

园艺作物远缘杂交受精前生殖障碍及其克服方法

邓衍明,叶晓青

(江苏省农业生物学重点实验室 江苏省农业科学院 江苏 南京 210014)

摘要: 受精前障碍是影响园艺作物远缘杂交育种成功与否的首要因素。文章概述了远缘杂交在园艺作物育种领域的重要意义和最新进展;从亲本育性和杂交亲和性两个方面对受精前生殖障碍的类型、特征和机理进行了综述和分析;重点阐述了克服远缘杂交受精前障碍的方法,包括合理选择亲本、物理处理花粉和柱头、化学处理花粉和柱头、改良授粉方式、试管离体受精、体细胞融合和使用桥梁亲本等;最后对未来研究的重点和方向进行了展望。

关键词: 远缘杂交;生殖障碍;受精前障碍;植物育性;杂交亲和性

中图分类号: S603 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)增刊-0081-06

The Prefertilization Reproductive Barriers and Overcoming Methods of Horticultural Crops Distant Hybridization

DENG Yan-ming, YE Xiao-qing

(Jiangsu Key Laboratory of Agrobiolgy, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The prefertilization barrier was a decisive factor for successful distant hybridization in horticultural crops. The research progress and value of distant hybridization in the field of horticultural crop breeding in recent years was summarized chiefly. The types, characteristics and mechanisms of prefertilization barriers were reviewed and analyzed comprehensively, including parents' fertilities and crossing compatibility, with emphases on the effective methods to overcome the barriers. These methods include selecting suitable parents, treating the pollens and styles by physical or chemical methods, improving the ways of pollination, fertilization *in vitro* in the tube, somatic fusion and using bridge parents, etc. At last, the future research emphasis and aim in this field was suggested by the authors.

Key words: Distant hybridization; Reproductive barrier; Prefertilization barrier; Plant fertility; Cross compatibility

众所周知,园艺作物的育种方法很多,如自然芽变选种、物理或化学诱变、基因工程育种等,但杂交一直是应用最广泛和最有成效的方法。其中,相对于传统的品种间、亚种间等种内杂交(Intraspecific hybridization)而言的远缘杂交(Distant hybridization),更是在新品种选育方面发挥了重要作用。远缘杂交指种和种以上分类阶元物种之间的杂交,是实现基因远缘转移和种质创新的一条重要途径^[1-5]。在很多植物起源、演化过程中,天然远缘杂交为今日广泛变异导入了丰富的遗传物质^[6-9]。以菊花为例,现代栽培菊最有可能起源于野菊(*Chrysanthemum indicum*)和毛华菊(*C. vestitum*)的天然杂

交种^[10-11],但紫花野菊(*C. zawadskii*)、矶菊(*Ajania pacifica*)和 *C. weyrichii* 等也可能以天然杂交的方式参与了这一进化过程^[12-14]。

相对于天然杂交,人工远缘杂交在实现品种改良和新品种选育方面无疑更加有效和重要^[15]。多年来,远缘杂交在有选择地定向创造新种质和栽培类型、提高产量、品质和抗逆等性状,满足生产和生活需要方面发挥了重要作用^[2-5,16]。不仅如此,远缘杂交还可以打破天然存在于亲缘关系较远物种间的障碍或隔离,重新组合2个物种经过多年演化而积累起来的优良性状,形成新的类型或性状;这些新类型或新性状,可能是自然界不存在的,也可能是通

收稿日期: 2012-07-10

基金项目: 国家自然科学基金(31101569);江苏省自然科学基金(BK2011673);江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(11)4032)

作者简介: 邓衍明(1976-),男,安徽泗县人,副研究员,博士,主要从事观赏园艺作物生殖生物学特性与生物技术育种研究。

过种内杂交不能获得的^[16-19]。故远缘杂交在研究物种起源、演化、遗传、变异以及亲缘关系、分类地位等生物学基本问题方面,也具有十分重要的理论意义^[2,3,17-22]。但是,众多育种实践表明,由于亲缘关系较远物种间往往存在不同程度的时空隔离、不尽相同的遗传物质、不同源的遗传信息、不一致的生理反应、不协调的发育进程以及器官形态上的差异等,使得杂交在很多情况下都因生殖障碍(Reproductive barrier)而难以成功^[2-3,17,23-25]。其中,不能完成受精作用并发育形成合子的障碍即受精前生殖障碍(Prefertilization barrier),其往往是导致远缘杂交失败的首要因素,故本文将对其特征特性及产生机理进行论述和分析,并重点阐述其有效的克服方法,以期园艺作物育种工作提供参考。

