

DOI:10.12171/j.1000-1522.20210449

赤霉素喷洒处理诱导新疆杨 $2n$ 花粉产生 及其对微管骨架的影响

赵一帆 孔博 程雪桐 李亮 凌傲宇 李智群 康向阳 张平冬

(林木育种与生态修复国家工程研究中心, 林木、花卉遗传育种教育部重点实验室, 树木花卉育种生物工程国家林业和草原局重点实验室,
北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要:【目的】探究赤霉素喷洒处理诱导新疆杨产生 $2n$ 花粉的可行性及其对花粉母细胞微管骨架的影响, 旨在开发诱导效果好且价格低廉的新型化学诱变剂, 构建高效的林木多倍体育种技术体系。【方法】以新疆杨雄花枝为试验材料, 利用醋酸洋红染色法、免疫荧光法等方法, 在观察新疆杨花粉母细胞减数分裂进程的基础上, 开展了赤霉素喷洒处理诱导新疆杨 $2n$ 花粉产生及其对花粉母细胞减数分裂微管骨架动态变化的影响研究。【结果】新疆杨花粉母细胞减数分裂历时约 4 d, 且存在明显的不同步性。减数分裂时期、喷洒次数、减数分裂时期和喷洒次数的交互作用、以及喷洒次数和赤霉素浓度的交互作用均对 $2n$ 花粉诱导率具有显著影响。利用 $50\ \mu\text{mol/L}$ 的赤霉素溶液于第二次减数分裂时期对新疆杨花粉母细胞进行 7 次喷洒处理是诱导新疆杨花粉染色体加倍的最佳处理组合, $2n$ 花粉诱导率达到 $(8.83 \pm 3.10)\%$ 。与对照组相比, 在最佳处理条件下, 新疆杨花粉母细胞末期 II 相邻子核之间的辐射状微管部分缺失, 导致 2 个相邻子核间胞质分裂失败, 从而产生核复原现象, 形成三分体, 进而发育成一个单倍性配子和一个 $2n$ 配子。【结论】赤霉素喷洒处理可诱导新疆杨花粉染色体加倍, 获得一定比例的 $2n$ 花粉。赤霉素喷洒处理后, 花粉母细胞第二次减数分裂末期相邻子核之间的辐射状微管部分缺失可能是赤霉素处理诱导新疆杨产生 $2n$ 花粉的原因。

关键词: 新疆杨; 赤霉素; 减数分裂; $2n$ 花粉; 微管骨架

中图分类号: S792.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2023)01-0040-11

引文格式: 赵一帆, 孔博, 程雪桐, 等. 赤霉素喷洒处理诱导新疆杨 $2n$ 花粉产生及其对微管骨架的影响 [J]. 北京林业大学学报, 2023, 45(1): 40-50. Zhao Yifan, Kong Bo, Cheng Xuotong, et al. Pollen chromosome doubling induced by gibberellin spraying treatment and its effect on microtubule cytoskeleton in *Populus bolleana* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2023, 45(1): 40-50.

Pollen chromosome doubling induced by gibberellin spraying treatment and its effect on microtubule cytoskeleton in *Populus bolleana*

Zhao Yifan Kong Bo Cheng Xuotong Li Liang Ling Aoyu
Li Zhiquan Kang Xiangyang Zhang Pingdong

(National Engineering Research Center of Tree Breeding and Ecological Restoration, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of National Forestry and Grassland Administration, School of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] This work was to discuss the feasibility of produce $2n$ pollen by inducing $2n$ pollen production via gibberellins (GA_3) and investigating the effects on meiotic microtubule cytoskeleton of pollen mother cells (PMCs) in *Populus bolleana*, leading to developing a more effective and cheaper chemical

收稿日期: 2021-11-09 修回日期: 2022-01-04

基金项目: “十四五”国家重点研发计划(2021YFD2200105)。

第一作者: 赵一帆。主要研究方向: 林木细胞遗传与细胞工程。Email: 1805046660@qq.com 地址: 100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者: 张平冬, 教授, 博士生导师。主要研究方向: 林木遗传改良。Email: zhangpd@bjfu.edu.cn 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

mutagen and establishing an effective system of polyploidy breeding for forest tree. [Method] The observation of the meiotic process of PMCs, the production of 2n pollen induced by GA₃ spraying treatment and its effects on the organization of microtubule were conducted by aceto-carmin (2%) staining and indirect immunofluorescence microscopy using male flower branches as experimental material in *P. bolleana*. [Result] It took about 4 days to complete the meiosis of PMCs, and the meiotic process within different buds was asynchronous. The meiotic stage, spray time, the interaction of meiotic stage × spray time and spray time × concentration of GA₃ had significant effects on the induction rates of 2n pollen. The optimal treatment combination for inducing pollen chromosome doubling by 50 μmol/L GA₃ solution was given 7 time spraying when PMCs were at meiosis II. The highest induction rate was (8.83 ± 3.10) %. Compared with the control group, the radial microtubular structures between two neighboring nuclei were under the optimal conditions, lacked in some treated PMCs, leading to the failure of cytokinesis, nuclear restitution and the formation of triad and consequently a haploid gamete and a 2n gamete. [Conclusion] Spraying gibberellin could induce chromosome doubling of *P. bolleana* pollen and obtain 2n pollen in a certain proportion. After PMCs being treated with GA₃, the partial absence of radial microtubular structure between two neighboring daughter nuclei in some PMCs at telophase II is found to be responsible for 2n pollen production.

Key words: *Populus bolleana*; gibberellins; meiosis; 2n pollen; microtubule cytoskeleton

多倍化是一种普遍的自然现象,是植物进化和物种形成的重要推动力^[1]。利用 2n 配子的有性多倍化是植物多倍化的主要途径之一。但自然界中天然 2n 配子发生频率一般较低,难以应用于植物多倍体育种实践。为了提高 2n 配子的发生频率,进而提高多倍体得率,育种学家们常常利用物理或化学方法进行 2n 配子人工诱导。

秋水仙碱作为一种重要的化学诱变剂,已成功应用于诱导林木大孢子、胚囊、合子以及体细胞染色体加倍、选育多倍体的育种实践,获得了数以百计的杨树(*Populus* spp.)^[2-8]、刺槐(*Robinia pseudoacacia*)^[9]、杜仲(*Eucommia ulmoides*)^[10]、尾叶桉(*Eucalyptus urophylla*)^[11]等林木三倍体与四倍体新种质。秋水仙碱也曾用于诱导杨树^[12-13]、杜仲^[14]以及桉树(*Eucalyptus*)^[15]等树种的花粉染色体加倍研究,获得了 20.0%~88.0% 的 2n 花粉。但是,秋水仙碱价格昂贵,且具有剧毒性,容易导致加倍处理操作人员中毒。

