

肇东苜蓿与三种国外引进苜蓿品种间杂交的初步研究

刘凤歧¹,张月学¹,唐凤兰¹,陈晶²,韩微波¹,刘杰淋¹,尚晨¹

(1. 黑龙江省农业科学院草业研究所,黑龙江哈尔滨 150086;2. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院,黑龙江哈尔滨 150025)

摘要:黑龙江属高纬高寒地区,培育高产、抗寒、适应性强的品种成为紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)育种的首要目标,采用常规杂交方法对抗寒性、适应性强的地方品种肇东苜蓿(*Medicago sativa* L. cv. Zhaodong)和国外引进的3种高产苜蓿:美国苜蓿 WL323、保加利亚苜蓿 Pleven6、俄罗斯苜蓿 Beza87 分别进行正反品种间杂交,利用离体萌发法对杂交亲本的花粉活性进行检测,以及杂交结荚率等数据进行统计分析。结果表明:父、母本对结荚率影响显著,不同杂交组合结荚率差异极显著,肇东苜蓿与 WL323 正反交的结荚率高于其它杂交组合,为苜蓿杂交育种亲本选配奠定基础,同时为苜蓿杂交新品种的选育提供了基础材料。

关键词:肇东苜蓿;WL323;Pleven6;Beza87;种间杂交;结荚率;育种

中图分类号:S541.101

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)02-0093-04

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)是世界上分布范围最广的豆科牧草,也是我国种植面积最大的人工牧草^[1]。黑龙江省地处高寒地区,种植紫花苜蓿既要考虑当年的产草量,又要兼顾苜蓿品种能否安全越冬,因此在选育品种和引种驯化过程中,品种的抗寒性是考虑的重要因素之一^[2],苜蓿生产中低温越冬问题是制约苜蓿生长和利用的关键^[3]。国外苜蓿种植的主要国家有选择地培育苜蓿品种的工作始于20世纪初期,育种的主要目标是提高品种的耐寒性^[4]。杂种优势育种是作物育种中富有成效的一种方法^[5],我国已通过审定登记的苜蓿育成品种中,通过杂交育种方法育成的新品种共7个,占育成新品种数的30.43%,它们获得了双亲的优良性状,比原亲本具有更高的增产潜力及更好的越冬性能。杂交育种在苜蓿育种中将发挥越来越重要的作用^[4]。目前肇东苜蓿(*Medicago sativa* L. cv. Zhaodong)越冬性好,但是产量低,在黑龙江地区引进的国外品种丰产性好,但是稳定性弱、越冬性差,一般超过3a就死掉90%,因此为了获得抗寒、高产、稳定的苜蓿新品种,利用在黑龙江地区越冬性较好的地方品种肇东苜蓿和国外引进的3种高产苜蓿:美国苜

蓿 WL323、保加利亚苜蓿 Pleven6、俄罗斯苜蓿 Beza87 分别进行正反种间杂交,对杂交亲本的花粉活性进行检测及杂交结荚率等数据进行统计分析,为苜蓿杂交育种亲本选配提供理论支撑,同时为获得杂交苜蓿新种质奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 试验地概况

试验在黑龙江省农业科学院草业研究所试验地进行,地处 N45.2°,E122.6°;海拔 169 m,最高气温 38℃,最低气温 -30℃,无霜期 139 d 左右,年平均风速 3.3 m·s⁻¹,年平均降水量 569.1 mm,属中温带大陆性季风气候,年平均日照时数 2 670 h,年总辐射量 111.55 kcal·cm⁻²,≥10℃年活动积温 2 887℃,土壤为黑土。

1.2 供试品种及杂交组合

杂交亲本为黑龙江地方品种肇东苜蓿、美国苜蓿 WL323、保加利亚苜蓿 Pleven6、俄罗斯苜蓿 Beza87,现均保存于黑龙江省农业科学院草业研究所种质资源库,分别以肇东苜蓿为亲本与其它3个国外苜蓿进行正反交,共6个杂交组合。

1.3 试验时间及方法

1.3.1 杂交 2007年将试验品种定植于黑龙江省农业科学院试验地,2009年6月22日~7月10日在供试的苜蓿试验田盛花期,对单花发育的第三期花蕾^[6]进行人工去雄、套袋隔离,第二天10:00~14:00采取新鲜的苜蓿花粉进行人工授粉、套袋、挂标签,并写明父母本、去雄日期和杂交日期等信息,每个杂交组合做100朵小花,3次重复,8月份统计各组合结荚率情况。

收稿日期:2011-11-22

基金项目:农业科技成果转化资金资助项目(2011GB2B200005)

