

DOI:10.12171/j.1000-1522.20190363

秋水仙碱处理诱导银灰杨 2n 花粉与杂种三倍体创制

周 晴 吴 剑 桑亚茹 赵征洋 刘美芹 张平冬

(林木育种国家工程实验室, 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要:【目的】为创制银灰杨杂种三倍体新种质, 研究完善银灰杨三倍体育种技术体系, 筛选生长迅速、抗逆性强的银灰杨新品种。【方法】本研究以银灰杨、河北杨以及银腺杨为试验材料, 在优化秋水仙碱诱导银灰杨花粉染色体加倍技术条件的基础上, 开展了秋水仙碱注射处理对 2n 花粉粒表面结构的影响以及杂交创制杂种三倍体的研究。【结果】减数分裂时期、注射次数、减数分裂时期与注射次数的交互效应均对 2n 花粉诱导率具有极显著影响。利用 0.5% 的秋水仙碱溶液对发育至粗线期的花粉母细胞进行 11 次注射处理是秋水仙碱诱导银灰杨花粉染色体加倍的最佳处理组合, 2n 花粉平均诱导率最高可达(30.27 ± 8.69)%。与天然 2n 花粉粒相比, 秋水仙碱诱导型 2n 花粉粒表面结构出现了明显的裂沟, 说明秋水仙碱注射处理对 2n 花粉花粉壁形成具有一定的影响。选取含有一定 2n 花粉比例的花粉, 分别与河北杨、银腺杨雌配子进行授粉杂交, 共收获杂种苗木 4 955 株, 检测出三倍体 5 株, 其中, 2 株三倍体来源于河北杨 × 银灰杨的杂交组合; 另 3 株三倍体来源于银腺杨 × 银灰杨的杂交组合。【结论】秋水仙碱能高效诱导银灰杨花粉染色体加倍并获得 2n 花粉, 但是注射会影响 2n 花粉花粉壁的形成, 使得 2n 花粉粒表面结构产生裂沟。秋水仙碱诱导的 2n 花粉可以用于授粉杂交, 成功获得杂种多倍体植株。

关键词: 银灰杨; 秋水仙碱; 2n 花粉诱导; 花粉粒表面结构; 三倍体

中图分类号: S722.3⁺5; S792.11 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2020)03-0119-08

引文格式: 周晴, 吴剑, 桑亚茹, 等. 秋水仙碱处理诱导银灰杨 2n 花粉与杂种三倍体创制 [J]. 北京林业大学学报, 2020, 42(3): 119-126. Zhou Qing, Wu Jian, Sang Yaru, et al. Pollen chromosome doubling induced by colchicine treatment and creation of hybrid triploids in *Populus canescens* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2020, 42(3): 119-126.

Pollen chromosome doubling induced by colchicine treatment and creation of hybrid triploids in *Populus canescens*

Zhou Qing Wu Jian Sang Yaru Zhao Zhengyang Liu Meiqin Zhang Pingdong

(National Engineering Laboratory for Forest Tree Breeding, School of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] Improving the technical system of triploid breeding to generate new triploid germplasm can serve for developing new varieties with fast growing and higher resistance in *P. canescens*. [Method] Based on the optimization of technical conditions for inducing pollen chromosome doubling, effects of colchicine on induced 2n pollen of surface structure and triploid production by crossing induced 2n pollen were conducted by taking *P. canescens*, *P. hopeiensis* and *P. alba* × *P. glandulosa* as experimental materials. [Result] The results showed that meiotic stages, injection times and the interaction between meiotic stage and injection time had highly significant effects on frequency of colchicine-induced 2n pollen. The optimum treatment combination to induce pollen chromosome doubling was to inject 11 times with 0.5% colchicine solution when pollen mother cells were at pachytene. The highest mean frequency of

收稿日期: 2019-09-19 修回日期: 2019-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570646)。

第一作者: 周晴。主要研究方向: 林木细胞遗传与细胞工程。Email: 876034493@qq.com 地址: 100083 北京市海淀区学院路清华东路 35 号。

