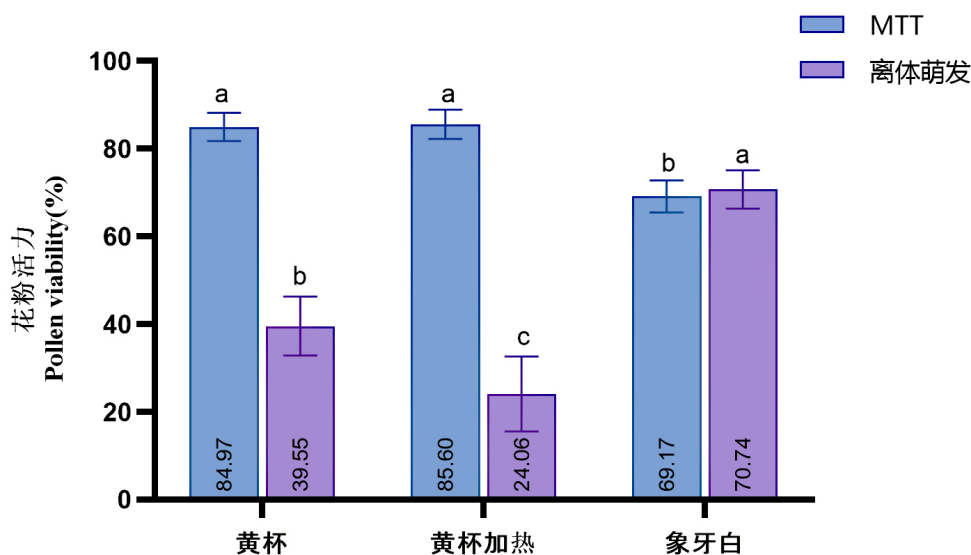


Figure 1. Results of pollen viability measurement
图 1. 花粉活力测定结果

3.2. 不同授粉方式对‘王妃’杂交结实的影响

4 种授粉方式对‘王妃’与黄杯杜鹃杂交结实特性的影响如表 2 所示。常规授粉方式的膨大率与坐果率均高于其他 3 种授粉方式，提前授粉方式均低于其他授粉方式，不适合用于‘王妃’的杂交育种中；常规与加热授粉方式坐果率最高，分别为 47.06% 与 46.43%，该组合较适合这两种授粉方式。其对照组‘王妃’ × ‘象牙白’坐果率为 85.29%，显著高于远缘杂交组合。在‘王妃’ × 黄杯杜鹃中，4 种授粉方

式对蒴果平均种子数影响较小, 但坐果率较低的提前与延迟授粉方式, 其种子千粒重相对更重, 与对照组种子千粒重(0.044 ± 0.004 g)无显著差异。

将所获得的远缘杂交种子及其对照组种子进行无菌培养, 种子萌发结果如图 2。‘王妃’与黄杯杜鹃杂交后, 其杂交种子均不萌发(图 2(A)), 单位种子不具有可育性; 而对照组‘王妃’×‘象牙白’萌发率较高(图 2(B)), 为 78.33%, 显著高于远缘杂交组合。

Table 2. Hybrid fruiting and germination situation of *Rhododendron* ‘Empressand’ and *R. wardii*

表 2. ‘王妃’与黄杯杜鹃杂交结实及萌发情况

杂交组合	授粉方式	膨大率/%	坐果率/%	蒴果平均种子数/粒	种子千粒重/g	萌发率/%
‘王妃’ × 黄杯杜鹃	常规	55.88	47.06	$105.67 \pm 20.43d$	$0.0207 \pm 0.0021c$	
	加热	51.79	46.43	$89.33 \pm 16.86d$	$0.0167 \pm 0.0028c$	
	提前	16.36	10.91	$86.67 \pm 28.22d$	$0.042 \pm 0.0082b$	0
	延迟	31.58	26.32	$118.33 \pm 12.9d$	$0.0365 \pm 0.0027b$	
‘王妃’ × ‘象牙白’	常规	94.12	85.29	$847.67 \pm 48.05a$	$0.044 \pm 0.004b$	78.33