第一作者简介:刘凤歧(1982-),男,黑龙江省克山县人,硕士,助理研究员,从事牧草遗传育种研究。E-mail:l.fq2003@163.com。

通讯作者:张月学(1953-),女,黑龙江省巴彦县人,研究员,从事牧草种质资源和育种研究。

1.3.2 苜蓿花粉活性检测 在同一亲本上选择10朵花,利用离体萌发法^[7]对亲本的成熟花粉进行花粉活性检测,每朵花统计100个花粉粒,共统计1000个花粉粒看其花粉萌发情况。

1.4 统计方法与数据分析

采用 Excel 进行分组统计,用 SAS 8.0 进行方差分析和 Duncan 多重比较法分析数据。

变异系数 $CV = \sigma/\mu$ (σ 表示标准差, μ 表示总体平均数)。

2 结果与分析

2.1 花粉活性检测结果

利用离体萌发法对不同组合的父本花粉活性进行(见表1)。

由表1可以看出,肇东苜蓿为父本的花粉粒萌发率均高于其它3个品种作父本时的花粉粒萌发率,且干瘪率的变异系数较大,说明干瘪率在不同品种间存在差异。肇东苜蓿为父本与 Plev6 杂交和与另外两个品种杂交相比花粉粒萌发率差异显著,其中与 Beza87 杂交花粉粒萌发率差异极显著;Plev6、WL323、Beza87 为父本与肇东苜蓿杂交,花粉粒萌发率差异不显著。

2.2 结荚率及每荚种子数的变异程度

所有组合均获得杂交种子,由表2可以看出,不同组合结荚率由高到低为 $1 > 5 > 2 > 3 > 6 > 4$, 平均结荚率为 32.6%。肇东苜蓿与 WL323 的正反交结荚率均高于其它杂交组合,说明肇东苜蓿与 WL323 亲和性较好。不同组合间结荚率及每荚种子数变异系数较大,说明结荚率和每荚种子数在不同组合间是存在差异的;肇东苜蓿与其它3种国外苜蓿杂交,正交结荚率均大于反交结荚率,这与花粉活性鉴定的结果正好相反,因此需

表1 不同父本苜蓿品种的花粉生活力测定

Table 1 Vitality determination of pollen of different alfalfa male parents

父本 Male parent	母本 Female parent	干瘪率/% Shrivelling rate	萌发率/% Germination rate
4. 肇东 Zhaodong	Plev6	15.80	65.38aA
2. 肇东 Zhaodong	WL323	25.15	55.37bAB
6. 肇东 Zhaodong	Beza87	13.94	52.73bBC
3. Plev6	肇东 Zhaodong	35.41	49.06bcBC
1. WL323	肇东 Zhaodong	49.20	43.21cC
5. Beza87	肇东 Zhaodong	40.11	42.67cC
平均 Average		29.94	51.4
变异系数/% Coefficient of variance		46.84	16.55

注:不同大写和小写字母分别表示 0.01 水平和 0.05 水平显著性。下同。

Note: Different capital and lowercase letters mean significant differences at 0.01 and 0.05 levels, respectively. The same below.

要对花粉萌发率、结荚率和每荚种子数做方差分析,观察不同组合的差异显著性,以及父母本对杂交组合结荚率的影响。

2.3 父本对结荚率及每荚种子数的影响

通过不同父本与同一母本(肇东苜蓿)的杂交表现研究了父本效应。由表3可以看出,3个父本的花粉活性差异极显著,父本对杂交结荚率影响显著,对杂交组合每荚种子数的影响不显著。

2.4 母本对结荚率及每荚种子数的影响

通过不同母本与同一父本(肇东苜蓿)的杂交表现研究了母本效应。由表4可以看出,同一父本的花粉活性差异不显著,3个母本对杂交结荚率影响显著,对杂交组合每荚种子数的影响极显著。

表2 6个苜蓿杂交组合结荚统计

Table 2 The statistics of pod bearing rate of six cross combinations of alfalfa

杂交组合(♀×♂) Hybridized combinations	授粉花数 Number of pollination flower	结荚数 Inflorescences	结荚率/% Pod bearing rate	每荚种子数 Number of seeds per pod
1. 肇东苜蓿×WL323 Zhaodong×WL323	100	46	51.7	4.98
2. WL323×肇东苜蓿 WL323×Zhaodong	100	42	38.7	3.00
3. 肇东苜蓿×Plev6 Zhaodong×Plev6	100	35	27.0	3.26
4. Plev6×肇东苜蓿 Plev6×Zhaodong	100	20	16.3	2.63
5. 肇东苜蓿×Beza87 Zhaodong×Beza87	100	34	42.0	2.83
6. Beza87×肇东苜蓿 Beza87×Zhaodong	100	13	19.7	3.58
平均 Average	100	31.67	32.6	3.38
变异系数/% Coefficient of variance			42.41	25.19