责任作者: 张平冬, 副教授, 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>

colchicine-induced 2n pollen was $(30.27 \pm 8.69)\%$. Compared with natural 2n pollen, some narrow furrows on the surface of the colchicine-induced 2n pollen were observed, suggesting that colchicine did, to some extent, affect the formation of cell wall of induced 2n pollen. 4 955 hybrid offsprings were obtained by crossing induced 2n pollen with female gametes of *P. hopeiensis* and *P. alba* × *P. glandulosa*, and five real triploids were detected by flow cytometric analysis and somatic chromosome counting. Among the five triploids, two triploids were derived from the cross combination between *P. hopeiensis* and *P. canescens*, and three triploids were derived from the cross combination between *P. alba* × *P. glandulosa* and *P. canescens*. [Conclusion] Colchicine could not only induce pollen chromosome doubling to produce 2n pollen but also affect the formation of cell wall of colchicine-induced 2n pollen and resulted in narrow furrows on ectexine structure in *P. canescens*. Hybrid polyploid offsprings were successfully obtained by crossing colchicine-induced 2n pollen.

Key words: *Populus canescens*; colchicine; induction of 2n pollen; surface structure of 2n pollen; triploid

银灰杨(*Populus canescens*)是我国新疆额尔齐斯河流域的重要建群树种,其具有树干通直,耐干旱,耐盐碱,抗病虫害,根孽能力强等优良特性,是西部地区生态防护林建设的理想树种^[1]。多数学者认为,银灰杨是银白杨(*P. alba*)与山杨(*P. davidiana*)的天然杂种,其种内遗传多样性丰富,杂交可配性好,具有巨大的遗传改良潜能^[2]。李天权等^[3]以毛新杨(*P. tomentosa* × *P. bolleana*)为母本,银灰杨为父本,开展了正反杂交育种研究,选育出6个毛新杨 × 银灰杨的杂种无性系。田菊等^[4]对毛新杨 × 银灰杨杂种雄株无性系的减数分裂染色体异常行为、花粉形态以及花粉发育情况进行了系统观察。有关银灰杨三倍体育种研究的报道甚少。田梦迪等^[5]开展了高温处理诱导银灰杨花粉染色体加倍研究,并获得了42株三倍体。但这42株三倍体均来源于SDR型2n花粉与单倍性雌配子杂交^[6]。由于SDR型2n配子传递亲本的杂合度大约为FDR型2n配子的一半,致使其在育种中的利用价值相对较低^[7-8]。因此,利用物理或化学诱变剂处理正在分裂的性母细胞,获得利用价值高的FDR型2n配子,可能是银灰杨三倍体育种必由之路。

秋水仙碱作为一种重要的纺锤体微管蛋白抑制剂,可通过抑制细胞分裂中期纺锤体的形成,使复制后的染色体不发生分离而被保留在同一细胞内,从而形成多倍体细胞。如果秋水仙碱作用于性母细胞第一次减数分裂的中期纺锤体,则可导致FDR型2n配子的产生。到目前为止,秋水仙碱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.)^[9-15]、刺槐(*Robinia pseudoacacia*)^[16]、杜仲(*Eucommia ulmoides*)^[17]、尾叶桉(*Eucalyptus urophylla*)^[18]等林木三倍体与四倍体新种质。秋水仙碱也用于诱导杨树^[19-20]、杜仲^[21]以及桉树^[22]等树

种的花粉染色体加倍研究,并获得20.0%~88.0%的2n花粉。但由于树种特性各异,因此影响2n花粉诱导的关键技术环节,如秋水仙碱浓度、有效时期、持续处理时间以及注射次数等亦不相同。因此,针对某一具体树种而言,开展秋水仙碱人工诱导2n花粉技术条件优化研究显得很有必要。为完善银灰杨三倍体育种技术体系,本文就优化秋水仙碱诱导银灰杨花粉染色体加倍技术条件、秋水仙碱对诱导型2n花粉表面结构的影响、银灰杨杂种三倍体创制等问题进行了研究。研究结果为选育银灰杨三倍体新品种,推动林木三倍体育种理论和技术进步奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所选用的银灰杨雄花枝采自于新疆阿勒泰市哈巴河天然林中的优良单株,河北杨(*P. hopeiensis*)雌花枝采自于内蒙古自治区包头市种苗站,银腺杨(*P. alba* × *P. glandulosa*)雌花枝采自于山东省聊城市冠县苗圃。