1 受精前生殖障碍的特征特性及其机理

植物结实有赖于传粉(Pollination)与受精(Fertilization)过程中一系列事件的正常完成,从花粉粒的附着(Adhesion)、水合(Hydration)、花粉管的萌发(Germination)、生长到完成双受精(Double fertilization),再到合子、胚乳的发育及种子的成熟等,其中任何一环出现问题,都会导致远缘杂交失败^[23-25]。因此,产生远缘杂交生殖障碍的因素可能有:杂交亲本的育性(Fertility);亲本间的亲和性(Compatibility)或可交配性(Crossability);受精后胚乳组织与胚体组织发育进程中的协调性(Congruity)、胚乳在发育过程中能否正常细胞化(Cellularization)以及胚体是否败育(Abortion)或降解(Degeneration);是否出现不能发芽、正常生长、开花或结实等杂种崩溃现象(Hybrid breakdown)或难捻性(Sterility)等^[3,22-26]。一般依据能否完成正常的双受精作用并发育成杂合子,而将生殖障碍划分为合子前障碍(Pre-zygotic barrier,也称受精前障碍)和合子后障碍(Post-zygotic barrier,也称受精后障碍(Post-fertilization barrier)^[2-3,22-27]。其中,亲本育性和杂交亲和性共同形成了远缘杂交受精前生殖障碍的主要影响因素。

1.1 亲本育性

杂交亲本育性即生殖器官的发育状态是决定远缘杂交能否成功的前提条件。很多园艺植物在进化出较强无性繁殖能力的同时,有性繁殖能力严重退化。雌性不育即胚珠或雌蕊发育异常是很多植物结实率低甚至不结实的原因,如羊草(*Leymus chinensis*)的雌蕊在发育过程中出现多种异常现象,从而导致了极低的结实率^[28]。同时,雄性不育即雄蕊退

化或花粉活力低也使得很多植物无法正常结实,如太行菊(*Opisthopappus taihangensis*)的花粉不活导致结实率很低,甚至被认为是使其濒临灭绝的主要原因之一^[29]。此外,育性(尤其是柱头可授性和花粉活力)还受到温、湿度等外界环境因素的影响。研究表明,同一天内不同时间段采集的地被菊花粉生活力相差甚大,胡萝卜的花粉活力也随着温度的升高而显著下降^[30-31]。但也有研究认为花粉活力低虽对结实有一定影响,但不是影响结实的关键因素,如孙春青等^[32]报道,在栽培菊花与野路菊的种间杂交中,结实率低的根本原因是胚胎的败育。然而,在开展远缘杂交试验之前,对所选亲本的生殖特性进行研究,确保父、母本分别具有发育正常的雌、雄配子体,并选择亲本育性较高的发育阶段或特定时间进行授粉,对提高杂交成功率非常有益。对母本胚珠发育特性可应用石蜡连续切片法进行观察,对父本花粉活力可通过离体萌发进行检测,对柱头可授性可借助荧光显微镜进行观察比较^[2-5]。

1.2 杂交亲和性

对可育的双亲来说,不亲和或可交配性差往往是导致远缘杂交失败的重要原因。杂交不亲和主要体现在花粉与雌蕊的互作(Pollen-pistil interaction)上,依其具体表现可分为三种类型:第一类是花粉粒萌发受阻,即花粉在授到柱头后不萌发或只有极少一部分能萌发;第二类是花粉管生长异常,即花粉虽然在母本柱头上能够萌发,但花粉管在柱头表面盘绕、扭曲而不能正常进入柱头内部向子房生长;有时花粉管生长异常缓慢,在生长过程中变粗或末端发生膨大、分叉甚至破裂等异常现象;有时花粉管虽能插入柱头,但在花柱引导组织中生长停滞或降解,从而不能正常到达胚囊释放雄配子;第三类是不能正常完成双受精作用,即花粉管虽能进入胚囊并释放出精细胞,但它不能及时和卵细胞融合形成合子,从而出现延迟受精(Postponed fertilization)或受精失败(Fertilization failure)现象,又或者出现卵核和极核不能同时受精的单受精(Single fertilization)等异常现象^[3-4,24-27,33]。