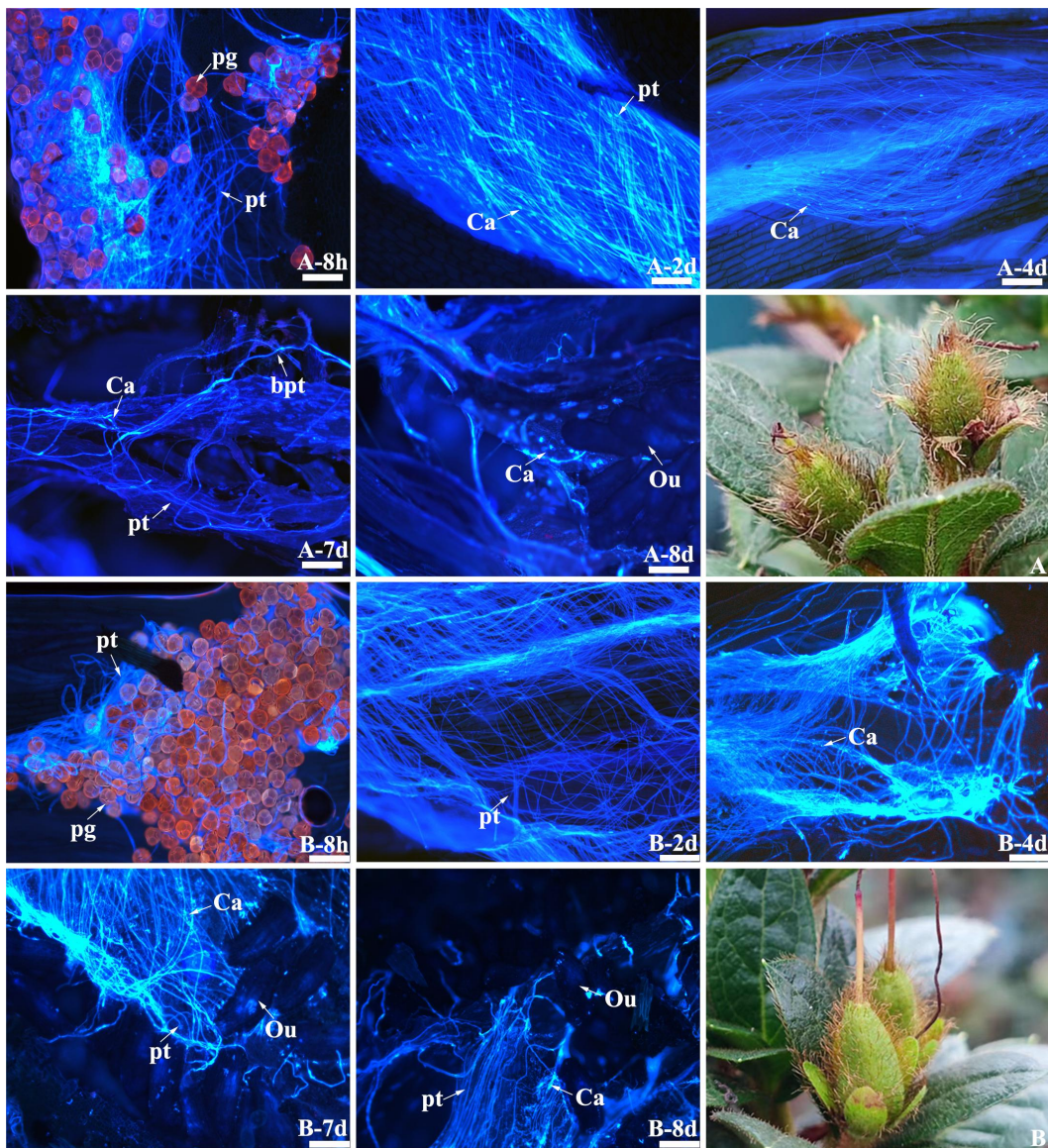
注: A: “王妃” × 黄杯杜鹃; B: “王妃” × “象牙白”。

Figure 2. Results of hybrid seed embryo culture

图 2. 杂交种胚培养结果

3.3. 花粉管生长动态观察

‘王妃’花粉管荧光观察结果如图 3, ‘王妃’ × 黄杯杜鹃授粉 8 h 后花粉粒在柱头大量萌发(图 3(A)-8 h), 2 d 后花粉管沿着柱头有序向下生长的同时出现大量胼胝质(图 3(B)-2 d), 授粉 4 d 后花粉管成束生长到柱头二分之一处时花粉管逐渐减少(图 3(A)-4 d), 授粉 7 d 后观察到少量花粉管到达子房, 花粉管出现分支现象(图 3(A)-7 d), 授粉后 8 d 观察到极少数花粉管进入胚珠(图 3(A)-8 d); 授粉 2 个月后, 杂交果实较小(图 3(A)), 整体坐果率不高, 表明‘王妃’ × 黄杯杜鹃远缘杂交存在一定的受精前障碍。对照组‘王妃’ × ‘象牙白’花粉管生长速度较快, 授粉 8 h 后花粉粒在柱头大量萌发(图 3(B)-8 h), 2 d 后花粉管成束向下生长到柱头二分之一处(图 3(B)-2 d、图 3(D)-1 d), 4 d 后花粉管到达子房入口(图 3(B)-4 d), 子房开始产生大量胼胝质, 授粉 7 d、8 d 后观察到较多花粉管进入子房和胚珠(图 3(B)-7 d、图 3(B)-8 d); 授粉 2 个月后, 杂交果实均较饱满(图 3(B)), 杂交组合坐果率高, 授粉后能正常结实, 且种子萌发率高。