高温是一种有效的物理诱导方法,目前已成功应用于诱导杨树^[16-19]、杜仲^[20]、桉树^[21]等树种的大孢子、胚囊以及合子染色体加倍、选育多倍体的育种实践,获得了大量的毛白杨(*Populus tomentosa*)^[16-17]、‘折引3号’杨(*P. pseudo-simon* II × *P. nigra* ‘Zheyin3#’)^[18]、毛新杨(*P. tomentosa* × *P. bolleana*)^[19]以及银腺杨(*P. alba* × *P. glandulosa*)^[19]等杂种三倍体。高温也曾用于诱导毛新杨^[22]、响叶杨(*P. adenopoda*)^[23]、银白杨(*P. alba*)^[24]及银灰杨(*P. canescens*)^[25]的花粉染色体加倍研究,确定了高温诱导 2n 花粉的有效时期为终变期附近,且获得了 60.0%~80.0% 的高频率

2n 花粉。但有研究表明:高温诱导获得的 2n 配子均为 SDR 型^[26],其遗传亲本的杂合性仅为 FDR 型 2n 配子的一半,严重限制了高温在多倍体育种中的应用。

赤霉素(gibberellins, GA₃)是一类重要的内源植物激素,具有调控细胞分化、种子萌发、叶片扩展、毛状体发育、花粉成熟以及开花转换等方面的功能^[27-30]。赤霉素还是一种非生物逆境应激信号分子,水稻(*Oryza sativa*)经历冷胁迫时,通过降低内源赤霉素水平以抑制根系生长,并阻滞花粉发育^[31]。此外,赤霉素能够调节拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)小孢子发生和花粉发育^[32],具有诱导拟南芥产生 2n 花粉的功能^[33]。但赤霉素是否能够有效地诱导杨树产生 2n 花粉尚不清楚。

减数分裂是植物有性生殖过程中配子形成的必要阶段。在植物花粉母细胞减数分裂过程中,微管骨架参与纺锤体和成膜体的形成,以及核周和胞质微管网络的构建,从而决定同源染色体和姐妹染色单体分离以及细胞质的正常分裂^[34-36]。有研究表明:植物天然 2n 花粉的产生与花粉母细胞减数分裂以及胞质分裂的异常密切相关^[37],而这些异常的现象均受细胞内微管网络系统的严格调控。研究赤霉素喷洒处理后新疆杨(*Populus bolleana*)花粉母细胞微管骨架的异常变化,可为赤霉素喷洒处理诱导新疆杨 2n 花粉的发生机制提供有力的细胞学依据。

新疆杨为杨柳科(Salicaceae)杨属(*Populus*)白杨派乔木,是银白杨的变种,广泛种植于新疆、内蒙、北京、陕西、辽宁等省市。新疆杨是分布区内生

态防护林建设和城市绿化的主要树种之一,在防风固沙和涵养水源方面具有重要作用。但有关新疆杨多倍体育种研究的报道甚少。本研究以新疆杨花粉母细胞为研究对象,在掌握新疆杨花粉母细胞减数分裂规律的基础上,研究赤霉素喷洒处理诱导新疆杨产生 $2n$ 花粉的可行性及其对花粉母细胞微管骨架的影响,旨在为开发诱导效果好且价格低廉的新型化学诱变剂、构建高效的林木多倍体育种技术体系奠定重要的理论和实践基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

每年冬季落叶后,从内蒙古自治区包头市国家杨树良种基地采集新疆杨雄花枝,塑料布包裹后运输至北京林业大学温室待用。

1.2 研究方法

1.2.1 新疆杨花粉母细胞减数分裂进程观察

新疆杨雄花枝水培于 $10\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温室,每隔 $2\sim 3\text{ h}$ 摘取 $2\sim 3$ 个花芽,去除鳞片后,将其放于 5 mL 的离心管内,利用新配的卡诺固定液进行固定。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱固定 24 h 后,摘取花药,利用醋酸洋红染色法观察花粉母细胞减数分裂进程。染色体制片具体操作参照鲁敏等^[23]的方法。在 Olympus BX-51 光学显微镜下观察花粉母细胞减数分裂进程^[38],并运用 Olympus DP70 数码摄像系统进行照相。

1.2.2 新疆杨雄花芽的赤霉素喷洒处理

以育性良好的新疆杨雄花芽为材料,于花粉母细胞、第一次减数分裂和第二次减数分裂时期,使用浓度为 50 、 100 、 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的赤霉素对花芽分别进行 3 、 5 、 7 次喷洒处理。当观察到大部分新疆杨花粉母细胞发育至第二次减数分裂时,使用水对花芽分别进行 3 、 5 、 7 次喷洒处理作为对照(表 1)。处理后的雄花芽继续在温室中水培至花粉成熟,按照不同处理收集花粉,放置于 1.5 mL 的离心管中,添加适量的变色硅胶,密封保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱。

1.2.3 新疆杨 $2n$ 花粉发生频率的统计

用镊子分别夹取少量不同处理组合的花粉,均匀地洒在滴有醋酸洋红的载玻片上制作临时涂片,在 Olympus BX-51 光学显微镜下随机选取 5 个视野观察并进行拍照,进一步利用 Image J 软件测量花粉粒直径。以对照组花粉粒平均直径的 1.28 倍作为判别 $2n$ 花粉的标准^[39],统计每个视野中总花粉粒数与 $2n$ 花粉粒的数量,以 $2n$ 花粉占花粉粒总数的百分比作为 $2n$ 花粉发生频率,计算出不同处理组合的 $2n$ 花粉发生频率。试验重复 3 次,每次重复测量 $200\sim 300$ 个花粉粒。

表 1 新疆杨雄花芽的赤霉素喷洒处理
Tab. 1 GA₃ spraying treatment of flower buds
in *P. bolleana*

减数分裂时期 Meiotic stage	赤霉素浓度 Concentration of GA ₃ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	喷洒次数 Spraying time
花粉母细胞时期 Pollen mother cell (PMC) stage	50	3
		5
		7
	100	3
		5
		7
	200	3
		5
		7
	50	3
		5
		7
第一次减数分裂 Meiosis I	100	3
		5
		7
	200	3
		5
		7
第二次减数分裂 Meiosis II	50	3
		5
		7
	100	3
		5
		7
第二次减数分裂(对照) Meiosis II (control)	0	3
		5
		7

1.2.4 新疆杨成熟花粉精核和营养核的细胞学观察

用镊子夹取少量不同处理组合的花粉,均匀的洒在滴有蒸馏水的载玻片上水合 2 h ,用 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)对细胞核进行染色,用 Olympus BX-51 荧光显微镜观察新疆杨单倍性与 $2n$ 花粉粒精核与营养核的形态差异。

1.2.5 新疆杨花粉母细胞减数分裂微管骨架的免疫荧光标记

摘取赤霉素处理后的新疆杨雄花芽新鲜花药,迅速投入 PEM 缓冲液(50 mmol/L PIPES, 5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgSO_4 , $\text{pH } 6.8$)配制的 4% 多聚甲醛固定液中固定 45 min 后,参考 Brown 等^[40]的方法,开展赤霉素处理对新疆杨花粉母细胞减数分裂