对不亲和机理的研究发现,授粉后柱头会沉积胼胝质以对不亲和花粉表现特异性拒绝反应,且反应的强弱与不亲和性呈正相关^[8,33];有研究认为花粉管和花柱引导组织间存在不协调性,使花粉管得不到营养物质而生长异常^[3,34];也有研究表明亲和性与SOD、POD、CAT等保护酶活性有关,且激素含量(如ABA和GA₃)起到一定作用^[35-36]。近年来随着蛋白质组学(Proteomics)的日益发展,越来越多的蛋白质被发

现与不亲和有密切关系。有研究认为花粉外壁蛋白与柱头表面蛋白(即识别蛋白)未能正常识别而导致花粉与柱头不亲和^[29, 37-38];花粉胞被蛋白被认为在粘附机制中起主要作用,水孔蛋白调节了水合过程,而花粉管定向生长则受引导组织胞间质、向化性物质及粘附机制等多因素的影响^[39-41]。

2 受精前生殖障碍的克服方法

2.1 合理选择亲本

众多育种实践证明,远缘杂交时亲本材料的选择至关重要。即使是同属同种的不同栽培类型,在作母本与同一父本杂交时,都可能有很大的亲和力差异^[33]。远缘杂交时还经常出现正反交结实不同的现象。当自交亲和种与自交不亲和种杂交时,以自交亲和种作母本一般较易成功;当两个亲本的染色体数目差异较大时,以染色体数目较多一方作母本的亲和性往往好于以染色体数目较少的一方作母本^[18]。例如,自交不亲和的黑麦草(*Lolium perenne*)与自交亲和的苇状羊茅(*Festuca arundinacea*)之间的杂交,正交是不亲和的,反交则是亲和的^[41];在百日草属两个种杂交时,小百日草(*Zinnia angustifolia*)×百日草(*Z. elegans*)亲和,反交则不亲和^[42];在开展栽培菊花和玳菊的属间杂交时,发现正反交的结实率有很大的差异,玳菊作母本的结实率远大于栽培菊花作母本的结实率^[20]。类似结果在百合、茄子、烟草及多种果树的远缘杂交中也被报道^[43-45]。研究发现亲本染色体倍性与杂交亲和性密切相关,亲本染色体倍性越接近的杂交越容易成功,差异越大的生殖障碍越严重^[46-48]。因此,在植物远缘杂交育种时,一方面应当广泛选择倍性接近、配合力高的材料作亲本;另一方面当正交不亲和的时候,不妨尝试反交。

2.2 物理处理柱头和花粉

在授粉前使用一定的物理方法对柱头和花粉进行人工处理,如适当高温条件下培养、一定强度的电磁波辐射、 γ 射线、紫外线和激光的适度照射等,可以在一定程度上克服受精前障碍,提高受精率。高温处理源于多年前被发现的可以克服菊花的自交不亲和性^[48];后来, Van Tuyl 等^[8-9]在百合的远缘杂交中使用高温分别处理花柱和花粉,同样起到了一定的效果。热处理克服生殖障碍的机理可能是高温钝化了花粉与花柱的相互识别及抑制因子,从而提高了两者的亲和性。此外,研究发现,将花粉暴露在电磁场中对育性提高有正向效应,有助于克服远缘杂交不亲和性;用 γ 射线、激光和高压静电场处理

草莓花粉,被证明可以显著提高种间杂交效率,有效克服杂交的不育性;而低剂量的电离辐射和土壤通电可以提高核果类果树远缘杂交的花粉活力,可显著提高樱桃杂交后的坐果率^[45, 49]。