表 3 父本对杂交结荚率和每荚种子数的影响

Table 3 The effect of male parent on cross combinations' pod bearing rate and the number of seeds per pod

项目 Item	平均 Average	变化范围 Variation range	变异系数/% Coefficient of variance	均方 Mean squared	F 值 F value	P 值 P value
花粉活性 Vitality of pollen	44.98	42.67~49.06	7.88	8.37	13.07	0.0065
结荚率/% Pod bearing rate	40.22	27~51.7	30.47	133.5062	10.12	0.0119
每荚种子数 Number of seeds per pod	3.69	2.83~4.98	33.92	1.39	4.89	0.0550

表 4 不同母本对杂交结荚率、每荚种子数的影响

Table 4 The effect of different female parents on cross combinations' pod bearing rate and the number of seeds per pod

项目 Item	平均 Average	变化范围 Variation range	变异系数/% Coefficient of variance	均方 Mean squared	F 值 F value	P 值 P value
花粉活性 Vitality of pollen	57.83	52.73~65.38	11.54	29.69	3.91	0.0819
结荚率/% Pod bearing rate	24.90	16.30~38.70	48.48	97.15	9.07	0.0153
每荚种子数 Number of seeds per pod	3.07	2.63~3.58	15.60	0.15	20.47	0.0021

2.5 不同杂交组合方差分析

通过表 2 中杂交结果的数据,对结荚率进行方差分析,结果表明各杂交组合间结荚率差异极显著,所以需进一步比较各处理组合的平均数。在此用新复极差测验(Duncan)对杂交组合间结荚率的平均数进行多重比较(见表 5)。

表 5 各处理组合结荚率平均数的新复极差测验

Table 5 Duncan test of the average of pod bearing rate of each treatment combination

处理 Treatment	平均数 Average	5%显著水平 5% significance level	1%显著水平 1% significance level
1	51.667	a	A
5	42.000	ab	AB
2	38.667	bc	AB
3	27.000	cd	BC
6	19.667	d	C
4	16.333	d	C

从表 5 中可以看出,肇东苜蓿与 WL323 的正反交结荚数差异显著,与 Plev6 的正反交结荚数差异不显著,与 Beza87 的正反交结荚数差异极显著。Plev6 作父本与以 Beza87 为父本杂交的结荚数之间差异显著,与以 WL323 为父本杂交的结荚数差异极显著,而以 WL323、Beza87 为父本结荚数之间差异不显著;以肇东苜蓿作父本与 WL323 为母本杂交与以 Beza87 和 Plev6 两个品种为母本杂交结荚数差异极显著,而以 Plev6、Beza87 为母本时结荚数差异不显著。

由此说明,不同品种间花粉活性差异极显著,父母本对杂交结荚率均有显著影响,而杂交组合每荚种子数受母本影响较大,以肇东苜蓿为母本结荚率均高于反交结果,而花粉活性鉴定结果表明肇东苜蓿花粉萌发率高于其它 3 个品种,因此推测杂交结荚率受母本影响较大。不同组合杂交结荚率差异显著,这可能与亲本之间的配合力和亲缘关系等有关,需要做进一步的研究。

3 结论与讨论

苜蓿是同源四倍体,其杂合程度很高,云锦凤认为苜蓿为常异交植物,其天然异交率在 25%~75%^[8],卢欣石等认为苜蓿品种内的遗传变异大于品种间的遗传变异^[9],李世雄等认为绝大多数苜蓿品种的种子产量及产量构成因素的品种内变异大于品种间变异^[10]。该研究中,花粉粒活性检测结果表明,品种内的花粉粒活性差异大于品种间的差异,与前人研究结果相符。

在自然条件下,不同品种苜蓿的花粉活力和数量变化范围较大,且同品种不同部位的花粉活力和数量变化范围较大^[11],该研究中不同苜蓿品种花粉生活力为 42.67%~65.38%,而姜华等在兰州地区测定不同品种苜蓿花粉生活力为 50.56%~80.76%^[12],高于该研究的苜蓿花粉生活力,除了品种原因外,同一品种在不同地区种植花粉生活力也不相同,该试验的 WL323 苜蓿花

粉生活力(萌发率)为43.21%,而姜华在兰州测定WL323的花粉生活力为58.4%^[12]。

苜蓿每荚种子数直接影响苜蓿种子产量,张文淑等调查,每个荚果中种子4~8粒,吴素琴、张自和在宁夏地区对紫花苜蓿 Baralfa 32 IQ 每荚种子数进行调查,荚内种子粒数范围在1~19粒,平均数为7.3^[13],而该试验的苜蓿杂交荚内种子粒数范围在1~5粒,平均数为3.38,低于吴素琴调查结果,表明杂交对荚内种子数量有影响。

