



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114766353 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 22

(21) 申请号 202210498650.8

(22) 申请日 2022.05.09

(71) 申请人 辽宁省经济林研究所

地址 116031 辽宁省大连市甘井子区中华
西路31号

(72) 发明人 刘振盼 尤文忠 孙阳 卢立媛
宋建宇 陈喜忠 郑泽洋 郝家臣
刘广平 谢添伊

(74) 专利代理机构 北京博尔赫知识产权代理事
务所(普通合伙) 16045

专利代理师 王灿

(51) Int. Cl.

A01H 1/04 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

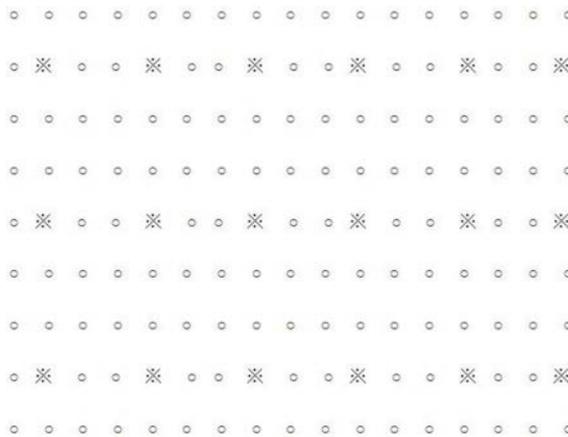
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种软枣猕猴桃园授粉雄株的快速筛选方法及应用

(57) 摘要

本发明提供了一种软枣猕猴桃园授粉雄株的快速筛选方法及其应用,涉及授粉树配置技术领域。本发明通过花期调查、花粉保存与活力测定、胼胝质荧光染色等方法分析软枣猕猴桃授粉树选择与配置对果实的影响,围绕软枣猕猴桃科学建园、促进产量和品质提升,为提高园地管理的效能,为实现软枣猕猴桃栽培的高效化、标准化栽培奠定基础。本发明提出了基于胼胝质荧光染色的授粉雄株快速筛选技术,有利于授粉树的科学合理配置。



1. 一种软枣猕猴桃园授粉雄株的筛选方法,其特征在于,包括以下筛选标准:花期调查、花粉活力测定和花粉亲和性检测。
2. 根据权利要求1所述筛选方法,其特征在于,所述花期调查,包括:筛选与结果树花期相遇的授粉树。
3. 根据权利要求1所述筛选方法,其特征在于,所述花粉活力测定包括测定鲜花粉的活力和测定保存花粉的活力。
4. 根据权利要求1所述筛选方法,其特征在于,所述花粉亲和性检测包括胼胝质荧光染色授粉雄株早期筛选和花粉在柱头的原位反应。
5. 根据权利要求1所述筛选方法,其特征在于,所述软枣猕猴桃园包括建园期的果园和/或园地改造时的果园。
6. 权利要求1~5任一项所述筛选方法在建园期或园地改造时雄株选择中的应用。
7. 权利要求1~5任一项所述筛选方法在建园期或园地改造时品种选择和配比中的应用。

一种软枣猕猴桃园授粉雄株的快速筛选方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于授粉树配置技术领域,具体涉及一种软枣猕猴桃园授粉雄株的快速筛选方法及其应用。

背景技术

[0002] 在软枣猕猴桃栽培研究实践中,对其进行配置授粉树,是获得优质高产的基本手段。目前在软枣猕猴桃配置授粉树时,具有较大的盲目性,常随意配置授粉树,没有系统科学的授粉树筛选方法。从形态上来看,猕猴桃属植物花类型为完全花,但绝大多数种类属于功能性雌雄异株,由于其特殊的遗传背景,后代常出现雄性多于雌性的现象,即使雌雄同株也存在花粉无活力和自(杂)交不结实的情况。因此,在种植时合理的配置授粉树,是保证果实产量和质量的一种主要手段。所以选择合适的授粉树并开展人工辅助授粉,是获得高产、优质的一种重要途径。