2.3 化学处理花粉和柱头

化学处理是指在柱头上涂抹或喷洒赤霉素、萘乙酸、硼酸或秋水仙素等化学物质的方法。这些化学物质可促进花粉管的伸长和生长,抑制花的衰老和脱落,从而提高受精结实率^[18]。Sankin 等^[50]在进行草莓育种时,发现通过秋水仙素处理花粉后再用于杂交,不仅能产生可育的杂交种,而且杂种具有较好的抗病性和耐寒性;Brown 等^[51]在梨和苹果杂交时,授粉后立即用萘乙酸处理花柱和子房基部,结果获得的杂交种子数显著提高,达到了正常结实的水平。在百合、郁金香、梅花上也有应用生长调节剂处理子房,克服远缘杂交生殖障碍的成功报道^[52-53]。也有研究者认为激素类物质可能不直接促进花粉管生长,而是靠吸引花柱中促进花粉管生长的物质来发挥作用^[54]。

2.4 改良授粉方式

对授粉方式进行改良,如切割柱头、混合授粉、蕾期授粉、重复授粉等,都对提高受精率有一定效果。针对有人认为无法完成受精作用是由于花粉管长度不够、无法到达胚囊释放配子而引起的现象,切割柱头(Cut style)技术,即通过切除柱头或短截花柱后直接给予房授粉的方式,可有效地将其避免^[8-9, 55-56]。切割柱头的作用还被认为可消除柱头及花柱对花粉萌发和花粉管生长的抑制作用,从而促进花粉萌发、提高受精率^[55-56]。切割柱头技术曾是克服百合远缘杂交受精前障碍的有效方法,早在20世纪60年代已被应用;此后,众多学者采用此方法获得了包括百合属(*Lilium*)、郁金香属(*Tulipa*)和尼润属(*Nerine*)植物在内的多个属间或种间远缘杂种^[8-9, 55-56]。此后,切割柱头技术不断进步,发展为柱头移植技术(Style transplantation),即将父本花粉授在亲和植物的柱头上,在花粉管萌发后尚未完全伸长前切下该柱头,连同萌发的花粉管一起移植到杂交母本花柱上的技术^[18]。该技术有力地促进了切割花柱授粉方式的应用。

克服果树远缘杂交不亲和性常用的一种方法是混合授粉(Mixed pollination),即把亲和与不亲和花粉混合后同时授到母本柱头上^[49]。在地被菊育种过程中,用混合授粉方法使原本不亲和的杂交组合变为了亲和^[57]。混合授粉时,亲和花粉被认为可有效降低柱头对不亲和花粉的识别和抑制反应,为不

亲和花粉的花粉管生长创造有利环境,从而克服远缘杂交的障碍^[18,49]。如果事前通过辐射等方法处理亲和花粉使其失活,然后与不亲和花粉混匀后同时授粉,则可将其称为蒙导花粉(Mentor pollen)。在苹果与西洋梨进行杂交时,通过蒙导授粉,结实率提高了约一倍^[58]。

远缘杂交时,如果把授粉提前在开花前进行,即蕾期授粉(Bud pollination),在百合等的远缘杂交上得到了很好的效果^[52,55-56]。蕾期授粉提高亲和性的机制尚不十分清楚,可能是由于未成熟雌蕊尤其是柱头上尚未合成抑制花粉管生长的物质或该物质尚不具备较高的抑制活性,从而无法有效地抑制花粉的萌发和花粉管的生长^[55-56,59]。

重复授粉(Repeated pollination),即使用父本花粉在母本同一柱头上进行多次授粉,也被证明是克服远缘杂交不亲和非常有益的方法之一^[18]。如桃和杏杂交时,重复授粉可以显著提高杂交亲和性^[59]。可能是由于不同时间内母本柱头的成熟度和生理状况存在差异,或者是由于在不同时间内进行重复授粉可使最有利于受精作用进行的条件增加,也可能是先前授粉消耗了柱头表面识别蛋白的缘故,总之,重复授粉可显著提高受精率,不失为克服远缘杂交受精前障碍的一种简单有效方法^[18]。

2.5 试管离体受精

利用试管进行人工离体受精(Pollination *in vitro*),即在无菌条件下对置于培养基上的雌蕊或裸露的胚珠及花粉粒分别进行培养,待花粉萌发后,使其在培养条件下完成受精作用,也是克服受精前障碍的有效方法之一^[56,60]。试管受精首先在克服十字花科植物远缘杂交不亲和方面取得了一定效果^[61]。随后,众多研究者应用离体受精和幼胚拯救相结合的方法,成功获得了百合、郁金香等多个球根花卉的远缘杂种,并将其广泛应用于克服罂粟科、石竹科、禾本科和茄科等植物的远缘杂交不亲和^[6-9,56,60]。在离体萌发条件下,花粉管直接进入胚珠,可有效地克服授粉时柱头和花柱的不利影响,因而受精几率大为提高。但相对于其他方法而言,离体受精的技术要求较高,实际操作难度较大。

