

宁夏枸杞繁育系统初步研究

秦 垦¹, 王 兵², 焦恩宁¹, 李云祥¹, 王 俊²

(1. 宁夏枸杞工程技术研究中心, 银川 750002; 2. 宁夏大学, 银川 750021)

摘 要: 运用 TTC 法、联苯胺—过氧化氢法、P/O 比、OCI 和套袋实验, 对宁夏枸杞种内各参试材料花粉活力、柱头可授性及繁育系统进行了研究。结果表明: 宁夏枸杞花粉数量/胚珠比大于 4 000, 杂交指数介于 3~4, 结合人工授粉和套袋实验结果可以确定在参试的 13 个品种(系)中麻叶系材料(宁杞 1 号、2 号、大麻叶、小麻叶)表现为部分自交亲和; 而其它材料(白花、白条、宁杞 3 号、尖头圆果、圆头圆果、蒙杞 1 号、扁果、0701、0616)表现为自交不亲和, 同株异花、异株异花几乎不坐果, 自然条件下只有通过与其他材料混植的途径来实现结实。由于自交亲和水平极低, 宁夏枸杞的繁育系统应属于专性异交(除麻叶系材料)。

关键词: 宁夏枸杞; 繁育系统; 花粉活力; 柱头可授性; 套袋实验

中图分类号: Q945.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)05-0587-05

Preliminary study on the breeding system of *Lycium barbarum*

QIN Ken¹, WANG Bing², JIAO En-Ning¹,
LI Yun-Xiang¹, WANG Jun²

(1. Ningxia Wolfberry Developmental Engineering and Technology Research Center, Yinchuan 750002, China; 2. Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The pollen viability, stigma receptivity and breeding system of *Lycium barbarum* were studied by using TTC, benzidine-hydrogen peroxide, pollen-ovule ratio, out-crossing index and bagging experiment. The results showed that, the ratio of pollen quantity and ovule of *L. barbarum* is more than 4 000, and hybrid index is between 3 and 4. The combination of artificial pollination and bagging experiments determined that among these 13 participants, Maye(Ningqi 1, Ningqi 2, Damaye, Xiaomaye) performed partly as self-compatible, while other materials(Baihua, Baitiao, Ningqi 3, Jiantouyuanguo, Yuantouyuanguo, Mengqi 1, Bianguo, 0701 and 0616) showed self-incompatible, flower with different strains, different strains of different flower hardly setting, and under natural conditions only through mixing with other materials can they achieve replanting seed. Because of the extremely low level self-compatibility, the breeding system of *L. barbarum* should belong to obligate xenogamy(except the Department of Maye).

Key words: *Lycium barbarum*; breeding system; pollen vitality; stigma receptivity; bagging experiment

繁育系统通常的定义是代表直接影响后代遗传组成的所有有性特征, 主要包括花综合特征、花各器官的寿命、花开放式样、自交亲和程度和交配系统, 它们结合传粉者和传粉行为是影响生殖后代遗传组成和适合度的主要因素(何亚平等, 2003)。其在决定植物的进化路线和表征变异上起着重要作用, 是

种群有性生殖的纽带(Grant, 1981; 肖宜安等, 2004)。植物繁育系统已成为一个以“生殖”为核心, 以探讨物种多样性发生历史、维持机理和保护策略为最终目的的综合交叉研究(何亚平等, 2003)。清晰界定物种的繁育系统类型有助于从确保生殖的角度, 指导农业生产者实现丰产。

收稿日期: 2008-12-05 修回日期: 2009-03-19

基金项目: 宁夏科技攻关重点项目(KCZ-09-07-04); 宁夏自然科学基金(NZ0853)[Supported by Key Technologies Research and Development of Ningxia(KCZ-09-07-04); the Natural Science Foundation of Ningxia(NZ0853)]