微管骨架的影响研究, 利用激光共聚焦扫描显微镜观察并照相。

1.2.6 数据处理方法

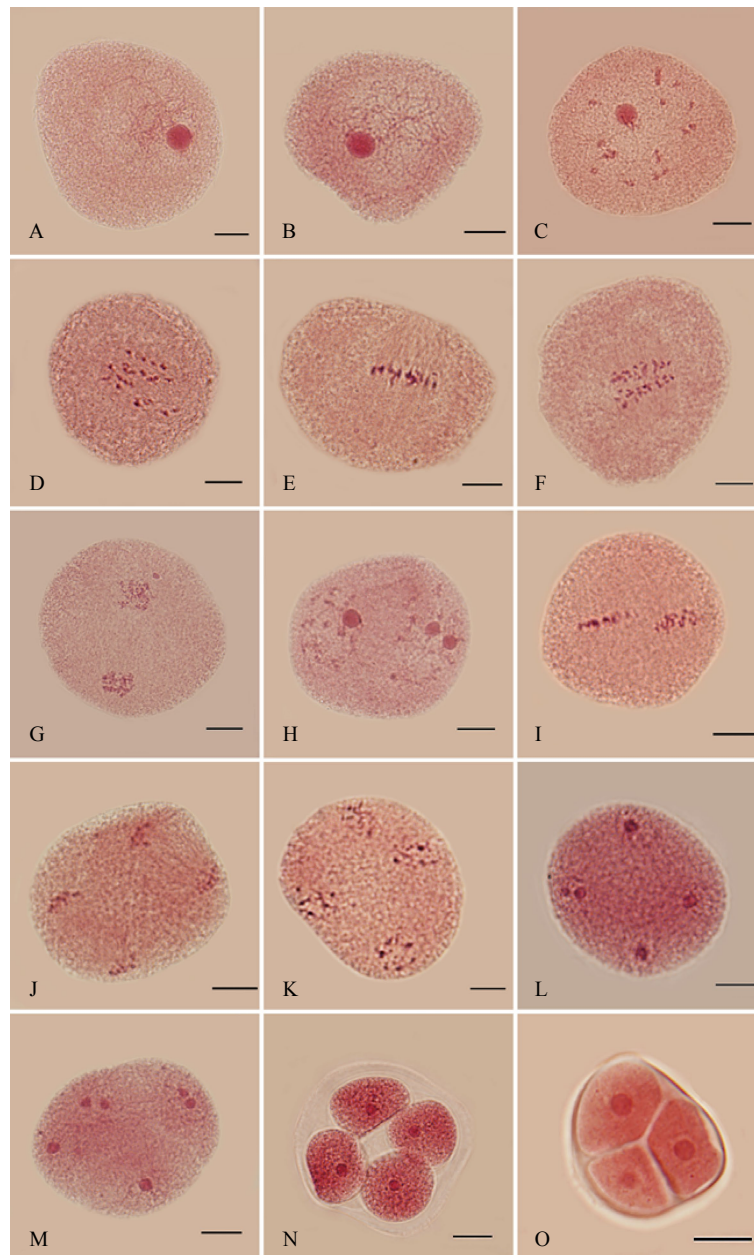
2n 花粉诱导率等百分比数据经反正弦变换^[4]后, 利用 SPSS18.0 统计软件进行差异显著性分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 新疆杨雄花芽减数分裂进程的观察

温室水培条件下, 新疆杨花粉母细胞由减数分裂细线期发育至四分体时期历时约 4 d(图 1, 表 2)。

其花粉母细胞的减数分裂是一个连续而非同步的过程(表 2)。温室水培 96 h 后, 花粉母细胞开始进入减数分裂, 大部分花粉母细胞发育至细线期(65.5%)(图 1A), 此时期染色体呈细丝状, 分布杂乱无章。水培至 124 h, 减数分裂发育至粗线期(40.0%)(图 1B), 染色体收缩变粗, 形态较细线期明显。水培 136 h 后, 大部分花粉母细胞进入双线期(47.5%)(图 1C), 染色体进一步缩聚, 可明显观察到同源染色体非姊妹染色单体间的交叉。水培 144 h 后, 大部分花粉母细胞进入终变期(46.0%)(图 1D), 此时染色体长度继续缩短, 核仁缩小乃至消失, 染色体缩聚呈点状,



A. 细线期; B. 粗线期; C. 双线期; D. 终变期; E. 中期 I; F. 后期 I; G. 末期 I; H. 前期 II; I. 中期 II; J. 后期 II; K~L. 末期 II; M. 末期 II 多核仁现象; N. 四分体; O. 三分体。标尺 = 10 μm 。A, leptotene; B, pachytene; C, diplotene; D, diakinesis; E, metaphase I; F, anaphase I; G, telophase I; H, prophase II; I, metaphase II; J, anaphase II; K-L, telophase II; M, multi-nucleoli phenomena at telophase II; N, tetrad; O, triad. Bar = 10 μm .

图 1 新疆杨花粉母细胞减数分裂进程

Fig. 1 Meiotic process of PMC in *P. bolleana*

表 2 新疆杨花粉母细胞的减数分裂进程
Tab. 2 Meiotic process of PMC in *P. bolleana*

%

减数分裂时期 Meiotic stage	水培时间 hydroponics time/h											
	96	110	124	136	144	152	160	168	174	180	186	192
细线期 Leptotene	65.5	28.5	9.0	3.5								
偶线期 Zygotene	25.5	51.5	36.5	14.5	5.0							
粗线期 Pachytene	9.0	16.5	40.0	27.5	18.0	12.5						
双线期 Diplotene		3.5	14.5	47.5	22.0	14.0						
终变期 Diakinesis				7.0	46.0	20.5						
中期 I Metaphase I					9.0	27.0	8.5	6.0				
后期 I Anaphase I						10.0	22.5	8.5				
末期 I Telophase I						12.0	37.5	13.0	5.5	2.0		
前期 II Prophase II						4.0	21.0	34.0	28.0	11.0	5.5	0.5
中期 II Metaphase II							10.5	30.5	37.0	25.5	6.5	2.0
后期 II Anaphase II								8.0	21.0	39.0	10.5	2.5
末期 II Telophase II									8.5	19.5	50.5	14.0
四分体 Tetrad										3.0	27.0	81.0

注: 表中数据为所在时期花粉母细胞比例。Note: data in the table are the proportion of PMCs in the period.