2.6 体细胞融合

几乎所有的远缘杂交生殖障碍都源于有性生殖过程,如果可以绕过有性生殖过程使亲本基因得以结合,如进行体细胞融合(Somatic fusion),则可以有效克服远缘杂交时因性隔离而造成的不亲和,从而达到种质创新的目的。自 Ohgawara 等通过聚乙二醇(PEG)融合获得第一例柑桔体细胞杂种植株以

来,仅在果树上就通过 PEG 或电融合法获得了柑桔、柿子、梨亚科、李亚科、猕猴桃亚科等多种果树的种间、属间、亚族间、族间甚至亚科间的体细胞杂种或胞质杂种^[18]。日本学者 Furuta 等^[62]利用原生质体融合技术获得了栽培菊花与大籽蒿(*Artemisia sieversiana*)的属间体细胞杂种,从而成功地将大籽蒿的抗锈病性状转移到了栽培菊花中。Liu 等^[63]对体细胞属间杂种的应用进行了综述,认为该技术可以在作物改良和种质创新领域发挥重要的作用。但是,体细胞融合只使两个属(种)植物的基因进行简单结合,而没有发生异源基因间的复杂重组,使得体细胞融合在改良性状上的效果受到限制;同时,由于体细胞融合获得的杂种体内继承了双亲几乎全部的遗传物质,使得不同源基因之间的冲突和不协调性加大,因而多生长不良或不能正常开花结实^[62,64]。此外,对相同材料之间有性生殖和体细胞杂种的比较发现,不仅杂交后代在形态和抗性性状上有明显差异,而且体细胞融合在转移父本叶绿体和线粒体基因时仍然很困难^[65]。此外,由于体细胞融合涉及原生质体制备、诱导融合、杂种原生质体的筛选以及分化成苗等多个技术环节,相对而言难度也较大^[62]。

2.7 使用桥梁亲本

在某些情况下,当 2 个物种之间存在严重不可交配性、直接杂交有困难时,可以通过寻找第三方材料作桥梁亲本(Bridge parent)的方法加以解决,即先将 1 个或 2 个亲本与桥梁亲本杂交后,再使其杂种与另 1 个亲本杂交或者 2 个杂种互相交配。通过这种获得“三交种”或“双交种”的途径,则可能使不能杂交的两个种的基因组最终结合在一起。如栽培桃与蒙古桃杂交不易成功,若先将蒙古桃与山桃杂交获得杂种后,再用该杂种与栽培桃杂交,即可获得后代^[66]。再如芙蓉菊(*Crossostephium chinense* (L.) Makino)和栽培菊直接杂交很困难,但通过其先与大岛野路菊杂交,再用它们的杂种与栽培菊杂交,则很容易就可收获到种子,而且杂种后代中携带有芙蓉菊的基因组^[18,67]。本文作者也通过桥梁亲本的使用,不仅提高了菊科不同属物种间杂交的亲和性,而且通过不同属间杂种的复合杂交,实现了三属杂种的构建和抗性聚合种质的创造^[19,68]。

3 结论与展望

总之,人工远缘杂交已经在作物新品种选育中发挥了重要作用,包括提高产量、改良品质、增强对生物和非生物胁迫的适应性和抵抗力等各个方面,

是植物育种领域的一个重要研究方向。多年来,人们对可能导致远缘杂交受精前生殖障碍的原因进行了较广泛的研究,有助于我们运用各种方法予以有效克服。但是,任何形态结构、组织化学、生理代谢乃至蛋白质方面的变化都是外在表现,其根本原因仍在于基因的表达,故远缘杂交受精前障碍产生的内在机制依然不十分清楚,有待于进一步开展深入系统的研究。因此,未来研究的方向和重点首先应努力揭示远缘杂交不亲和的分子机理,在为育种实践提供理论指导的同时,更多地将远缘杂交与日益发展的分子育种手段相结合;其次,在开展育种实践时,应综合运用多种方法以有效提高亲和性,尤其注重与受精后生殖障碍克服方法(如幼胚拯救、杂种染色体加倍等)的结合,以获得大量可供筛选的后代群体,切实提高育种效率;最后,应尝试开展多个物种间的复合杂交研究,构建多属间或多种间的远缘杂种,以实现有益性状的聚合。