作者简介: 秦垦(1971-), 男, 宁夏石嘴山人, 副研究员, 主要从事枸杞遗传育种研究, (E-mail) qinken7@163.com。

宁夏枸杞 (*Lycium barbarum*) 为茄科 (Solanaceae) 枸杞属 (*Lycium*) 多年生落叶灌木, 是我国特有的药用资源植物(匡可任等, 1978)。目前, 尽管国内外对枸杞生长发育规律等进行了广泛的研究, 也获得了一定的成果, 但是国内外科研机构的研究大多集中在栽培、育种及化学成分、药理和形态标记等方面, 对宁夏枸杞的传粉生物学特性的研究尚未见报道, 特别是对宁夏枸杞繁育系统的了解不够深入。确保生殖成功是在种植过程中增收的关键, 主栽品种宁杞 1 号由于具有高自交亲和水平, 使枸杞的繁育系统研究长期被业内界人士忽视。近年来大量枸杞新优系不断涌现, 许多优系与其它材料混植时状态良好, 但当大面积连片种植时落花严重。针对这一问题, 我们通过对花粉活力与柱头可授性检测、花粉—胚珠比估算、杂交指数的估算以及套袋实验等方法, 揭示其繁育系统特征, 阐明诸多新品系落花背后的原因, 进而为该物种的选种、育种及实际生产提供科学依据, 同时也可以推演宁夏枸杞多样性发生的历史和在人为驯化过程中的进化路线, 服务于实际生产。

1 研究地点及材料

研究样地位于宁夏农林科学院枸杞种质资源圃 (106°09'10" E, 38°38'49" N), 海拔 1 114 m, 以宁夏枸杞各品种(系)(宁杞 1 号、2 号、3 号、白花、大麻叶、白条、尖头圆果、圆头圆果、小麻叶、蒙杞 1 号、扁果、0701、0416 等)为材料。

2 研究方法

2.1 开花动态与花部形态特征的观测

随机标记各参试材料一年生枝 10 个, 观察开花物候及单花形态及其在时间上的变化(以花冠萎焉、柱头干瘪作为花期结束的标志)。

2.2 花粉活力检测

花粉活力检测采用的 TTC(氯化三苯基四氮唑 2,3,5-triphenyl tetrazolium chofide)染色法(Cruden, 1977)。即取 0.05 g TTC 溶解在 10 mL 磷酸缓冲液(pH 值为 7.17)中, TTC 现配现用。取各材料散粉后不同时间的花粉于载玻片上, 滴加含有 0.5% TTC 溶液 1~2 滴, 用解剖针搅拌均匀, 迅速盖上盖玻片, 将制片放置 35 °C 恒温箱中 20 min 后,

在显微镜下观察, 有活力的花粉被染成红色, 没有活力的不被染色。每个材料观察 3~5 个制片, 每片任选 5 个视野, 统计全部花粉中染成红色的花粉所占比例, 即花粉的活力。

2.3 柱头可授性检测

依据 Dafni(1992)的方法, 用联苯胺—过氧化氢法测定柱头可授性。即在盛花期, 标记已现蕾的各品系花 60 朵, 分别在不同时期取材, 将其柱头浸入凹面载玻片含有联苯胺—过氧化氢反应液(1% 联苯胺: 3% 过氧化氢: 水=4: 11: 22; 体积比)的凹陷处, 染料可与花粉管内胼胝质结合, 若柱头具可授性, 则柱头周围的反应液呈现紫黑色并有气泡出现。

2.4 花粉量与胚珠比(P/O)的估算

随机取刚开放而花药尚未开裂的花朵去冠后倒置入 1.5 mL 离心管中, 静置待自然散粉后用手指轻弹离心管, 使花粉全部落入离心管底部, 滴加 0.5% 醋酸洋红溶液, 定容至 1 mL, 摇匀后用移液枪取 5 μ L 于血球计数板上, 在显微镜下统计其花粉粒数目。重复 5 次, 计算出单个花朵的平均花粉粒数, 取同一朵花的子房, 用解剖针剥开在解剖镜下记录胚珠数目。用该花的花粉总量除以胚珠数目得该朵花的 p/o 比。

依据 Cruden(1977)的划分标准, P/O 为 18.1~39.0 时, 繁育系统为专性自交(Obligate autogamy); P/O 为 31.9~396.0 时, 繁育系统为兼性自交(Facultative autogamy); P/O 为 244.7~2 588.0 时, 繁育系统为兼性异交(Facultative xenogamy); P/O 为 2 108.0~195 525.0 时, 繁育系统为专性异交(Obligate xenogamy)。