形态清晰可见。水培至 152 h 时, 花粉母细胞发育至中期 I (27.0%)(图 1E), 联合的同源染色体整齐地排列在赤道板中央。水培 160 h 后, 大部分花粉母细胞进入后期 I (22.5%)和末期 I (37.5%), 联合的同源染色体开始分离, 移向细胞的两极(图 1F)。当染色体抵达细胞的两极后, 开始解聚(图 1G), 随后核仁重新出现, 形成 2 个子核, 标志着第一次减数分裂结束。新疆杨花粉母细胞完成第一次减数分裂大约需要 64 h。

第一次减数分裂结束后, 花粉母细胞未进行细胞质分裂, 继续开始第二次分裂。当雄花枝水培至 168 h 时, 花粉母细胞发育至前期 II (34.0%)(图 1H), 此时 2 个子核区的染色体重新缩聚, 核仁逐渐消失。水培 174 h 后, 大部分花粉母细胞进入中期 II (37.0%)(图 1I), 2 组染色体整齐地排列在子细胞的赤道板上。水培 180 h 后, 大部分花粉母细胞进入后期 II (39.0%)(图 1J), 姐妹染色单体开始分开, 移向子细胞的两极。水培 186 h 后, 花粉母细胞发育至末期 II (50.5%)(图 1K), 染色单体抵达子细胞的两极, 染色体解螺旋, 核仁重新出现(图 1L), 此时期部分花粉母细胞存在多核仁现象(图 1M)。水培 192 h 后, 绝大部分花粉母细胞进入四分体时期(81.0%)(图 1N)。此时期还可以观察到少量的三分体存在(图 1O)。第二次减数分裂经历的时间明显少于第一次减数分裂, 仅需要 32 h。

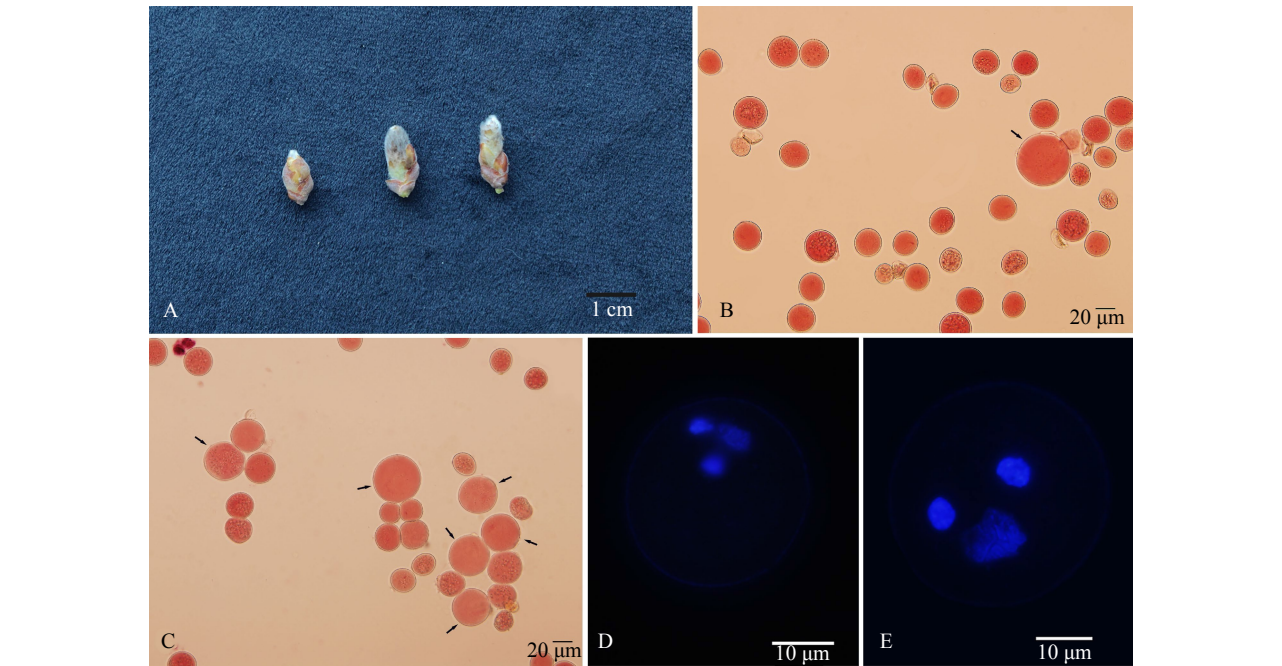
2.2 新疆杨 2n 花粉的赤霉素诱导

新疆杨雄花芽经不同浓度的赤霉素喷洒处理后, 部分花芽因赤霉素的刺激而生长发育过快, 导致干枯死亡或提早脱落(图 2A), 未收集到花粉。存活

花芽继续水培于温室, 直至花药成熟开裂, 均可收集到一定量的花粉。花粉经 2% 的醋酸洋红染色后, 在光学显微镜下进行花粉粒镜检, 可观察大部分花粉粒被染成红色, 且着色均匀, 这说明该花粉粒具有较好的生活力。通过花粉粒形态比较可以发现: 新疆杨对照组中存在少量的天然 2n 花粉(图 2B), 其发生频率为 0.11% ~ 0.42%(表 3)。

不同赤霉素处理组合中, 均可观察到一定比例的 2n 花粉(图 2C)。花粉粒经 DAPI 染色后, 无论是单倍性花粉粒(图 2D)还是 2n 花粉粒(图 2E), 均可观察到 1 个较大的营养核和 2 个高度凝缩的精核。但 2n 花粉粒的营养核和精核明显大于正常的单倍性花粉。这说明赤霉素喷洒处理诱导产生的大花粉的确是 2n 花粉。

从表 3 可以看出: 不同处理组合的 2n 花粉诱导率存在明显的差异, 其中以 50 μmol/L 的赤霉素于第二次减数分裂时期喷洒处理 7 次的效果最好, 平均 2n 花粉诱导率达到(8.83 ± 3.10)%; 以 50 μmol/L 的赤霉素于花粉母细胞时期喷洒处理 3 次的效果最差, 平均 2n 花粉诱导率仅为(0.40 ± 0.26)%。不同处理组合 2n 花粉诱导率的方差分析结果表明(表 4): 处理次数($F = 9.600, P < 0.001$)对新疆杨 2n 花粉诱导率具有极显著影响; 处理时期($F = 4.426, P = 0.017$)对 2n 花粉诱导率具有显著影响; 赤霉素浓度($F = 2.538, P = 0.088$)对 2n 花粉诱导率的影响不显著。处理时期和处理次数的多重比较结果表明(表 5): 第二次减数分裂时期的 2n 花粉诱导率显著高于花粉母细胞时期和第一次减数分裂时期; 赤霉素喷施 7 次的 2n 花粉诱导率显著高于 3 次和 5 次。



A. 赤霉素处理后干瘪的花芽; B. 天然 2n 花粉(箭头指向); C. 赤霉素诱导的 2n 花粉(箭头指向); D. DAPI 染色后的单倍性花粉; E. DAPI 染色后的赤霉素诱导的 2n 花粉。A, the dry flower buds after GA₃ treatment; B, natural 2n pollen (arrow); C, induced 2n pollen by GA₃ treatment (arrow); D, haploid pollen after DAPI staining; E. induced 2n pollen by GA₃ treatment after DAPI staining.