参考文献:

- [1] Riplev V L, Beversdorf W D. Development of self-incompatible *Brassica napus*. I. Introgression of S-alleles from *Brassica oleracea* through interspecific hybridization [J]. Plant Breeding 2003, 122: 1–5.
- [2] Deng Y M, Chen S M, Lu A M *et al.* Production and characterisation of the intergeneric hybrids between *Dendranthema morifolium* and *Artemisia vulgaris* exhibiting enhanced resistance to chrysanthemum aphid (*Macrosiphoniella sanbourni*) [J]. Planta 2010, 231: 693–703.
- [3] Deng Y M, Teng N J, Chen S M *et al.* Reproductive barriers in the intergeneric hybridization between *Chrysanthemum grandiflorum* (Ramat.) Kitam. and *Ajania przewalskii* Poljak. (Asteraceae) [J]. Euphytica 2010, 174: 41–50.
- [4] Deng Y M, Chen S M, Chen F D *et al.* The embryo rescue derived intergeneric hybrid between chrysanthemum and *Ajania przewalskii* shows enhanced cold tolerance [J]. Plant Cell Reports 2011, 30: 2177–2186.
- [5] Deng Y M, Chen S M, Chang Q S *et al.* The *chrysanthemum* x *Artemisia vulgaris* intergeneric hybrid shows better rooting ability and alternarial leaf spot resistance than its chrysanthemum parent [J]. Scientia Horticulturae 2012, 134: 185–190.
- [6] Van Creijl M G M, Van Raamsdonk L W D, Van Tuyl J M. Wide interspecific hybridization of *Lilium*: preliminary result of the application of pollination and embryo rescue methods [J]. The Lily Yearbook of the North American Lily Society 1993, 43: 28–37.
- [7] Van Eijk J P, Van Raamsdonk L W D, Eikelboom W *et al.* Interspecific crosses between *Tulipa gesneriana* cultivars and wild *Tulipa* species: A survey [J]. Sexual Plant Reproduction 1991, 4: 1–5.
- [8] Van Tuyl J M. Interspecific hybridization of flower bulbs: a review [J]. Breeding Genetics and Selection 1997, 465–475.
- [9] Van Tuyl J M, Van Dien M P, Van Creijl M G M *et al.* Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses [J]. Plant Science, 1991, 74: 115–126.
- [10] 戴思兰. 现代菊花的起源研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 1994.
- [11] 赵慧恩. 菊属基因池的发掘、现代菊花的起源及多用途地被菊的选育 [D]. 北京: 北京林业大学, 2000.
- [12] Shibata M, Kawuata J, Amano M *et al.* Breeding process and characteristics of Moonlight an interspecific hybrid between *Chrysanthemum morifolium* and *C. pacificum* [J]. Bulletin of National Research Institution of Vegetables Ornamental Plants & Tea 1988, Series A (2): 257–277.
- [13] Chen J Y, Wang S, Wang X C *et al.* Thirty years' studies on breeding ground-cover chrysanthemum new cultivars [J]. Acta Horticulturae 1995, 404: 30–36.
- [14] Anderson N. *Chrysanthemum*, *Chrysanthemum* x *grandiflora* Tzvelv. In: Anderson N (ed.) Flower breeding and genetics issues, challenges and opportunities for the 21st century [J]. Springer, Berlin 2007: 389–437.
- [15] 邓衍明, 叶晓青, 余建明, 等. 植物远缘杂交育种研究进展 [J]. 华北农学报 2011, 26(S2): 52–55.
- [16] 卢良恕. 21 世纪我国农业科学技术发展趋势与展望 [J]. 中国农业科学 1998(2): 1–19.
- [17] 高新起, 王秀玲. 植物远缘杂交的障碍及其克服 [J]. 生物学通报 1998, 33(12): 12–14.
- [18] 汤访评. 菊属与四个近缘属植物远缘杂交研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [19] 邓衍明. 利用属间远缘杂交创造栽培菊花抗逆新种质的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [20] 赵宏波. 东亚春黄菊族系统演化及栽培菊花与矾菊属间杂交研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [21] 赵宏波, 陈发棣, 郭维明, 等. 菊属与亚菊属属间杂种的鉴定及其分类学意义 [J]. 植物分类学报 2007, 45(5): 661–669.
- [22] 李辛雷. 菊属植物自交、杂交及远缘杂种幼胚拯救研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2004.
- [23] McClure B A, Franklin-Tong V. Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in “self” pollen tube inhibition [J]. Planta, 2006, 224: 233–245.
- [24] Berger F. Double-fertilization, from myths to reality [J]. Sexual Plant Reproduction 2008, 21: 3–5.
- [25] 杨宏远. 双受精: 有花植物的胚和胚乳发育 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [26] Aliyu O M. Pollen-style compatibility in cashew (*Anacardium occidentale* L.) [J]. Euphytica 2007, 158: 249–260.
- [27] Wilcock C, Neiland R. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters [J]. Trends in Plant Sciences 2002, 17: 270–277.
- [28] Teng N, Chen T, Jin B *et al.* Abnormalities in pistil development result in low seed set in *Leymus chinensis* (Poaceae) [J]. Flora 2006, 201: 658–667.
- [29] Li J, Teng N J, Chen F D *et al.* Reproductive characteristics of *Opisthopappus taihangensis* (Ling) Shih, an endangered Asteraceae species endemic to China [J]. Scientia Horticulturae 2009, 121: 474–479.
- [30] 吕晋慧, 赵耀, 任意, 等. 地被菊花粉生活力测定及影响因素研究 [J]. 华北农学报 2011, 26(4): 189–193.