2.5 杂交指数(OCI)的估算

OCI 由三个花部特征决定, 计算方法如下: ①单花或头状花序直径。分成 4 个等级, 0~1 mm 计为 0; 1~2 mm 计为 1; 2~6 mm 计为 2; >6 mm 计为 3。②花药开裂和柱头可授性在时间上可能是不一致的。雌雄蕊同熟和雌蕊先熟计为 0, 雄蕊先熟计为 1; ③柱头和花药在空间上的相对位置。假如柱头和花药在同一个水平位置, 二者间有可能接触计为 0, 假如二者在空间上存在隔离, 不能接触, 计为 1。累计分值: OCI=0 闭花受精型(Cleistogamy); OCI=1 专性自交型(Obligate autogamy); OCI=2 兼性自交型(Facultative autogamy), 有一定异交可能; OCI=3 兼性异交型(Facultative xenogamy), 自交亲和, 但假如雌雄异熟则趋向于雌蕊先熟, 这类型的植物常产生

蜜汁,部分种需要传粉者;OCI=4 异交型(Xenogamy),部分自交亲和,异交,多数种要传粉者。

2.6 套袋实验

依 Dafni 描述的方法进行;(1)对照:不套袋,不去雄,自由传粉,用于检测自然条件下的传粉情况;(2)开花前套袋,不去雄,检测是否需要传粉者;(3)同株异花授粉,去雄,套袋,同株异花之间人工授粉,检测是否受精结实;(4)人工异株异花授粉,去雄,套袋,用不同植株的花粉进行异花授粉,检测是否亲和杂交;(5)自然条件下的异花传粉,不套袋,去雄,自由传粉,检测异花花粉对其结实的贡献;(6)去雄,套袋,检测是否有无融合生殖。

以上每个处理方法选取各材料一年生枝和当年

生枝的花各 30 朵花进行标记,从而统计结实率。

3 结果与分析

3.1 开花物候与花部形态特征

除白花、蒙杞 1 号、0701 和 0616 外大多数品系一年生枝花量大,所有品系当年春、秋各发枝 1 次,当年生枝边抽枝边现蕾开花,春季所发当年生枝是宁夏枸杞的主要产量构成枝组。一年生枝和当年生春枝花期衔接较紧,使枸杞成龄树的花期明显的分为 4 月底至 6 月下旬的夏季主花期和 8 月中旬至 9 月下旬的秋季主花期。花在当年生枝上 1~2 朵生于叶腋,在一年生枝上 2~6 朵同叶簇生,花梗长 1

表 1 室温下枸杞花粉活力检测结果
Table 1 The result of pollen viability test under room temperature

散粉后时间 Time after anther dehiscence	宁杞 1 号 Ninqi 1	宁杞 2 号 Ninqi 2	宁杞 3 号 Ninqi 3	白花 Baihua	大麻叶 Damaye	白条 Baitiao	尖头圆果 Jiantouyuanguo	圆头圆果 Yuantouyuanguo	小麻叶 Xiaomaye
0 h	94.39	93.15	92.78	91.41	92.23	92.45	92.36	0	92.07
12~24 h	88.65	91.85	89.54	89.42	89.84	89.53	91.39	0	90.67
3 d	85.92	90.46	83.24	84.99	81.02	82.31	81.61	0	87.36
6 d	68.35	64.26	69.19	67.68	62.62	61.49	75.03	0	67.58
9 d	38.72	36.23	38.73	37.03	34.51	30.02	50.17	0	39.86
12 d	13.24	14.26	14.19	13.63	12.60	11.85	32.03	0	11.26
15 d	2.42	0	3.13	3.98	0	2.25	16.58	0	4.90

~2 cm,花萼钟状,长 4~5 mm,通常 2 中裂,裂片有小尖头或顶端又 2~3 齿裂;花冠漏斗状,董色,筒部长 8~10 mm 自下部向上扩大。裂片长 5~6 mm,卵形,顶端圆钝,基部有耳,花开放时平展,雄蕊的花丝基部稍上处及花冠内壁同一水平上生一圈密绒毛(路安民,1981)。一般情况下(除阴雨天气)花冠绽放后 2 h 花药逐次开裂散粉,8 h 后花药上的大多数花粉在外力的作用下自花药上失去,花药药壁变为褐色,48 h 后柱头逐渐失去光泽,花朵萎焉。参试品系的始花期与盛花期略有差异。