[0003] 目前在配置授粉品种时,常依据田间不同品种间授粉坐果率的高低来确定授粉品种。这种方法虽直观有效,但工作量大、周期长,使在选配品种时具有较大的盲目性。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种软枣猕猴桃园地授粉树的筛选方法及其应用,解决产业发展中授粉树运用不当的问题,实现对建园期或园地改造时雄株的科学筛选。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种软枣猕猴桃园授粉雄株的筛选方法,包括以下筛选标准:花期调查、花粉活力测定和花粉亲和性检测。

[0007] 优选的,所述花期调查,包括:筛选与结果树花期相遇的授粉树。

[0008] 优选的,所述花粉活力测定包括测定鲜花粉的活力和测定保存花粉的活力。

[0009] 优选的,所述花粉亲和性检测包括胼胝质荧光染色观察。

[0010] 优选的,所述花粉亲和性检测包括胼胝质荧光染色授粉雄株早期筛选和花粉在柱头的原位反应。

[0011] 优选的,所述果园包括建园期的果园和/或园地改造时的果园。

[0012] 本发明还提供了上述筛选方法在建园期或园地改造时雄株选择中的应用。

[0013] 本发明还提供了上述筛选方法在建园期或园地改造时品种选择和配比中的应用。

[0014] 有益效果:本发明为了克服授粉树配置上的不足,利用荧光显微镜技术对自花、异花授粉处理后的花柱进行压片,观察花粉管生长状况,判定不同品种的亲和性,可以为品种的建园和规模生产提供依据,因此提供了一种软枣猕猴桃园授粉树的筛选方法,通过花期调查、花粉保存与活力测定、胼胝质荧光染色、坐果率田间调查等方法分析软枣猕猴桃授粉树选择与配置对果实产量和品质的影响,围绕软枣猕猴桃科学建园、促进产量和品质提升,提出适合软枣猕猴桃优质丰产园品种鉴别与促结实授粉技术,为提高园地管理的效能,为实现软枣猕猴桃栽培的高效化、标准化栽培奠定基础。在本发明具体实施例中,利用荧光

显微镜技术对自花、异花授粉处理后的花柱进行压片,观察花粉管生长状况,判定不同品种的亲和性,以期为品种的建园和规模生产提供理论依据;并首次揭示自交授粉的亲和差异性,提出了基于胼胝质荧光染色的授粉雄株早期筛选技术,实现了授粉树的科学合理配置。

附图说明

- [0015] 图1为软枣猕猴桃雌雄株配置示意图,图中:○表示雌株;※表示雄株(或嫁接);
- [0016] 图2为本发明利用琼脂法,室温培养过夜测定软枣猕猴桃花粉活力;
- [0017] 图3为雌株花粉采集测定方法(左)和‘龙成2号’初花期花粉活力测定(右);
- [0018] 图4为自选雄株雄株授粉荧光检测(左)和自花授粉后荧光检测(右);
- [0019] 图5为不同倍性雄株花粉在‘龙成2号’柱头的原位荧光反应。

具体实施方式

[0020] 本发明提供了一种果园授粉树的筛选方法,包括以下筛选标准:花期调查、花粉活力测定和花粉亲和性检测。

[0021] 本发明所述花期调查,优选包括:筛选与结果树花期相遇的授粉树。本发明所述授粉树优选为5年以上树龄的露地栽植的软枣猕猴桃,并在雌花或雄花显露时开始统计,且进行统计时,优选随机选择10个健康的标准枝,于每天上午8:00-10:00观察开花进程。在本发明中,对于花期进行了划分,如初花期为5%-25%的花开放,盛花期为有25%以上的花开放,末花期为50%以上雄花序上花药凋落。而且,本发明所述果园优选为建园期的果园和/或园地改造时的果园,所述果园内的果树优选为软枣猕猴桃,由于软枣猕猴桃的植株通常为雌雄异株,雌花最佳受粉时期为开放后的2天;果实为呼吸跃变型,贮藏期短,尤其是早熟品种,因此,在选择授粉树时雌花盛花期均花期相遇,且尽可能选择花期长的作为授粉树。