图 2 赤霉素喷洒处理诱导新疆杨 2n 花粉及其对花芽发育的影响

Fig. 2 2n pollen induced by GA₃ and its effects on the development of male flower buds in *P. bolleana*

表 3 不同赤霉素喷洒处理组合的新疆杨 2n 花粉诱导率

Tab. 3 Induction rates of 2n pollen with different combinations of GA ₃ spraying treatments in <i>P. bolleana</i>			
减数分裂时期 Meiotic stage	赤霉素浓度 Concentration of GA ₃ /(μmol·L ⁻¹)	喷洒次数 Spraying time	2n花粉诱导率 Induction rate of 2n pollen/%
花粉母细胞时期 PMC stage	50	3	0.40 ± 0.26
		5	1.03 ± 0.92
		7	5.01 ± 1.74
	100	3	3.01 ± 0.36
		5	4.69 ± 0.44
		7	5.04 ± 2.16
	200	3	3.22 ± 0.40
		5	4.89 ± 0.53
		7	5.00 ± 3.63
第一次减数分裂 Meiosis I	50	3	2.15 ± 1.18
		5	2.12 ± 0.21
		7	5.98 ± 1.35
	100	3	2.67 ± 1.76
		5	2.55 ± 0.80
		7	4.98 ± 3.78
	200	3	5.53 ± 1.64
		5	4.03 ± 1.29
		7	4.72 ± 0.44
第二次减数分裂 Meiosis II	50	3	4.72 ± 1.83
		5	5.50 ± 1.89
		7	8.83 ± 3.10
	100	3	4.08 ± 1.25
		5	3.09 ± 0.96
		7	3.04 ± 2.75
	200	3	4.25 ± 2.13
		5	5.66 ± 1.29
		7	5.22 ± 1.35
第二次减数分裂(对照) Meiosis II (control)	0	3	0.11 ± 0.04
		5	0.42 ± 0.27
		7	0.26 ± 0.11

表 4 不同处理组合新疆杨 2n 花粉诱导率的方差分析

变异来源 Source of variation	df	F	P
减数分裂时期 Meiotic stage	2	4.426*	0.017
喷洒次数 Spraying time	2	9.600**	0.000
赤霉素浓度 Concentration of GA ₃	2	2.538	0.088
减数分裂时期 × 喷洒次数 Meiotic stage × spraying time	4	0.940	0.448
减数分裂时期 × 赤霉素浓度 Meiotic stage × concentration of GA ₃	4	5.103**	0.001
喷洒次数 × 赤霉素浓度 Spraying time × concentration of GA ₃	4	3.565*	0.012
减数分裂时期 × 喷洒次数 × 赤霉素浓度 Meiotic stage × spraying time × concentration of GA ₃	8	0.562	0.804

注: **代表差异极显著($P < 0.01$), *代表差异显著($P < 0.05$)。Notes: ** represents extremely significant differences ($P < 0.01$), * represents significant differences ($P < 0.05$).

表 5 不同减数分裂时期和不同喷洒次数新疆杨 2n 花粉诱导率的多重比较

Tab. 5 Multiple comparisons in induction rates of 2n pollen under different meiotic stages and different spraying times in <i>P. bolleana</i>			
减数分裂时期 Meiotic stage	平均2n花粉诱导率 Average induction rate of 2n pollen/%	喷洒次数 Spraying time	平均2n花粉诱导率 Average induction rate of 2n pollen/%
花粉母细胞时期 PMC stage	3.59 ± 2.18b	3	3.34 ± 1.85b
第一次减数分裂 Meiosis I	3.86 ± 2.03b	5	3.73 ± 1.78b
第二次减数分裂 Meiosis II	4.93 ± 2.33a	7	5.31 ± 2.54a

注: 不同小写字母代表差异显著($P < 0.05$)。Note: different lowercase letters represent significant differences ($P < 0.05$).

因此,当花粉母细胞发育至第二次减数分裂时,以 50 μmol/L 的赤霉素进行 7 次喷洒处理是诱导新疆杨花粉染色体加倍的最佳处理组合。

2.3 赤霉素喷洒处理对新疆杨花粉母细胞减数分裂微管骨架的影响

在新疆杨花粉母细胞减数分裂过程中,其微管骨架的分布总体表现出规律性变化(图 3A ~ L)。花粉母细胞进入减数分裂前期 I 时,网状核周微管分布于细胞质中,包裹着细胞核(图 3A ~ B)。花粉母细胞发育至终变期时,微管发生方向改变,原来分布于胞质中的微管减少,逐步转向细胞核内,包围着细胞核内的染色体(图 3C)。当花粉母细胞进入中期 I 时,从两极发出的细而长的极丝微管和与着丝粒相连的短而粗的着丝粒微管聚集形成狭窄的纺锤体维管束,连接着排列在赤道板上的染色体(图 3D)。花粉母细胞发育至后期 I 时,纺锤体微管牵引着同源染色体移向细胞两极(图 3E)。同源染色体抵达细胞两极后,花粉母细胞进入末期 I,此时微管又一次转向,分布至整个细胞质区域(图 3F)。

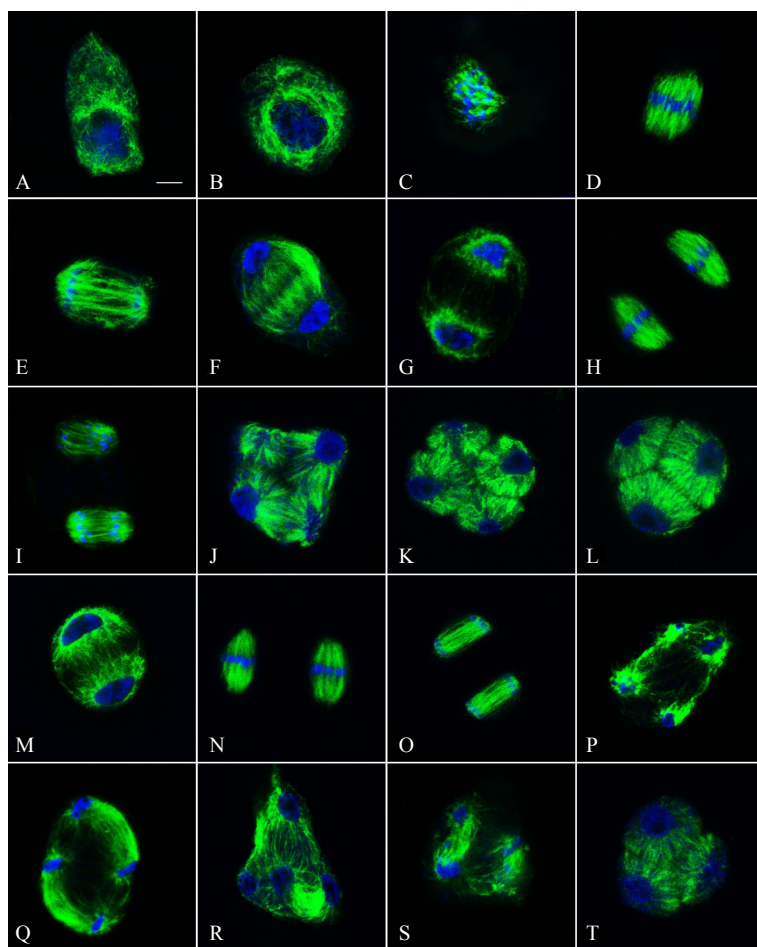
第一次减数分裂结束后,花粉母细胞不进行细胞质分裂,立即进入第二次减数分裂。花粉母细胞发育至前期 II 时,核周微管移向 2 个子细胞核内,与染色体相连(图 3G)。随着微管的进一步聚合,2 个子细胞核内分别出现纺锤体微管,连接着排列在赤道板上的染色体,此时花粉母细胞已发育至中期 II(图 3H)。当花粉母细胞发育至后期 II 时,子细胞内的纺锤体微管牵引着姐妹染色体单体移向两极(图 3I),当姐妹染色体抵达子细胞的两极后,辐射状微管在核膜处扩散,延伸至整个细胞质,联系着 4 个子核,标志着第二次减数分裂结束(图 3J)。在辐射状微管的驱动下,自细胞周沿发生向心胞质分裂,形成四分体(图 3K),偶尔还可观察到三分体(图 3L)。