3.2 花粉活力检测

由表 1 可知,圆头圆果应属于花粉无活力型雄性不育。此外,花粉刚散粉时参试品系花粉均具有很高的活力,在 92%左右,散粉后 12~24 h 花粉活力约 90%,至散粉第 3 天有所下降,约 84%,至散粉后第 15 天花粉基本丧失其活力。

花粉活力的丧失是一个连续的过程,没有明显的界限标志。植物花粉的活力与寿命因植物种不同及环境条件不同而有所差异:如海枣的花粉可维持生活力数月至一年,茄的花粉在夏季只能存活 1 d,

在冬季则能维持 3 d(胡适宜,1982);而低温、低湿度可延长双核花粉的活力,三核花粉则以高湿度为好(方炎明等,1996)。对宁夏枸杞而言,花粉在室温下存活时间较长,约 15 d。

3.3 柱头可授性检测

在自然条件下,枸杞柱头在冠显时已具可授性,冠驰与花后第 3 天随材料的不同有可授性或较强可授性,花后 0~48 h 均具强或最强可授性,柱头具有长时间的可授性,使完成受精的可能性增大,授期为 3 d 左右,但柱头可授性开始时间及最佳时间、延长时间也能影响枸杞异交率及自交率大小(表 2)。

3.4 花粉量与胚珠比(P/O)

经过检测,宁夏枸杞各品种每朵花的花粉量差异不大,花粉量约 220 000,胚珠数 35~49,P/O 为 2 851~9 522,主要集中在 4 000 左右,依据 Cruden 的划分标准确定枸杞的繁育系统应为专性异交类型(Obligate xenogamy)。

3.5 杂交指数(OCI)

宁夏枸杞所有品系的花冠直径均超过 6 mm,可计为 3;所有品系在冠驰时拨蕾授以异源花粉均

可坐果,花药却要在花冠打开 2 h 后才开裂散粉,上述现象表明宁夏枸杞是雌蕊先熟,应计为 0;所有参试材料的单花花药虽与柱头离生,但花药散粉盛期花冠筒轴线多趋于水平,花药在垂线上居于柱头的上方,且柱头可接受花粉的极面显著的向上方扭转,鉴于此,我们认为其 OCI 值介于 3 或 4(表 3)。

表 2 枸杞柱头可授期检测结果
Table 2 Test for stigma receptivity of *Lycium barbarum*

开花后时间 Time after blooming	宁杞 1 号 Ninqi 1	宁杞 2 号 Ninqi 2	宁杞 3 号 Ninqi 3	白花 Baihua	大麻叶 Damaye	白条 Baitiao	尖头圆果 Jiantouyuanguo	圆头圆果 Yuantouyuanguo	小麻叶 Xiaomaye
-12~-6 h	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-6~0 h	++	+++	+	++	++	++	++	++	++
0~12 h	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
12~24 h	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
24~36 h	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
36~48 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
48~60 h	++	++	++	++	++	++	++	++	++
60~72 h	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
72 h 以后	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注:“-”表示柱头不具可授性;“-/+”指部分柱头具可授性,部分柱头不具可授性;“+”表示柱头具可授性;“++”表示柱头可授性较强;“+++”表示柱头具强可授性;“++++”柱头具最强可授性。
Note:“-”menans no stigma reception;“-/+”menans some stigmas have receptivity, some havent;“+”menans stigmas have receptivity;“++”menans stigmas have high receptivity;“+++”menans stigmas have higher receptivity;“++++”menans stigmas have highest receptivity.