[0022] 本发明所述花粉活力测定优选包括测定鲜花粉的活力和测定保存花粉的活力,所述活力优选包括花粉萌发率。在本发明中,以花粉萌发率作为花粉活力的标志,花粉萌发率高表示花粉活力高,花粉萌发率低表示花粉活力低。本发明对所述花粉萌发率的测定方法并没有特殊限定,优选参照胡适宜的琼脂法对软枣猕猴桃花粉活力进行测定,并以花粉的萌发率表征花粉的活力。本发明所述琼脂法所用的培养基,优选包括:硼酸(H_3BO_3) 0.1克,硝酸钙($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) 0.3克,硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.2克,硝酸钾(KNO_3) 0.1克,琼脂0.5%和蒸馏水100毫升。培养基制好后装于100毫升三角瓶中,以培养基刚好形成薄层为宜。待培养基凝固后,用牙签粘取少量花粉均匀弹播于培养基上萌发24小时。在显微镜下观察花粉萌发情况,测量花粉管长度,并统计花粉萌发率,以花粉管长度达花粉粒直径2倍以上作为萌发标准。每次观察3个~6个视野,观察花粉300粒左右,计算花粉萌发率。花粉萌发率=萌发的花粉总数/观察的花粉总数 $\times 100\%$ 。

[0023] 本发明所述保存花粉,优选包括花粉的采集和保存,所述采集优选包括采集开花前1天的雄花,用2层报纸包裹带回目的地,如实验室后去掉花瓣保留雄蕊放在阴凉处干燥1天;此时的雄花,花粉有较高活力,可充分满足育种需求;没有散粉损失,花粉收集量更大更充足;可以更容易降低被其他的花粉污染可能性。

[0024] 本发明所述保存优选包括低温保藏,低温处理有利于花粉的贮藏,温度越低,花粉活力下降越慢,贮藏时间越长;如在4℃条件下,花粉的生活力下降不太明显,保存30天后花

粉的生活力仍然在50%以上,120天后花粉活力消失;在-20℃保存条件下,随着贮藏时间延长,花粉的生活力缓慢下降,120天后花粉的生活力仍然在50%以上,300天后花粉基本失去活力。

[0025] 本发明所述花粉亲和性检测包括胼胝质荧光染色观察和座果率田间调查,更有选包括胼胝质荧光染色授粉雄株早期筛选和花粉在柱头的原位反应,且所述花粉亲和性检测优选包括对花粉的自交亲和性和杂交亲和性进行检测。本发明所述胼胝质荧光染色观察,优选包括在荧光显微镜观察经FAA固定的材料时,花粉管呈绿色,如在实施例4个自选授粉雄株亲和授粉的柱头上大量花粉粒已萌发,作用位点花粉管顺利通过乳突细胞,伸入柱头和花柱;而自交不亲和情况下,花粉会在柱头形成胼胝质,但不能形成花粉管。本发明优选还通过流式细胞术,选择和鉴定二倍体、四倍体、六倍体资源用授粉亲和性验证,经测定如上四种资源雄株花粉活力均超过50%,可用于后续亲和性和坐果率研究。虽然雄株倍性有差异,但坐果均良好均可作为软枣猕猴桃的授粉雄株。经荧光检测,验证了其花粉可在柱头萌发并形成花粉管。本发明利用荧光显微镜技术对自花、异花授粉处理后的花柱进行压片,观察花粉管生长状况,判定不同品种的亲和性,以期为本品种的建园和规模生产提供依据。

[0026] 利用本发明所述筛选方法,可以在大规模栽植前对授粉树配置合理性进行检测,并通过人工授粉方式提升果实品质和产量,较大提高园地管理的作业效率,为实现软枣猕猴桃栽培的高效化、标准化栽培奠定基础。