该试验中各组合间结荚率的变化范围是16.3%~51.7%,通过分析表明,父母本对苜蓿杂交的结荚率均有显著影响,由此可知,父母本对杂交亲和性的影响都较大,在进行杂交育种时,不仅要注重对母本的选择,也要加强对父本的选择。

不同紫花苜蓿的杂交种在一定的情况下可表现出杂种优势^[14-15],Riday H 等认为不同基因型或不同种群的苜蓿杂交可表现出显著的特殊配合力效应^[16]。因此需要对杂交后代做进一步研究,探讨4个苜蓿品种的配合力和杂种优势问题。

参考文献:

- [1] 耿华珠,吴永敷,曹致中.中国苜蓿[M].北京:农业出版社,1995.
- [2] 尚晨,韩贵清,陈积山,等.高能混合粒子场处理种子对龙牧803苜蓿M₂代的抗寒性影响[J].草业学报,2009,18(6):164-168.
- [3] 张小英,卫智军,陈立波,等.四个紫花苜蓿品种对秋冬低温

- 条件的生理适应性[J].中国草地学报,2008,30(3):48-51.
- [4] 师尚礼,南丽丽,郭全恩.中国苜蓿育种取得的成就及展望[J].植物遗传资源学报,2010,11(1):46-51.
- [5] 赵桂琴.早熟禾的人工杂交及杂种优势预测研究[J].草业学报,2002,11(1):51-55.
- [6] 刘淑明.苜蓿的开花习性及其杂交技术的研究[J].中国草地,1996(2):7-10.
- [7] 陈晶,张月学,唐凤兰,等.紫花苜蓿花粉生活力测定方法研究[J].草地学报,2010,18(2):297-301.
- [8] 云锦凤.牧草及饲料作物育种学[M].北京:中国农业出版社,2004.
- [9] 卢欣石,何琪.中国苜蓿品种资源遗传多样性研究[J].中国草地,1997(6):1-6.
- [10] 李世雄,王彦荣,孙建华.中国苜蓿品种种子产量性状的遗传多样性[J].草业学报,2003,12(1):23-29.
- [11] 姜华,毕玉芬.紫花苜蓿花粉活力和柱头可授性的研究[J].草业科学,2009(9):105-107.
- [12] 姜华,毕玉芬.紫花苜蓿生殖生物学特性研究[J].草地学报,2008(2):110-114.
- [13] 吴素琴,张自和.紫花苜蓿植株群体花序花朵数及荚内种子数的数量特征分析[J].草业学报,2003,12(5):77-80.
- [14] Julier B, Huyghe C, Ecalle C. Within and among-cultivar genetic variation in alfalfa: forage quality, morphology and yield[J]. Crop Science, 2000, 40: 365-369.
- [15] Bolanos E A, Huyghe C, Djukic D, et al. Ecalle c. genetic control of alfalfa seed yield and its components[J]. Plant Breeding, 2001, 120(1): 67-72.
- [16] Riday H, Brummer C E. Persistence and yield stability of in-ter subspecific alfalfa hybrids[J]. Crop Science, 2006, 46(3): 1058-1063.

Preliminary Study on Intervarietal Hybridization of *Medicago sativa* L. cv. Zhaodong and Three Introduced Abroad Alfalfa

LIU Feng-qi¹, ZHANG Yue-xue¹, TANG Feng-lan¹, CHEN Jing², HAN Wei-bo¹, LIU Jie-lin¹, SHANG Chen¹

(1. Pratacultural Sciences Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Life Science and Technology College of Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

Abstract: Heilongjiang is a high-latitude alpine regions, so breeding high-yield, cold resistant and adaptable *Medicago sativa* L. varieties become the primary breeding goal. The reciprocal intervarietal hybridizations between local variety *Medicago sativa* L. cv. Zhaodong of cold hardiness and adaptability and three abroad varieties of alfalfa of high yield were undertaken using conventional hybridization methods. Three abroad varieties of alfalfa included WL323 introducing from the USA, Plevén6 introducing from Bulgarian and Beza87 introducing from Russian. Meantime, pollen activities were detected by the method of *in vitro* germination, and pod bearing rates were investigated and analyzed. The results showed that: there were significant differences in pod bearing rate among male and female parents, and extremely significant differences existed among cross combination. The highest pod bearing rate of reciprocal cross was between *Medicago sativa* L. cv. Zhaodong and WL323, which laid the foundation of parent selection in cross breeding of alfalfa and provided the basis material for breeding new varieties.

Key words: *Medicago sativa* L. cv. Zhaodong; WL323; Plevén6; Beza87; interspecific hybridization; pod bearing rate; breeding