注：图片均为放大 10 倍后的结果；A. ‘王妃’ × 黄杯杜鹃授粉后 2 个月，杂交果实较小；B. ‘王妃’ × ‘象牙白’授粉后 2 个月，杂交果实饱满；A-8 h~A-8 d. ‘王妃’ × 黄杯杜鹃杂交组合授粉后 8 h 至 8 d 花粉管发育情况；B-8 h~B-8 d. ‘王妃’ × ‘象牙白’杂交组合授粉后 8 h 至 8 d 花粉管发育情况。(pg.花粉粒；pt.花粉管；Ca.胼胝质；bpt.花粉管分枝现象)

Figure 3. Fluorescence observation of pollen tube growth in *Rhododendron* ‘Empress’ × *R. wardii* and *Rhododendron* ‘Empress’ × *Rhododendron* ‘Ivory’

图 3. ‘王妃’ × 黄杯杜鹃及 ‘王妃’ × ‘象牙白’ 花粉管生长荧光观察

4. 讨论

在高等植物的有性生殖中，植物花粉活力的高低与杂交授粉能否成功有着密切联系，明确父本的花粉活力是开展杂交育种的前提，也是避免杂交育种时因花粉活力较低而导致结实率低的重要技术措施 [11]。目前测定杜鹃花粉活力的主要方法包括染色法与离体萌发法，其中染色法较为快速便捷，但易受花粉细胞完整性、酶活性和营养物质含量等的影响 [12]。对于杜鹃花粉活力测定而言，MTT 染色法是简单快速测定其活力的最适染色法 [13]。相比之下，离体萌发试验只能用于测定成熟花粉的活力，且花粉萌发

率受材料基因型、萌发培养基成分、温度和湿度等不同因素影响较大[14] [15] [16]。本研究中, MTT 染色法所测定的花粉活力结果较离体萌发法偏高,其原因可能由于 MTT 染色液会使未成熟或已衰败的花粉粒着色。花粉经加热培养后, MTT 染色法显示其活力无显著差异,该结果与杂交授粉数据一致。在离体萌发法中黄杯杜鹃花粉活力较低,可能与花粉离体培养时间有关,李斯宇[17]等对榴莲不同品种花粉离体培养发现离体培养 8 h 花粉活力最高,可适当延长培养时间加以验证。

亲和性是杜鹃花属植物育性研究的核心问题,判断杂交亲和性的直接指标是受精过程完成与否[18]。本研究选取坐果率及萌发率作为判定杂交亲和性的间接指标,分别体现了种胚的发育情况及其受精率[19]。试验中,‘王妃’与黄杯杜鹃杂交后,收获的杂交果实较小,虽能获得杂交种子,但种子不萌发,杂交组合为不育型。根据荧光观察可知,少部分花粉管能进入子房完成受精,但其种胚不能萌发,可能其发育后期出现胚及胚乳降解等现象导致其种胚不能正常萌发。

在高等植物中,花粉萌发和花粉管生长对开花植物的有性生殖至关重要,植物双受精前的任何失败都属于受精前障碍[20]。荧光显微技术是一种相对快速、可靠的鉴定植物杂交不亲和的方法,它是对花粉管在雌蕊中生长过程进行观察[21]。在本试验中,根据花粉管荧光观察结果可知,‘王妃’×黄杯杜鹃杂交后存在一定的受精前障碍,仅少部分花粉管进入子房完成受精;受精 2 d 后,柱头内部产生大量胼胝质,阻碍其花粉管继续向下生长,授粉后 4 d,向下生长的花粉管减少,最终仅极少数的花粉管进入胚囊。同时,通过观察发现,与不亲和的花粉管中所积累的大量胼胝质相反,对照组花粉管表现出小的、断续的、大间距胼胝质塞,因而花粉管生长迅速,且大量花粉管进入胚珠完成受精。

5. 结论

MTT 染色法测定黄杯杜鹃花粉活力结果偏高,为 84.97%;而花粉离体培养结果仅为 39.55%,且加热培养后花粉活力显著下降。

本试验所用的 4 种授粉方式均不能有效克服‘王妃’×黄杯杜鹃的受精前障碍,常规与加热授粉方式坐果率较高,分别为 47.06%与 46.43%。

通过荧光观察发现,‘王妃’×黄杯杜鹃杂交后产生大量的胼胝质,仅少量花粉管进入子房,存在一定的受精前障碍。同时,杂交种子均不能萌发,‘王妃’与黄杯杜鹃杂交后也存在一定的受精后障碍,远缘杂交组合极不亲和。