[0027] 本发明还提供了上述筛选方法在建园期或园地改造时雄株选择中的应用。

[0028] 本发明所述应用优选与上述相同,在此不再赘述。

[0029] 本发明还提供了上述筛选方法在建园期或园地改造时品种选择和配比中的应用。

[0030] 本发明所述应用优选与上述相同,在此不再赘述。

[0031] 下面结合实施例对本发明提供的一种软枣猕猴桃园地授粉树的筛选方法及其应用进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0032] 实施例1

[0033] 1、花期调查

[0034] 方法:选5年以上树龄的露地栽植的软枣猕猴桃进行观察。雌花或雄花显露时开始统计,随机选择10个健康的标准枝,于每天上午8:00-10:00观察开花进程。初花期为5%-25%的花开放,盛花期为有25%以上的花开放,末花期为50%以上雄花序上花药调落。

[0035] 结果:软枣猕猴桃花芽是混合芽,秋季进行生理分化,次年春季萌芽后进行形态分化。植株通常为雌雄异株,雌花最佳受粉时期为开放后的2天。果实为呼吸跃变型,贮藏期短,尤其是早熟品种。因此,在选择授粉树时雌花盛花期均花期相遇,且尽可能选择花期长的作为授粉树。

[0036] 基于上述研究基础,调查表1中所示的16个国内外软枣猕猴桃资源在大连地区的物候期,结果见表1。从中可以看出,不同品种花期存在一定差异,雌株花期在7天~18天不等,雄株花期7天~10天。雄株花期在实际栽培中不能全覆盖所有品种花期。

[0037] 表1大连地区设施栽培条件下不同软枣猕猴桃资源花期调查(2020年)

[0038]

品种	展叶期	新梢生长期	现蕾期	始花期	盛花期	花终期	花期(天)
桓优1号	4月19	4月28	5月6	5月25	5月27	6月3	10(雌)
龙成2号	4月19	4月28	5月6	5月27	5月29	6月3	8(雌)
韦迪	4月21	4月28	5月6	5月30	6月3	6月8	10(雌)
伊赛	4月28	5月1	5月6	5月30	6月3	6月8	10(雌)
巨人	4月19	4月28	5月6	5月27	5月29	6月3	7(雌)
罗高	4月19	4月28	5月6	5月25	5月27	6月5	12(雌)
红哈迪	4月21	5月1	5月6	5月27	5月29	6月5	10(雌)
赤焰	4月21	4月28	5月10	5月22	5月27	6月8	18(雌)

[0039]

紫色萨瓦多	4月19	4月28	5月6	5月22	5月27	6月3	13(雌)
红九月	4月19	4月28	5月6	5月22	5月27	6月3	13(雌)
库库瓦	4月19	4月28	5月6	5月27	6月3	6月5	10(雌)
日内瓦	4月21	5月1	5月6	5月25	5月29	6月5	11(雌)
安娜	4月19	4月28	5月6	5月25	5月29	6月5	11(雌)
丹东授粉树	4月19	4月28	5月6	-	5月27	6月3	8(雄)
维基	4月21	4月28	5月6	-	5月27	6月5	10(雄)
河南公树	4月21	4月28	5月6	-	5月27	6月5	10(雄)

[0040] 2、花粉活力测定方法的选择

[0041] 采用琼脂法培养花粉过夜后实现花粉活力快速测定,结果见图2。

[0042] 3、自花不结实(或结实)现象

[0043] 通过套袋隔离处理的方式,开展3个品种的自花授粉结实率调查,结果见表2,虽然软枣猕猴桃部分资源存在自花结实现象,但在生产中采用不配置授粉树的措施会对产量产生巨大损失,尤其在设施栽培条件下,更需针对不同品种配置合适的授粉树。

[0044] 表2自花授粉结实率调查(2021年)

[0045]