与对照组相比,在第二次减数分裂时期赤霉素喷洒处理 7 次的处理组中,其微管骨架除末期 II 呈现异常外(图 3P ~ S),其他减数分裂时期的微管变化规律与对照组相似(图 3M ~ O)。在新疆杨花粉母细胞第二次减数分裂时期赤霉素喷洒处理 7 次后,末期 II 相邻子核之间的辐射状微管发生部分缺失(图 3P ~ S),与对照组末期 II 的微管骨架明显不同。末期 II 辐射状微管的部分缺失可导致 2 个相邻子核间胞质分裂失败,从而产生核复原现象,形成三分体(图 3T),进而发育成 1 个单倍性配子和 1 个 2n 配子。

新疆杨花粉母细胞减数分裂具有连续而不同步性,这可能是植物性母细胞减数分裂过程中的一种普遍现象。研究人员曾在银灰杨^[25]、毛白杨^[42]、通辽杨(*Populus simon* II × *P. nigra* ‘Tongliao’)^[43]、响叶

3 讨 论

新疆杨花粉母细胞减数分裂具有连续而不同步性,这可能是植物性母细胞减数分裂过程中的一种普遍现象。研究人员曾在银灰杨^[25]、毛白杨^[42]、通辽杨(*Populus simon* II × *P. nigra* ‘Tongliao’)^[43]、响叶



A. 细线期; B. 偶线期; C. 终变期; D. 中期 I; E. 后期 I; F. 末期 I; G. 前期 II; H. 中期 II; I. 后期 II; J. 末期 II; K. 四分体; L. 三分体; M. 赤霉素处理后的前期 II; N. 赤霉素处理后的中期 II; O. 赤霉素处理后的后期 II; P~S. 赤霉素处理后的末期 II; T. 赤霉素诱导的三分体。标尺 = 10 μm 。A, leptotene; B, zygotene; C, diakinesis; D, metaphase I; E, anaphase I; F, telophase I; G, prophase II; H, metaphase II; I, anaphase II; J, telophase II; K, tetrad; L, triad; M, prophase II by GA_3 treatment; N, metaphase II by GA_3 treatment; O, anaphase II by GA_3 treatment; P~S, telophase II in treated PMCs by GA_3 treatment; T, induced triad by GA_3 treatment. Bar = 10 μm .

图 3 新疆杨花粉母细胞减数分裂过程中微管骨架的动态变化

Fig. 3 Dynamic changes of microtubule cytoskeleton during meiosis of PMCs in *P. bolleana*

杨^[44]、美洲黑杨 (*Populus deltoides*)^[45]以及胡杨 (*Populus euphratica*)等^[46]物种的花粉母细胞减数分裂的研究中均发现不同步性。同一花枝不同部位花芽,其花粉母细胞减数分裂进程不同;同一花芽的不同小花内花粉母细胞减数分裂时期亦不相同;甚至同一小花内的不同花粉母细胞,其减数分裂进程也不相同。在恶劣环境条件下,这种复杂的花芽发育不同步性可以延长花期,有利于增强两性功能的有效作用时间,对其种群繁殖后代有利^[47]。

利用化学诱变剂人工诱导植物花粉染色体加倍获得 $2n$ 花粉时,诱变剂浓度、处理方式和处理时期是影响 $2n$ 花粉得率的关键影响因素。李赞等^[48]利用 0.5% 的秋水仙碱于细线末期至粗线期时对银白杨花粉母细胞进行 7 次注射处理,获得了高达 82.33% 的 $2n$ 花粉。Zhou 等^[49]利用 0.5% 的秋水仙碱于粗线期时对银灰杨花粉母细胞进行 11 次注射处理,获得了 30.3 % 的 $2n$ 花粉。本研究利用 50、

100、200 $\mu\text{mol/L}$ 赤霉素于花粉母细胞、第一次减数分裂以及第二次减数分裂时期对新疆杨雄花芽进行喷洒处理,不同处理组合均可获得一定比例的 $2n$ 花粉,说明利用赤霉素处理诱导杨树 $2n$ 花粉是可行的。其中,以 50 $\mu\text{mol/L}$ 赤霉素于第二次减数分裂时期喷洒处理 7 次的最佳处理组合仅获得 8.83% 的 $2n$ 花粉,原因主要包括 2 个方面:一是当花粉母细胞发育至第二次减数分裂前后,花芽一直被芽鳞包被,喷洒的赤霉素未能直接与花药接触而被蒸发,降低了赤霉素的处理效果;另一方面则是新疆杨同一花芽不同花药内花粉母细胞减数进程同步性差,影响了赤霉素的处理效果。

微管骨架在细胞分裂过程中发挥着重要作用。植物减数分裂的正常进行与微管骨架的有序分布和动态变化密切相关^[47]。王君^[18]对通辽杨的减数分裂免疫荧光分析研究发现:减数分裂末期 II 细胞成膜体缺失导致胞质分裂失败,细胞内子核未能正常分

离而共存于同1个小孢子内,形成二分体和三分体,进一步发育形成 $2n$ 花粉。鲁敏^[23]在响叶杨天然 $2n$ 花粉发生机制的研究中发现:减数分裂后期II纺锤体微管缺失导致姐妹染色单体不分离,末期II成膜体微管缺失导致胞质分裂异常,二者是天然 $2n$ 花粉产生的细胞学机制。张平冬等^[50]在胡杨减数分裂过程中观察到平行纺锤体、三极纺锤体和融合纺锤体,这些异常的纺锤体与胡杨天然 $2n$ 花粉发生密切相关。Liu等^[33]对拟南芥施加赤霉素处理后研究发现:减数分裂末期II相邻子核间的微管缺失,导致子核聚集在同1个小孢子中,发育形成 $2n$ 花粉。本研究通过免疫荧光技术探索了赤霉素处理对新疆杨花粉母细胞微管骨架构建及分布的影响,发现赤霉素处理可导致减数分裂末期II辐射状微管产生部分缺失,致使相邻子核间胞质分裂失败,从而产生核复原现象,形成三分体,进而发育成1个单倍性配子和1个 $2n$ 配子。