表 3 宁夏枸杞杂交指数观测结果
Table 3 The out-crossing index of *Lycium barbarum*

观测项目 Items	花朵直径 Diamter of flower	花药散粉与柱头可授期时间间隔 Temporal separation of anther dehidcence andstigma receptinity	柱头与花药空间间隔 Spatial positioning of stigma and anthers	OCI 值 OCI value	繁育系统类型 Type of breeding system
结果 Result	>6 mm=3	雌蕊先熟=0Protandry=0	0 or 1	3 or 4	繁育系统为兼性或专性异交 (Obligat xenogamy)

3.6 套袋实验

由表 4 可知,各参试材料去雄套袋均不坐果表明宁夏枸杞不存在无融合生殖现象;不去雄不套袋,自然条件下自由传粉的结果显示参试各品系均有 10%以上的坐果率,坐果率在不同品系间有着较大差异,一年生枝和当年生枝之间的坐果率有着一定的差异,这主要是不同品系间存在自交亲和水平的差异,由于一年生枝的花期不一致,自交不亲和的品系授粉质量受到了影响,例如:一年生枝花期明显较主栽品种宁杞 1 号提前的“白花”两者之间的差距最大,达到了 56.8%;不去雄,开花前套袋,除宁杞 1 号、2 号、大麻叶和小麻叶外其它材料坐果率均为 0,可见绝大多数品系自交亲和水平极低或完全自交不亲和结实需要传粉(异株异花、品系异花)这一过程来实现;去雄,套袋,人工同株异花授粉,宁杞 1 号,宁杞 2 号、大麻叶均有 10%以上的坐果率,坐果率提高幅度最大的宁杞 1 号,坐果率由 20%左右上升到了 80%以上,这一实验结果从生殖生物学的角度

印证了宁杞 1 号、宁杞 2 号、小麻叶这些品系来源于大麻叶这一群体的客观育种过程,并与石志刚等(2008)关于分子生物学方面的研究结果趋于一致;去雄,套袋,人工异品系异花授粉,除宁杞 2 号外绝大多数均达到 80%以上;从生殖生物学的角度看所有参试材料均属于宁夏枸杞,品系间有着良好种内的杂交亲和水平;去雄不套袋,自然条件下自由传粉,参试品系的坐果率总体有所下降,表明花粉和花蜜两者均是传粉媒介的报酬,花粉的缺失降低了枸杞花朵对传粉媒介的吸引力。从套袋实验的结果中还不难看出,不去雄花前套袋和同株异花授粉之间麻叶系(大、小麻叶,宁杞 1、2 号)存在着显著的差异,表现为部分自交不亲和,其余参试品系不论是同株同花自交、还是同株异花自交均表现为不亲和,鉴于柱头与花药的空间隔离远不如自交不亲和这种最为彻底的生育隔离形式有效。因此套袋实验的结果表明,宁夏枸杞广泛存在着单花体系内的生育隔离,就现有的结果而言,将宁夏枸杞的繁育系统类型确

表 4 各参试材料套袋实验结实率统计 (%)
Table 4 The test results of emasculation of *Lycium barbarum*

	处理 1 Treatment 1		处理 2 Treatment 2		处理 3 Treatment 3		处理 4 Treatment 4		处理 5 Treatment 5		处理 6 Treatment 6	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
宁杞 1 号 Ninqi 1	83.3	83.3	23.3	20.0	90.0	86.7	93.3	93.3	70.0	80.0	0	0
宁杞 2 号 Ninqi 2	80.0	83.3	0	0	20.0	20.0	90.0	93.3	86.7	83.3	0	0
宁杞 3 号 Ninqi 3	30.0	43.3	0	0	0	0	93.3	100	33.3	33.3	0	0
白花 Baihua	30.0	26.7	0	0	0	0	93.3	86.7	73.3	70.0	0	0
大麻叶 Damaye	13.3	43.3	6.7	0	16.7	46.7	26.7	20.0	23.3	23.3	0	0
白条 Baitiao	56.7	53.3	0	0	0	0	86.7	90.0	63.3	33.3	0	0
尖头圆果 Jiantouyuanguo	76.7	83.3	0	0	0	0	90.0	93.3	40.0	83.3	0	0
圆头圆果 Yuantouyuanguo	56.7	93.3	0	0	0	0	90.0	93.3	43.3	86.7	0	0
小麻叶 Xiaomaye	73.3	86.7	3.3	30.0	13.3	70.0	96.7	100	56.7	90.0	0	0
蒙杞 1 号 Mengqi 1	—	—	—	0	—	0	—	93.3	—	—	0	0
扁果 Bianguo	—	—	0	0	0	3.3	90.0	90.0	—	—	0	0
07-01	—	—	—	0	—	0	—	96.7	—	—	0	0
06-16	—	—	—	0	—	6.7	—	86.7	—	—	0	0