	自花授粉结实率(%)	调查区域	调查时间
龙成2号	0.0	丹东	6.8-9.10
安娜	0.0	大连	5.30-9.1
库库瓦	52.0	大连	6.5-9.5

[0046] 为此,采集‘龙成2号’初花期花,去除花瓣,将其按图3的方式放置到琼脂培养基上

过夜,次日测定花粉活力后发现‘龙成2号’花粉具有活力,说明软枣猕猴桃存在自交亲和性存在差异。

[0047] 4、花粉的采集和保存技术研究

[0048] (1) 花粉的采集

[0049] 试材为软枣猕猴桃雄株,样品于2016年6月上旬采集于丹东市宽甸县。分别采集开花前1天、大蕾期和开花后1天的雄花,用2层报纸包裹带回实验室去掉花瓣保留雄蕊放在阴凉处干燥1天。收集不同花粉试材放入不同离心管内并标记,锡箔纸包裹备用。

[0050] 由表3可以看出,开花前1天、大蕾期和开花后1天采集的花粉萌发率分别为84.2%、87.4%、75.2%。可见,大蕾期及其开花前后各1天花粉的活力都在较高的萌发能力,均可作为授粉材料。但结合育种实践过程,雄花开花前1天将雄花收集后隔离取花粉更有优势:一是花粉活力有较高活力,可充分满足育种需求;二是此时期收集花粉没有散粉损失,花粉收集量更大更充足;三是可以更容易降低被其他的花粉污染可能性。

[0051] 表3不同采粉期的软枣猕猴桃花粉萌发率

[0052]

采粉期	花粉萌发率(%)
开花前1天	85.2
大蕾期	87.4
开花后1天	75.2

[0053] (2) 花粉的保存

[0054] 由表4可以看出,随着室温保存时间的延长,花粉的萌发率迅速下降,10天后,花粉萌发率降低到10%以下,12天花粉活力消失。因此,室温长期保存花粉的效果较差。但若进行短时间(4天以内)贮藏,花粉活力仍能保持在50%以上,花粉仍可用于杂交授粉。在4℃条件下,花粉的生活力下降不太明显,保存30天后花粉的生活力仍然在50%以上,120天后花粉活力消失。在-20℃保存条件下,随着贮藏时间延长,花粉的生活力缓慢下降,120天后花粉的生活力仍然在50%以上,300天后花粉基本失去活力。可见,低温处理有利于花粉的贮藏,温度越低,花粉活力下降越慢,贮藏时间越长。

[0055] 表4不同贮藏温度下的软枣猕猴桃花粉萌发率

[0056]

贮藏 时间	萌发率(%)			贮藏时 间	萌发率(%)		
	常温	4℃	-20℃		常温	4℃	-20℃

[0057]	2 天	76.4	83.3	85.0	90 天	0.0	20.1	62.1
	4 天	54.3	77.6	84.4	120 天	0.0	0.0	53.5
	6 天	37.5	74.1	82.8	150 天	0.0	0.0	46.1
	8 天	13.5	70.7	82.3	180 天	0.0	0.0	41.4
	10 天	5.2	66.2	82.0	210 天	0.0	0.0	35.3
	12 天	0.0	61.5	79.3	240 天	0.0	0.0	22.7
	30 天	0.0	53.9	75.3	270 天	0.0	0.0	13.1
	60 天	0.0	37.7	63.3	300 天	0.0	0.0	2.3

[0058] 通过更低的保存温度-80℃保存1年后进行测定,结果见表5,发现花粉仍保持较高活力,这为后续后续花粉保存提供了可靠的技术支撑。

[0059] 表5 -80℃保存1年后花粉活力测定

[0060]	资源	2020.6花粉活力(%)	2021.6花粉活力(%)	采集地
	1号花粉	89.2	68.7	大连
	2号花粉	96.4	72.3	丹东
	市售花粉	93.6	63.5	鞍山

[0061] 5、花粉亲和性检测技术研究

[0062] (1) 选用4个授粉树的花粉离体培养24小时,均表现了较强活力,结果见表6。这说明采集新鲜花粉完全可以满足花期授粉的要求。

[0063] 表6自选雄株花粉活力检测

[0064]	品种	1 号	2 号	3 号	4 号
[0065]	活力 (%)	96.3	97.0	92.5	95.3
	是否合格	合格	合格	合格	合格

[0066] 荧光显微镜观察经FAA固定的材料时,花粉管呈绿色。4个自选授粉雄株亲和授粉的柱头上大量花粉粒已萌发,作用位点花粉管顺利通过乳突细胞,伸入柱头和花柱(图4左);而自交不亲和情况下,花粉会在柱头形成胼胝质,但不能形成花粉管(图4右)。