- [31] 武喆,刘霞,张光星.不同温度对胡萝卜花粉活力的影响[J].华北农学报,2010,25(4):116-118.
- [32] 孙春青,陈发棣,房伟民等.栽培菊花‘奥运天使’与野路菊杂交生殖障碍的细胞学机理[J].中国农业科学,2009,42(6):2085-2091.
- [33] 胡适宜.被子植物生殖生物学[M].北京:科学出版社,2005.
- [34] Vervaeke I,Parton E,Maene L *et al.* Prefertilization barriers between different Bromeliaceae [J]. Euphytica, 2001,118:91-97.
- [35] 睢薇,丁晓东,霍俊伟等.草原樱桃与欧洲甜樱桃远缘杂交不亲和原因初探[J].东北农业大学学报,1999,30(2):148-153.
- [36] 张志毅,于雪松.杨树生殖生物学研究进展[J].北京林业大学学报,2000,22(6):69-74.
- [37] Ram S G, Thiruvengadam V, Ramakrishnan S H *et al.* Investigation on pre-zygotic barriers in the interspecific crosses involving *Gossypium barbadense* and four diploid wild species [J]. Euphytica, 2007,159:241-248.
- [38] Ram S G, Ramakrishnan S H, Thiruvengadam V *et al.* Prefertilization barriers to interspecific hybridization involving *Gossypium hirsutum* and four diploid wild species [J]. Plant Breeding, 2008,127:295-300.
- [39] 徐义流,张绍铃.花粉-雌蕊相互作用的分子基础[J].西北植物学报,2003,23(10):1800-1809.
- [40] Nomura M, Nakajima A, Inaba K. Proteomic profiles of embryonic development in the ascidian *Ciona intestinalis* [J]. Developmental Biology, 2009,325:468-481.
- [41] 翟桂玉.黑麦草与苇状羊茅杂交育种的最新进展[J].牧草与饲料,1990(1):1-5.
- [42] 叶要妹.百日草杂交亲本的选育与自交系间遗传多样性评价[D].武汉:华中农业大学,2008.
- [43] Zhou S J, Ramanna M S, Visser R G F *et al.* Analysis of the meiosis in the F_1 hybrids of *Longiflorum* x *Asiatic* (LA) of lilies (*Lilium*) using genomic *in situ* hybridization [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2008,35:687-695.
- [44] Stebbins G L. The inviability, weakness, and sterility of interspecific hybrids [J]. Advance of Genetics, 1958,9:147-215.
- [45] 李玉晖,陈学森,郑洲.果树远缘杂交育种研究进展[J].山东农业大学学报,2003,34(1):139-143.
- [46] Sun C Q, Chen F D, Teng N J *et al.* Factors affecting seed set in the crosses between *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura and its wild species [J]. Euphytica, 2010,171:181-192.
- [47] Sun C Q, Chen F D, Teng N J *et al.* Interspecific hybrids between *Chrysanthemum grandiflorum* (Ramat.) Kitamura and *C. indicum* (L.) Des Moul. and their drought tolerance evaluation [J]. Euphytica, 2010,174:51-60.
- [48] Ronald W G, Ascher P D. Effects of high temperature treatments on seed yield and self incompatibility in chrysanthemum [J]. Euphytica, 1975,24:317-322.
- [49] 李玉花.草莓辐射生物学效应及应用的研究[D].沈阳:沈阳农业大学,1994.
- [50] Sankin L S. Some results and prospects in the use of distant hybridization in breeding fruit crops [J]. Much. tr. Tyumen. Unt, 1976,23:87-90.