基金项目

云南省科技厅重大科技专项 - 云南重要园林木本花卉的种质关键技术研究(202302AE090018)

参考文献

- [1] 郭兰. 安酷杜鹃品种资源及其应用[J]. 现代农业科技, 2020(6): 145-146.
- [2] 张春英. 杜鹃花主要品种类群及培育历史[J]. 中国花卉园艺, 2022(4): 52-57.
- [3] 谢嘉尧. 杜鹃组培快繁技术研究[D]. [硕士学位论文]. 长沙: 中南林业科技大学, 2023.
- [4] 彭绿春, 李树发, 宋杰, 等. 云南迪庆州黄杯杜鹃资源现状调查和分析[J]. 中国野生植物资源, 2019, 38(4): 96-99.
- [5] 孙灏, 阿珠. 认识中国植物——青藏高原分册[M]. 广州: 广东科技出版社, 2018: 96.
- [6] 王禹, 张广辉, 赫京生, 等. 杜鹃花色研究进展[J]. 世界林业研究, 2020, 33(5): 19-24.
- [7] 李佳静, 陈亮明. 杜鹃花的育种研究进展[J]. 绿色科技, 2022, 24(7): 110-112, 115.
- [8] 骆东灵, 张颢, 邱显钦, 等. 22 个蔷薇野生资源的花粉活力和柱头可授性分析[J]. 分子植物育种, 2023, 1-13.
- [9] 白天, 解玮佳, 李世峰, 等. 糖、硼、钙对大喇叭杜鹃四合花粉萌发的影响[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),

- 2013, 31(6): 48-54, 60.
- [10] Williams, E.G., Knox, R.B. and Rouse J.L. (1982) Pollination Sub-Systems Distinguished by Pollen Tube Arrest after Incompatible Interspecific Crosses in *Rhododendron* (Ericaceae). *Journal of Cell Science*, **53**, 255-277. <https://doi.org/10.1242/jcs.53.1.255>
- [11] 刘向东, 殷云龙. 不同固体培养基配方对台湾含笑花粉萌发的影响及台湾含笑杂交亲和性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(2): 49-56.
- [12] Kosel, J., Vižintin, L., Majer, A., *et al.* (2018) Staining for Viability Testing, Germination and Maturation of *Sambucus nigra* L. Pollen *in Vitro*. *Biotechnic & Histochemistry*, **93**, 258-266. <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1425912>
- [13] 张超仪, 耿兴敏. 六种杜鹃花属植物花粉活力测定方法的比较研究[J]. 植物科学学报, 2012, 30(1): 92-99.
- [14] Adhikari, K.N. and Campbell, C.G. (1998) *In Vitro* Germination and Viability of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*-Moench) Pollen. *Euphytica*, **102**, 87-92. <https://doi.org/10.1023/A:1018393425407>
- [15] Marcellán, O.N. and Camadro, E.L. (1996) The Viability of Asparagus Pollen after Storage at Low Temperatures. *Scientia Horticulturae*, **67**, 101-104. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00949-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00949-1)
- [16] Rosell, P., Herrero, M. and Sauáco, V.G. (1999) Pollen Germination of Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *In Vivo* Characterization and Optimization of *in Vitro* Germination. *Scientia Horticulturae*, **81**, 251-265. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00012-6)
- [17] 李斯宇, 冯学杰, 王海波, 等. 2个榴莲品种花粉数量及花粉生活力的比较研究[J]. 中国果树, 2023(8): 66-71.
- [18] 郝瑞娟, 穆鼎, 张檀, 等. 百合品种间杂交的初步研究[J]. 西北林学院学报, 2005(3): 87-89, 130.
- [19] Sakai, K., Ozaki, Y., Ureshino, K., *et al.* (2008) Interploid Crossing Overcomes Plastome-Nuclear Genome Incompatibility in Intersubgeneric Hybridization between Evergreen and Deciduous Azaleas. *Scientia Horticulturae*, **115**, 268-274. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.09.004>
- [20] Djordjevic, M., Cerovic, R., Radicevic, S., *et al.* (2014) Incompatible Pollen Tubes in the Plum Style and Their Impact on Fertilization Success. *Genetika*, **46**, 411-418. <https://doi.org/10.2298/GENSR1402411D>
- [21] Radovic, A., Cerovic, R., Milatovic, D., *et al.* (2020) Pollen Tube Growth and Fruit Set in Quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *Spanish Journal of Agricultural Research*, **18**, e0702. <https://doi.org/10.5424/sjar/2020182-15551>