1.2 研究方法

1.2.1 秋水仙碱诱导银灰杨花粉染色体加倍的技术条件优化

将银灰杨雄花枝分批次水培于北京林业大学温室(10~20℃)。每隔2h,随机采集2~3个花芽,经卡诺固定液固定后,利用醋酸洋红压片法观察花芽减数分裂进程。当观察到大部分花粉母细胞进入细线期、粗线期、双线期、终变期以及中期I时,使用浓度为0.5%的秋水仙碱溶液对花芽分别进行0、3、5、7、9和11次注射处理,每次用针管注射1mL秋水仙碱溶液至有水珠溢出花芽表面,每次注射时间间隔2h,并对各处理组合进行编号记录。处理结束后,银灰杨雄花枝继续水培于温室至花药完全开裂

并散粉,分别收集不同处理组合的花粉,保存于干燥的离心管中,放置于 4 ℃ 冰箱中储存备用。

1.2.2 2n 花粉发生频率的统计

用镊子夹取少量不同处理组合的花粉,均匀地洒至滴有醋酸洋红的载玻片上制作临时涂片,并在 Olympus BX-51 光学显微镜下随机选取 5 个视野观察和拍照,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^[23],统计每个视野中总花粉粒数与 2n 花粉粒的数量,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 200~300 个花粉粒。

$$P = \frac{n}{N} \times 100\%$$

式中: P 为 2n 花粉发生频率, n 为 2n 花粉数目, N 为观察花粉粒总数。

1.2.3 花粉粒表面结构的观察

取两块经无水乙醇清洁后的圆形电极板,在每一个圆形电极板上粘上约 1 cm³ 见方的 3 块导电胶并做好标记,分别夹取少量对照组和粗线期注射 5、11 次的花粉洒在每一块双面胶上,用解剖针均匀推开后在离子溅射仪上进行喷金处理。随后,打开 S-3400 型日立扫描电子显微镜,对电子枪和样品室充气后放入样品,合上仓门并抽真空。当显示工作距离为 10 mm 后,对每个处理组合进行观察并对花粉粒的形态与外壁纹饰进行拍照。

1.2.4 授粉杂交与播种育苗

待水培于温室的河北杨雌花芽与银腺杨雌花芽柱头开裂进入可授期后,利用毛笔分别蘸取不同处理组合的银灰杨花粉,均匀地涂抹至柱头进行授粉杂交。授粉后的河北杨雌花枝与银腺杨雌花枝继续水培于温室至蒴果成熟开裂,套袋收集种子。

将草炭土:蛭石:珍珠岩以 3:1:1 的比例(体积比)混合均匀后,装至 50 孔规格的穴盘中(54 cm × 28 cm × 10 cm)。用自来水将基质浇透后,将种子点播于穴盘,每孔点播 1~2 粒种子,然后再覆盖一薄层基质。播种结束后,将穴盘置于 60 cm × 40 cm 规格的托盘内,并用插签做好标记,置于温室中萌发和生长。

1.2.5 杂交子代倍性检测

待幼苗生长至 10 cm 左右时,首先进行流式细胞仪检测,确定所有杂交子代幼苗的倍性水平。具体操作步骤:采取 0.5 g 左右新鲜的幼嫩叶片,放置于培养皿中,加入 1 mL 的细胞核裂解液^[24],用刀片切碎叶片后经滤网过滤,弃杂质,加入 5 μg/mL 的 DAPI 染色液 50 μL,染色 5 min 后,使用 Quanta SC