[0067] (2) 不同倍性资源的授粉亲和性验证

[0068] 通过流式细胞术,选择和鉴定了二倍体、四倍体、六倍体资源用授粉亲和性验证,包括:维基、亚当、自选雄株、红阳雄株。从表7可以看出,虽然雄株倍性有差异,但坐果均良

好均可作为软枣猕猴桃的授粉雄株。经荧光检测,验证了其花粉可在柱头萌发并形成花粉管,结果见图5。

[0069] 表7不同倍性雄株授粉结实率调查(2018-2021年)

母本	父本	雌花数量	结实数	结实率(%)	可授性评价
[0070] 龙成2号(4n)	维基(4n)	50	47	94	可授
	亚当(2n)	50	47	94	可授
	自选雄株(6n)	50	49	98	可授
	红阳雄株(2n)	50	48	96	可授

[0071] 5、田间对比试验

[0072] 2021年在丹东市宽甸县碑沟村开展软枣猕猴桃人工授粉与自然授粉调查,结果见表8。表授粉处理选取不同部位的结果枝,在雌花开花前套袋隔离,授粉后统计每种组合的授粉花数。挂牌标记,待种子成熟后采收,计算结实率。结实率=(结实数/授粉花数)×100%。

[0073] 从表8统计结果看,‘龙成2号’自交表现为不亲和,这与荧光检测的结果是一致的,说明对于软枣猕猴桃来说,田间不配置授粉树会造成产量的大幅下降或绝收,但授粉树的选择应该有针对性,要尽量选择盛花期覆盖的授粉树作为授粉授粉品种。同时发现,2号、3号、4号花粉经人工授粉较自然授粉有了显著提升。

[0074] 表8软枣猕猴桃人工授粉与自然授粉调查(2021年)

母本	父本	雌花数量	结实数	结实率(%)	平均单果重(克)	可授性评价
[0075] 龙成2号	1号花粉	100	100	100	19.81	可授
	2号花粉	100	97	97	23.33	可授
	3号花粉	100	96	96	26.25	可授
	4号花粉	100	99	99	26.54	可授
	自然授粉	100	78	78	18.78	可授
	自花授粉	100	0	0	-	不可授

[0076] 7、田间配置

[0077] 配置的雄株一定要覆盖结果品种的花期。软枣猕猴桃的授粉方式以自然授粉为主,主要通过虫媒、风媒等方式完成授粉。雌雄株比例8:1。雄株标准:始花期早于或等于雌株,花期长,花粉量大。栽植时参照参见图1方式配置。