针对杨树花药被芽鳞包被而导致赤霉素喷洒处理效果不理想的问题,下一阶段的工作应聚焦于赤霉素处理方式、药剂浓度以及处理时间等技术条件优化研究,旨在提高赤霉素诱导 $2n$ 花粉的效率。

4 结 论

在温室水培条件下,新疆杨花粉母细胞完成减数分裂历时约4 d,且存在明显的不同步性。利用浓度为50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 赤霉素于花粉母细胞、第一次减数分裂以及第二次减数分裂时期分别对新疆杨雄花芽进行喷洒处理,不同处理组合均可获得一定比例的 $2n$ 花粉,说明利用赤霉素处理诱导新疆杨获得 $2n$ 花粉是可行的。其中以50 $\mu\text{mol/L}$ 赤霉素于第二次减数分裂时期喷施处理7次为最佳处理组合,可以获得8.83%的 $2n$ 花粉。在最佳处理组合条件下,新疆杨雄花芽经赤霉素喷洒处理可导致减数分裂末期II辐射状微管产生部分缺失,致使相邻子核间胞质分裂失败,从而产生核复原现象,形成三分体,进而产生 $2n$ 花粉。

参 考 文 献

- [1] Soltis D E, Albert V A, Leebens-Mack J, et al. Polyploidy and angiosperm diversification[J]. *American Journal of Botany*, 2009, 96(1): 336–348.
- [2] 李云, 朱之悌, 田砚亭, 等. 秋水仙碱处理白杨雌花芽培育三倍体植株的研究[J]. *林业科学*, 2001, 37(5): 68–74.
Li Y, Zhu Z T, Tian Y T, et al. Studies on obtaining triploids by colchicine treating female flower buds of white poplar[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2001, 37(5): 68–74.
- [3] 李艳华. 白杨雌配子染色体加倍技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2007.
- Li Y H. Chromosome doubling of female gametes in white poplars[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2007.
- [4] 康向阳, 张平冬, 高鹏, 等. 秋水仙碱诱导白杨三倍体新途径的发现[J]. *北京林业大学学报*, 2004, 26(1): 1–4.
Kang X Y, Zhang P D, Gao P, et al. Discovery of a new way of poplar triploids induced with colchicine after pollination[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2004, 26(1): 1–4.
- [5] Li D L, Kang X Y, Chen H W, et al. Induction of diploid eggs with colchicine during embryo sac development in *Populus*[J]. *Silvae Genetica*, 2010, 59(1–6): 40–48.
- [6] 王君, 康向阳, 石乐, 等. 理化处理诱导合子染色体加倍选育青杨派杂种四倍体[J]. *北京林业大学学报*, 2010, 32(5): 63–66.
Wang J, Kang X Y, Shi L, et al. Tetraploid induction of *Populus* hybrid in section *Tacamahaca* through zygotic chromosome doubling with physical and chemical treatments[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2010, 32(5): 63–66.
- [7] Cai X, Kang X Y. In vitro tetraploid induction from leaf explants of *Populus pseudo-simonii* Kitag[J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(9): 1771–1778.
- [8] Xu C P, Huang Z, Liao T, et al. In vitro tetraploid plants regeneration from leaf explants of multiple genotypes in *Populus*[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2016, 125(1): 1–9.
- [9] Ewald D, Ulrich K, Naujoks G, et al. Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids in vitro[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2009, 99(3): 353–357.
- [10] 张焕玲, 李俊红, 李周歧. 秋水仙素处理杜仲种子诱导多倍体的研究[J]. *西北林学院学报*, 2008, 23(1): 78–81.
Zhang H L, Li J H, Li Z Q. Studies on polyploid induction in vitro of *Eucommia ulmoides* Oliv.[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2008, 23(1): 78–81.
- [11] Yang J, Wang J, Liu Z, et al. Megaspore chromosome doubling in *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake induced by colchicine treatment to produce triploids[J]. *Forests*, 2018, 9(11): 728.
- [12] Zhao C G, Tian M D, Li Y, et al. Slow-growing pollen-tube of colchicine-induced $2n$ pollen responsible for low triploid production rate in *Populus*[J]. *Euphytica*, 2017, 213(4): 94.
- [13] Tian M D, Zhang Y, Liu Y, et al. High temperature exposure did not affect induced $2n$ pollen viability in *Populus*[J]. *Plant Cell & Environment*, 2018, 41(6): 1383–1393.
- [14] 高鹏. 杜仲配子与合子染色体加倍技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2006.
Gao P. Gamete and zygote chromosome doubling of *Eucommia ulmoides* Oliv.[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2006.
- [15] Yang J, Yao P Q, Li Y, et al. Induction of $2n$ pollen with colchicine during microsporogenesis in *Eucalyptus*[J]. *Euphytica*, 2016, 210(1): 69–78.
- [16] 耿喜宁, 任勇谕, 韩志强, 等. 高温诱导大孢子染色体加倍选育毛白杨杂种三倍体[J]. *北京林业大学学报*, 2018, 40(11): 12–18.
Geng X N, Ren Y Y, Han Z Q, et al. Production of hybrid