流式细胞仪进行倍性检测。

经流式细胞仪检测初步确定为三倍体植株后,进一步利用染色体压片法进行染色体计数,以确定其倍性水平。染色体计数的具体操作步骤为:采集取待检测植株的茎尖组织,投入对二氯苯饱和溶液中预处理 2~3 h 后,再转入卡诺固定液中,于 4 ℃ 冰箱中固定 24 h。将固定后的茎尖材料用蒸馏水冲洗 2~3 次,每次 10 min。用滤纸吸干材料表面水分后,置于浓盐酸中解离 25 min,再用蒸馏水洗涤 2 次(每次 10 min),转入浓度为 45% 的乙酸中软化待用。取少量软化后的茎尖材料置于在载玻片上,滴加 1 滴改良的卡宝品红染色液,用镊子夹碎后进行压片,并利用 Olympus BX 51 光学显微镜进行染色体观察和照相。

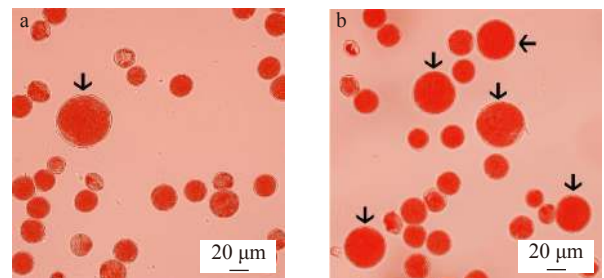
1.2.6 数据分析

将 2n 花粉频率等百分比数据经倒数转换后,利用 SPSS 统计软件(18.0 版本)进行方差分析与多重比较。

2 结果与分析

2.1 秋水仙碱诱导银灰杨产生 2n 花粉的技术条件优化

银灰杨雄花芽经 0.5% 的秋水仙碱注射处理后,部分花芽因受秋水仙碱的毒性作用而提早脱落或干枯死亡,未收集到花粉。存活的花芽于温室中继续水培至花药成熟开裂后,均收集到了一定量的花粉。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,可观察到大部分花粉粒被染成深红色,且着色比较均匀,表明该花粉粒具有较好的生活力。但是,不论是对照组还是处理组,均有少量着色浅的败育花粉粒存在(图 1)。通过花粉粒形态比较可以发现,银灰杨对照组花粉中存在低频率的天然 2n 花粉(图 1a),其发生频率为(2.08 ± 0.40)%。



a. 对照组中的天然 2n 花粉(箭头); b. 秋水仙碱诱导 2n 型花粉(箭头)。标尺 = 20 μm。a, natural 2n pollen in control group (arrow); b, colchicine-induced 2n pollen in treatments (arrow). Bar = 20 μm.

图 1 银灰杨天然 2n 花粉(a)与秋水仙碱诱导型 2n 花粉(b)

Fig. 1 Natural 2n pollen (a) and colchicine-induced 2n pollen (b) in *Populus canescens*

秋水仙碱各处理组合的花粉中,均观察到一定频率的2n花粉(图1b)。由图2所示,不同处理组合之间2n花粉诱导率存在明显差异,其中以粗线期注射11次的诱导效果最好,平均2n花粉诱导率达到 $(30.27 \pm 8.69)\%$;中期I注射3次的诱导效果最差,平均2n花粉诱导率为 $(2.75 \pm 0.43)\%$ 。不同处理组合2n花粉诱导率的差异显著性分析结果表明,减数分裂时期、注射次数以及减数分裂时期与注射次数的交互效应均对银灰杨2n花粉的诱导率具有极显著影响(表1)。减数分裂时期和注射次数的多重性比较结果显示(表2),粗线期的2n花粉诱导率显著高于细线期,双线期以及中期I;秋水仙碱注射11次的2n花粉诱导率显著高于其他注射次数。因此,当花粉母细胞发育至粗线期时,利用0.5%的秋水仙碱进行11次注射是诱导银灰杨花粉染色体加倍获得2n花粉的最优处理组合。