[0078] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

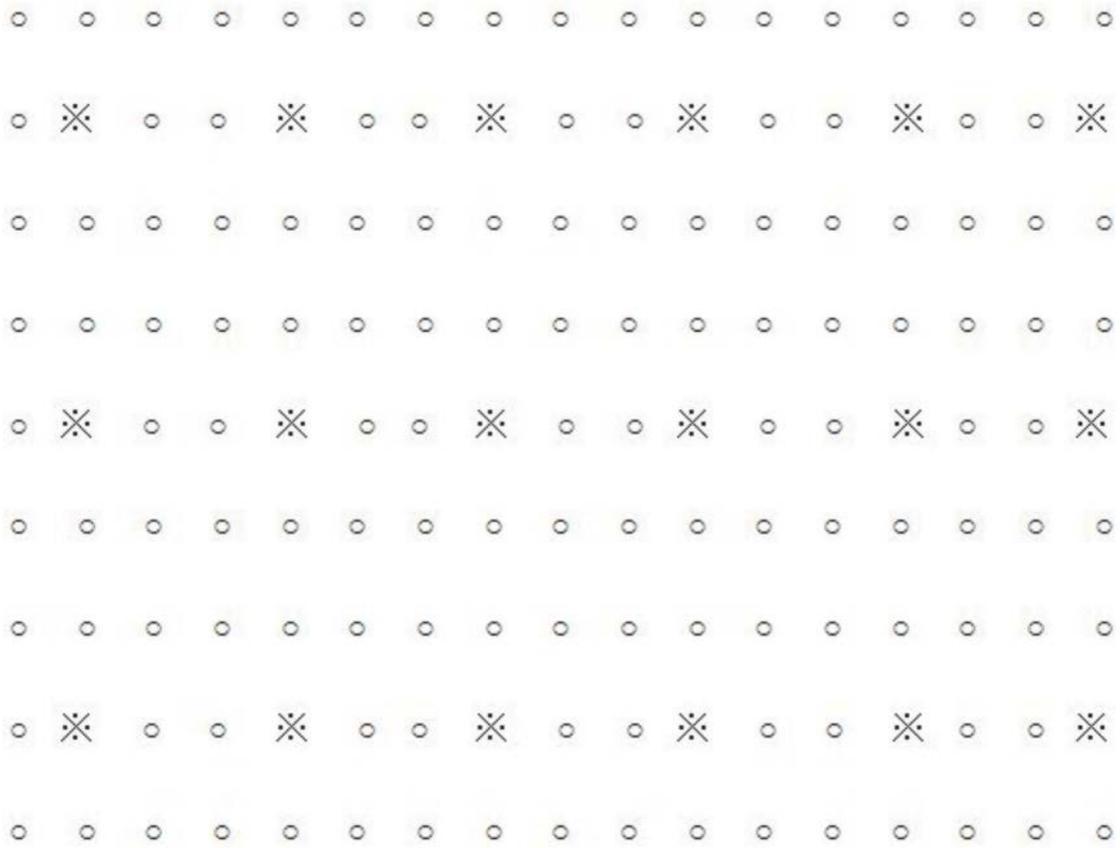


图1

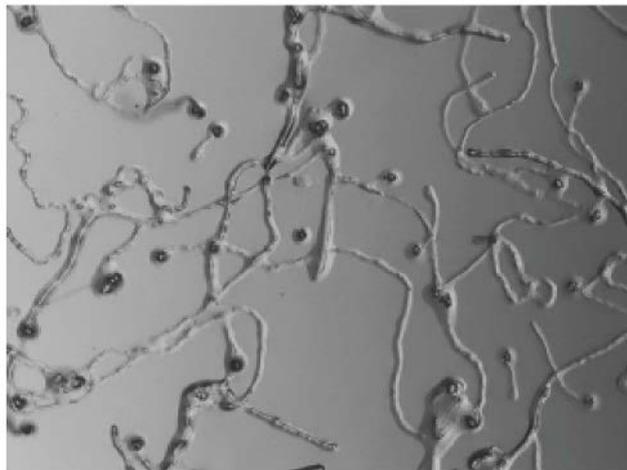


图2