- [51] Brown A G. Proceedings of Eucarpia Fruit Section Symposium [M]. Tree Fruit Breeding France, 1979.
- [52] 杨利平,马宪红,丁冰等.百合花卉种间杂交种的培育[J].东北林业大学学报,1997,25(1):29-32.
- [53] 陈瑞丹.梅花杂交育种及其胚培养的研究[D].北京:北京林业大学,2003.
- [54] 孟金陵.植物生殖遗传学[M].北京:科学出版社,1997.
- [55] 黄济明.采用切割花柱的幼胚离体培养方法培育百合种间远缘杂交种[J].种子,1983(3):24-27.
- [56] Van Tuyl J M, Bino R J, Custers J B M. Application of *in vitro* pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue techniques in breeding of *Lilium*, *Tulipa* and *Nerine* [M]. In: J. De Jong, Ed. Integration of *in vitro* Techniques in Ornamental Plant Breeding. Wageningen, CPO, 1990, pp. 86-97.
- [57] 王四清.地被菊遗传育种研究[D].北京:北京林业大学,1993.
- [58] 沈德绪.果树育种学[M].北京:农业出版社,1995,142-154.
- [59] 马锋旺,康俊生.桃和杏杂交亲和性试验[J].果树科学,1996,13(4):251-252.
- [60] Shivanna K R, Sawhney V K. Barriers to hybridization [M]. In: Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement, 1997, pp. 261-272.
- [61] Zenkteler M. *In-vitro* fertilization of ovules of some species of Brassicaceae [J]. Plant Breeding, 1990,105:221-228.
- [62] Furuta H, Shinoyama H, Nomura Y *et al.* Production of intergeneric somatic hybrids of chrysanthemum [*Dendranthema* x *grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] and wormwood (*Artemisia sieversiana* J. F. Ehrh. ex Wild) with rust (*Puccinia horiana* Henning) resistance by electrofusion of protoplasts [J]. Plant Science, 2004,166:695-702.
- [63] Liu J H, Xu X Y, Deng X X. Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005,82:19-44.
- [64] Du X Z, Ge X H, Yao X C *et al.* Production and cytogenetic characterization of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Isatis indigotica* and backcross progenies [J]. Plant Cell Reports, 2009,28:1105-1113.
- [65] Lefrançois C, Chupeau Y, Bourgin J P. Sexual and somatic hybridization in the genus *Lycopersicon* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993,86:533-546.
- [66] 蔡旭.植物遗传育种学[M].北京:科学出版社,1988.
- [67] Tang F P, Chen F D, Chen S M *et al.* Intergeneric hybridization and relationship of genera within the tribe Anthemideae Cass. (I. *Dendranthema crassum* (Kitam.) Kitam. x *Crossostephium chinense* (L.) Makino) [J]. Euphytica, 2009,169:133-140.
- [68] Deng Y M, Jiang J F, Chen S M *et al.* Combination of multiple resistance traits from wild relative species in dryanthemum via trigeneric hybridization [J]. PLOS One, 2012,7(8):e44337. DOI: 10.1371/journal.pone.0044337.