2.2 秋水仙碱处理对银灰杨花粉粒表面结构的影响

银灰杨对照组、粗线期注射5次以及粗线期注射11次所获得花粉的电镜扫描结果如图3所示。从图3可以看出,无论是对照组还是处理组,银灰杨花粉粒表面均存在许多凹陷,并非呈圆球形。此外,对照组(图3a)、粗线期注射5次(图3b)以及粗线期注射11次(图3c)处理组合的花粉中均可观察到2n花粉的存在。不论是在低倍镜下还是高倍镜下,对照组(图3d、g)、粗线期注射5次(图3e、h)以及粗线期注射11次(图3f、i)处理组合中的单倍性花粉粒

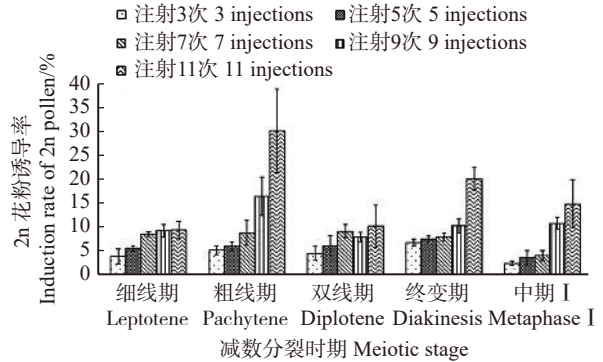


图2 不同处理组合的银灰杨2n花粉诱导率

Fig. 2 Induction rates of colchicine-induced 2n pollen in *P. canescens* under different treatments

表面结构均无明显差异,其表面颗粒状纹饰分布均匀,且无明显裂痕。低倍镜下对照组(图3j)、粗线期注射5次(图3k)以及粗线期注射11次(图3l)处理组合的2n花粉粒表面纹饰亦无明显变化,但随着镜头倍数的提高,花粉粒表面纹饰逐渐清晰。与天然2n花粉粒(图3m)相比,粗线期注射5次(图3n)以及粗线期注射11次(图3o)处理组合的2n花粉粒表面颗粒分布不均匀,出现裂痕,且具有明显的裂沟。这说明秋水仙碱处理可导致银灰杨诱导型2n花粉粒表面结构发生变化。

2.3 银灰杨2n花粉与银腺杨、河北杨雌配子杂交创制三倍体

选取花粉产量大且含有一定比例2n花粉的12个处理组合,分别与河北杨、银腺杨雌株进行授

表1 不同处理组合银灰杨2n花粉诱导率的方差分析

Tab. 1 Variance analysis on induction rates of colchicine-induced 2n pollen in *P. canescens* under different treatments

变异来源 Source of variation	df	MS	F	P
减数分裂时期 Meiotic stage	4	251.696	4.801**	0.009
注射次数 Injection time	4	652.650	12.449**	0.000
减数分裂时期 × 注射次数 Meiotic stage × injection time	16	52.427	3.006**	0.002
误差 Error	50	17.444		

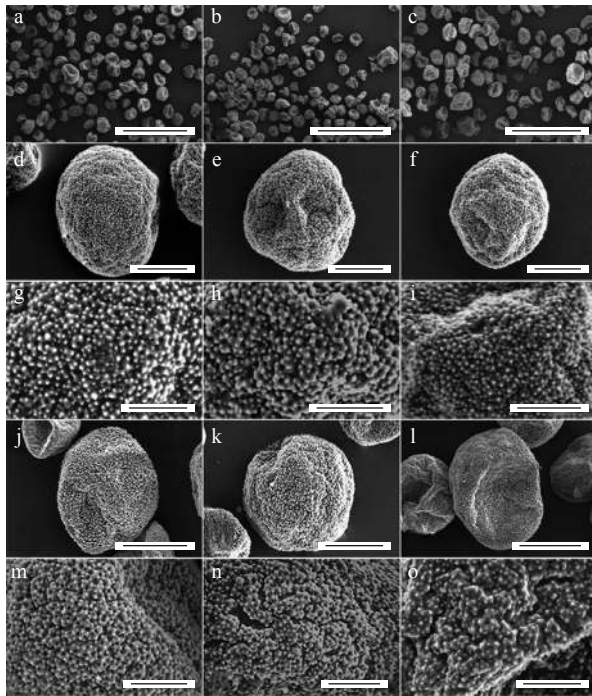
注: ** 代表差异极显著($P < 0.01$)。Note: ** represents highly significant differences ($P < 0.01$).