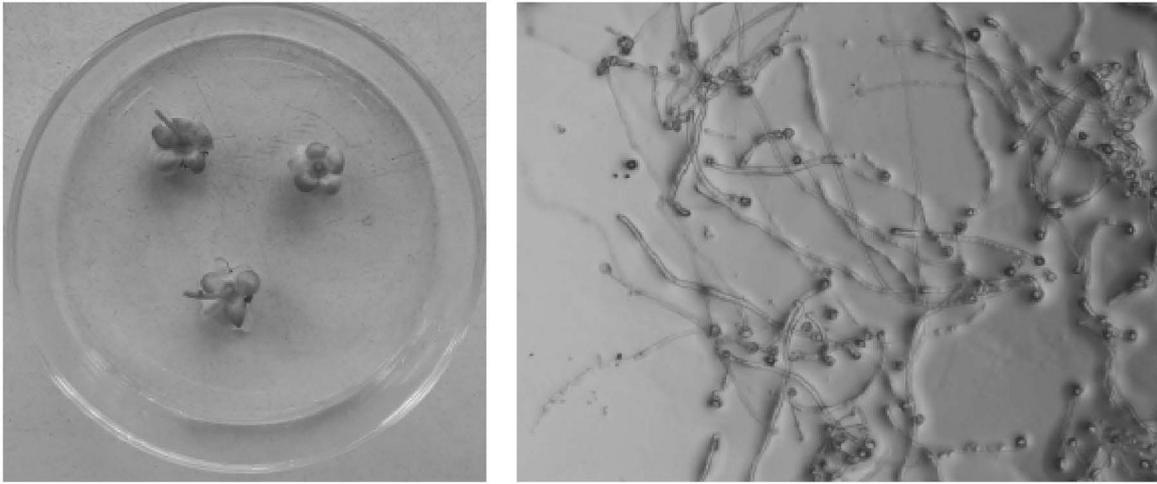


图3

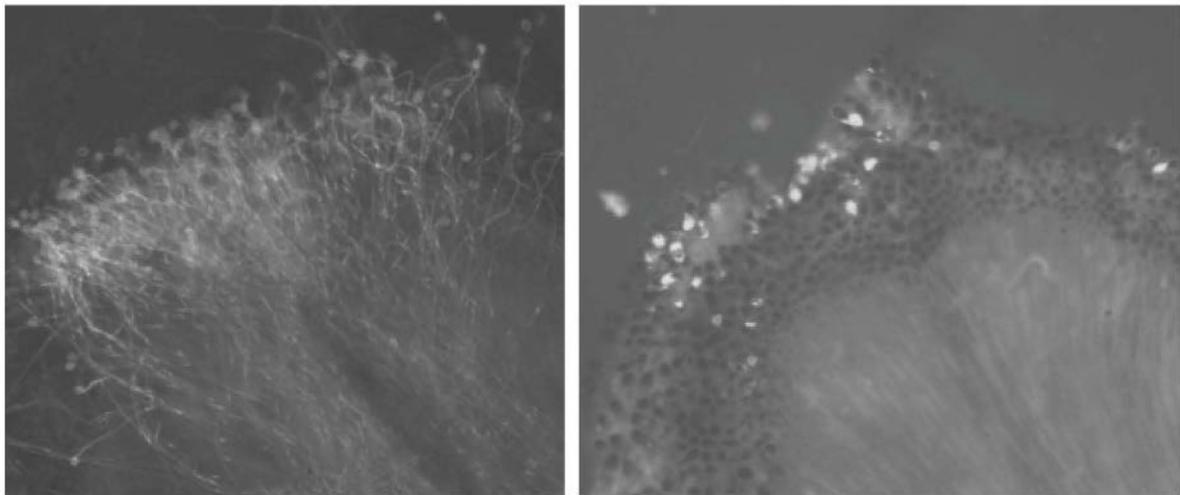
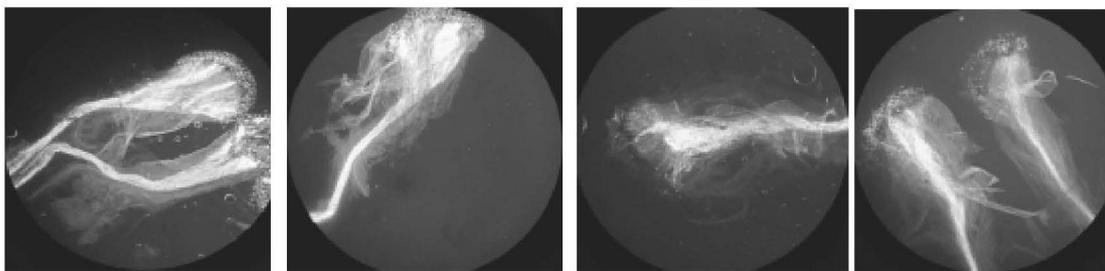


图4



维基

亚当

自选雄株

红阳雄株

图5