- triploids via inducing chromosome doubling of megaspore with high temperature treatment in *Leuce poplar*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2018, 40(11): 12–18.
- [17] 康宁, 白凤莹, 张平冬, 等. 高温诱导胚囊染色体加倍获得毛白杨杂种三倍体[J]. 北京林业大学学报, 2015, 37(2): 79–86.
- Kang N, Bai F Y, Zhang P D, et al. Inducing chromosome doubling of embryo sac in *Populus tomentosa* with high temperature exposure for hybrid triploids[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2015, 37(2): 79–86.
- [18] 王君. 青杨派树种多倍体诱导技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2009.
- Wang J. Techniques of polyploid induction in *Populus* spp. (Section *Tacamahaca*)[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2009.
- [19] 李云, 朱之悌, 田砚亭, 等. 极端温度处理白杨雌花芽培育三倍体植株的研究[J]. 北京林业大学学报, 2000, 22(5): 7–12.
- Li Y, Zhu Z T, Tian Y T, et al. Obtaining triploids by high and low temperature treating female flower buds of white poplar[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2000, 22(5): 7–12.
- [20] Li Y, Wang Y, Wang P Q, et al. Induction of unreduced megaspores in *Eucommia ulmoides* by high temperature treatment during megasporogenesis[J]. *Euphytica*, 2016, 212(3): 515–524.
- [21] 杨珺. 桉树生殖生物学基础与染色体加倍技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2015.
- Yang J. Reproductive biology and techniques of chromosome doubling in *Eucalyptus*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2015.
- [22] 康向阳, 朱之悌, 张志毅. 高温诱导白杨 2n 花粉有效处理时期的研究[J]. 北京林业大学学报, 2000, 22(3): 1–4.
- Kang X Y, Zhu Z T, Zhang Z Y. Suitable period of high temperature treatment for 2n pollen of *Populus tomentosa* × *P. bolleana*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2000, 22(3): 1–4.
- [23] 鲁敏. 响叶杨三倍体和四倍体诱导技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
- Lu M. Techniques of triploid and tetraploid induction in *Populus adenopoda* Maxim.[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2013.
- [24] 张磊, 王君, 索玉静, 等. 高温诱导银白杨花粉染色体加倍研究[J]. 核农学报, 2010, 24(6): 1158–1165.
- Zhang L, Wang J, Suo Y J, et al. Pollen chromosome doubling under high temperature in *Populus alba* L.[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2010, 24(6): 1158–1165.
- [25] 田梦迪, 李燕杰, 张平冬, 等. 高温诱导银灰杨花粉染色体加倍创制杂种三倍体[J]. 林业科学, 2018, 54(3): 39–47.
- Tian M D, Li Y J, Zhang P D, et al. Pollen chromosome doubling induced by high temperature exposure to produce hybrid triploids in *Populus canescens*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2018, 54(3): 39–47.
- [26] 李燕杰. 高温诱导银灰杨产生 2n 花粉的细胞及分子机制[D]. 北京: 北京林业大学, 2017.
- Li Y J. Cytological and molecular mechanism of 2n pollen production induced by high temperature in *Populus canescens*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2017.
- [27] Claeys H, de Bodt S, Inzé D. Gibberellins and DELLAs: central nodes in growth regulatory networks[J]. *Trends in Plant Science*, 2014, 19: 231–239.
- [28] Davière J M, Achard P. A pivotal role of DELLAs in regulating multiple hormone signals[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9: 10–20.
- [29] Debeaujon I, Koornneef M. Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid[J]. *Plant Physiology*, 2000, 122: 415–424.
- [30] Xia X C, Hu Q Q, Li W, et al. Cotton (*Gossypium hirsutum*) JAZ3 and SLR1 function in jasmonate and gibberellin mediated epidermal cell differentiation and elongation[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2018, 133: 249–262.
- [31] Sakata T, Oda S, Tsunaga Y, et al. Reduction of gibberellin by low temperature disrupts pollen development in rice[J]. *Plant Physiology*, 2014, 164: 2011–2019.
- [32] Plackett A R, Ferguson A C, Powers S J, et al. DELLA activity is required for successful pollen development in the Columbia ecotype of *Arabidopsis*[J]. *New Phytologist*, 2014, 201: 825–836.
- [33] Liu B, de Storme N, Geelen D. Gibberellin induces diploid pollen formation by interfering with meiotic cytokinesis[J]. *Plant Physiology*, 2017, 173: 338–353.
- [34] Shamina N V. Formation of division spindles in higher plant meiosis[J]. *Cell Biology International*, 2005, 29(4): 307–318.
- [35] Brown R C, Lemmon B E. The cytoskeleton and polarization during pollen development in *Carex blanda* (Cyperaceae)[J]. *American Journal of Botany*, 2000, 87: 1–11.
- [36] Brown R C, Lemmon B E. Microtubules associated with simultaneous cytokinesis of coenocytic microsporocytes[J]. *American Journal of Botany*, 1988, 75(12): 1848–1856.
- [37] Zhang Z H, Kang X Y. Cytological characteristics of numerically unreduced pollen production in *Populus tomentosa* Carr.[J]. *Euphytica*, 2010, 173: 151–159.
- [38] Bajer A. Cine-micrographic studies on dicentric chromosomes[J]. *Chromosoma*, 1965, 15(5): 630–651.
- [39] Orjeda G, Freyre R, Iwanaga M. Production of 2n pollen in diploid *Ipomoea trifida*, a putative wild ancestor of sweet potato[J]. *Journal of Heredity*, 1990, 81(6): 462–467.
- [40] Brown R C, Lemmon B E. Control of division plane in normal and griseofulvin-treated microsporocytes of *Magnolia*[J]. *Journal of Cell Science*, 1992, 103: 1031–1038.
- [41] 盛承发, 李为争, 宣维健. 昆虫学百分率差异显著性统计分析的简易计算方法[J]. 昆虫知识, 2006, 43(4): 574–576.
- Sheng C F, Li W Z, Xuan W J. A method of statistical tests of differences between percentages in entomological researches[J]. *Journal of Applied Entomology*, 2006, 43(4): 574–576.
- [42] 康向阳, 朱之悌, 张志毅. 毛白杨花粉母细胞减数分裂及其进程的研究[J]. 北京林业大学学报, 2000, 22(6): 5–7.
- Kang X Y, Zhu Z T, Zhang Z Y. Meiosis and its stages of pollen

- mother cells in Chinese white poplar[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2000, 22(6): 5–7.
- [43] 王君, 康向阳, 李代丽, 等. 通辽杨花粉母细胞减数分裂及其染色体行为研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(11): 2231–2238.
- Wang J, Kang X Y, Li D L, et al. Meiosis and chromosome behavior of pollen mother cell in *Populus simon* Carr. × *P. nigra* L. ‘Tongliao’[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(11): 2231–2238.
- [44] 鲁敏, 王君, 王旭军, 等. 响叶杨小孢子母细胞减数分裂及染色体行为的研究[J]. 植物科学学报, 2011, 29(2): 171–177.
- Lu M, Wang J, Wang X J, et al. Meiosis and chromosome behavior of microsporocytes in *Populus adenopoda* Maxim.[J]. Plant Science Journal, 2011, 29(2): 171–177.
- [45] 辛昊阳, 刘帅, 刘光欣, 等. 美洲黑杨小孢子母细胞减数分裂进程与花芽及花药外部形态相关性研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2016, 40(2): 48–52.
- Xin H Y, Liu S, Liu G X, et al. Relationship between the meiosis processes of microsporocytes and morphology of male flower buds and anthers in *Populus deltoides* March[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2016, 40(2): 48–52.
- [46] Zhang P D, Kang X Y. Occurrence and cytological mechanism of numerically unreduced pollen in diploid *Populus euphratica*[J]. Silvae Genetica, 2013, 62(6): 285–291.
- [47] Harder L D, Thomson J D. Evolutionary options for maximizing pollen dispersal of animal pollinated plants[J]. The American Naturalist, 1989, 133(3): 323–344.
- [48] 李赞, 郭倩, 王君, 等. 秋水仙碱诱导银白杨花粉染色体加倍及其细胞学效应研究[J]. 核农学报, 2014, 28(5): 1749–1756.
- Li Y, Guo Q, Wang J, et al. Colchicine-induced pollen chromosome doubling and its cytological effects in *Populus alba* L.[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2014, 28(5): 1749–1756.
- [49] Zhou Q, Wu J, Sang Y R, et al. Effects of colchicine on *Populus canescens* ectexine structure and $2n$ pollen production[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 295.
- [50] 张平冬, 康向阳. 胡杨小孢子发生及微管骨架变化与异常研究[J]. 西北植物学报, 2013, 33(11): 2166–2171.
- Zhang P D, Kang X Y. Organization of microtubule and its abnormalities during microsporogenesis in *Populus euphratica*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2013, 33(11): 2166–2171.

(责任编辑 范娟 赵田芸
责任编辑 康向阳)