注：处理 1：不去雄不套袋，自由传粉；处理 2：不去雄，开花前套袋处理；处理 3：去雄，套袋，人工同株异花授粉；处理 4：去雄，套袋，人工异品系异花授粉；处理 5：去雄不套袋，自由传粉；处理 6：去雄，套袋。处理 4 所使用的父本材料是宁杞 1 号，宁杞 1 号的为白花。A：一年生枝；B：当年生枝。
Note: Treatment 1: Unmasculatio, unbagged, free pollination; Treatment 2: Unmasculatio, Bagged before; Treatment 3: Emasculation, Bagged, hand geitonogamy; Treatment 4: Emasculation, Bagged, Different strains of artificial handCross-pollination; Treatment 5: Emasculation, unbagged, free pollination; Treatment 6: Emasculation, Bagged. The male parent materials in treatment 4 were used of Ninqi 1, Ninqi 1 for Baihua. A: annual branch; B: current grown branch.

定为专性异交较为适宜。

4 讨论

长期以来，植物繁育系统的多样性引起了许多生物学家的兴趣。对植物花的结构和繁育系统的了解是认识植物生活史的前提，也是其他相关研究所必需依赖的基本背景知识。许多情况下，花的性别系统与两性花模式有所不同，从而表现出各式各样的繁育系统类型(刘林德等,2002)。

花粉—胚珠比和杂交指数作为植物繁育系统的指示参数曾受到怀疑，但在两性植物繁育系统研究中，仍被许多研究者使用(刘林德等,2002;肖宜安等,2004)。本文也使用这两个参数对宁夏枸杞的繁育系统进行检测。对于杂交指数而言，花冠直径这一指标作为一个参数使用大多没有分歧。被子植物中与繁育系统密切相关的一个重要因素是雌雄性功能表达在时间上的差异，即雌雄异熟(dichogamy)(Bertin,1993;奇文清等,1998)。花药散粉与柱头可授期时间间隔和柱头与花药空间间隔分别从时空上反映了雌雄配子间的生育隔离，但时空上的生育隔离形式对长花期的植物而言不是十分有效，远不如自交不亲和或部分自交不亲和来的彻底。对于花器较大且适宜于去雄操作的植物而言，通过检测其

同株自花交的坐果率应该更有说服力。两种方法与套袋实验结果基本一致，说明花粉—胚珠比和杂交指数可以简便检测显花植物的繁育系统，这也与刘林德等(2002)、肖宜安等(2004)的研究结果相一致。

从套袋实验结果来看，宁夏枸杞的繁育类型大的范围上应属于专性异交，麻叶系属于特例，不去雄花前整花套袋，宁杞 1 号、大麻叶、小麻叶这些麻叶系的品中都有一定的坐果率，但显著低于人工同株异花，由此可说明，在人工栽培过程中，枸杞的自交亲和水平正在由自交不亲和向“部分自交亲和”演变，麻叶系应该是宁夏枸杞家系中的一种“部分自交亲和(同株异花交坐果率显著优于同株自花交)”的突变，其自交亲和水平自大麻叶开始在不断的提高。我们可以推断，正是在自交亲和水平上的这一变化，使麻叶系的品系能在生产应用的过程中确保产量，单品系大面积推广，而宁杞 1 号则是这一特征的突出表现。高的自交亲和水平是枸杞新品种能否在生产上大面积单一品种种植的关键，自交不亲和是诸多品系落花落果的主要原因。

参考文献：

方炎明,樊汝汶. 1996. 植物生殖生态学[M]. 济南:山东大学出版社,1—56,120—123
枸杞研究编写组. 1981. 枸杞研究[M]//路安民. 中国枸杞属的分类研究,银川:宁夏人民出版社,10—20