表2 不同减数分裂时期和不同注射次数银灰杨2n花粉诱导率的多重比较

Tab. 2 Multiple comparisons in induction rates of 2n pollen under different meiotic stages and different injection times in *P. canescens*

减数分裂时期 Meiotic stage	平均2n花粉诱导率 Average induction rate of 2n pollen/%	注射次数 Injection time	平均2n花粉诱导率 Average induction rate of 2n pollen/%
细线期 Leptotene	$7.57 \pm 2.51b$	3	$4.83 \pm 1.72d$
粗线期 Pachytene	$13.54 \pm 10.30a$	5	$6.03 \pm 1.70cd$
双线期 Diplotene	$7.84 \pm 2.921b$	7	$7.94 \pm 2.28bc$
终变期 Diakinesis	$10.77 \pm 5.23ab$	9	$11.18 \pm 3.51b$
中期 I Metaphase I	$7.42 \pm 5.39b$	11	$17.17 \pm 8.94a$

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



a. 对照组花粉粒形态; b. 粗线期注射 5 次花粉粒形态; c. 粗线期注射 11 次花粉粒形态; d. 对照组单倍性花粉粒表面结构; e. 粗线期注射 5 次花粉粒表面结构; f. 粗线期注射 11 次花粉粒表面结构; g. 对照组单倍性花粉粒表面沉积; h. 粗线期注射 5 次花粉粒表面沉积; i. 粗线期注射 11 次花粉粒表面沉积; j. 天然 2n 花粉粒表面结构; k. 粗线期注射 5 次 2n 花粉粒表面结构; l. 粗线期注射 11 次 2n 花粉粒表面结构; m. 天然 2n 花粉粒表面沉积; n. 粗线期注射 5 次 2n 花粉粒表面沉积; o. 粗线期注射 11 次 2n 花粉粒表面沉积。标尺 = 100 μm (a~c), 10 μm (d~f), 20 μm (j~l), 5 μm (g~i; m~o)。a, morphology of pollen grains in control group; b, morphology of pollen grains derived from the treatment with 5 injections at pachytene; c, morphology of pollen grains derived from the treatment with 11 injections at pachytene; d, ectexine structure of haploid pollen grains in control group; e, ectexine structure of haploid pollen grains derived from the treatment with 5 injections at pachytene; f, ectexine structure of haploid pollen grains derived from the treatment with 11 injections at pachytene; g, ectexine deposition of haploid pollen grains in control group; h, ectexine deposition of haploid pollen grains derived from the treatment with 5 injections at pachytene; i, ectexine deposition of haploid pollen grains derived from the treatment with 11 injections at pachytene; j, ectexine structure of natural 2n pollen grains; k, ectexine structure of 2n pollen grains derived from the treatment with 5 injections at pachytene; l, ectexine structure of natural 2n pollen grains derived from the treatment with 11 injections at pachytene; m, ectexine deposition of natural 2n pollen grains; n, ectexine deposition of 2n pollen grains derived from the treatment with 5 injections at pachytene; o, ectexine deposition of 2n pollen grains derived from the treatment with 11 injections at pachytene; scale bar = 100 μm (a~c), 10 μm (d~f), 20 μm (j~l), 5 μm (g~i; m~o)。

图3 银灰杨单倍性花粉粒与 2n 花粉粒表面结构的电镜观察

Fig. 3 Scanning electron micrographs of haploid pollen grains and 2n pollen grains in *P. canescens*

粉杂交, 共收获种子 6 741 粒, 成苗 4 955 株(表 3)。其中, 245 粒种子来源于河北杨与银灰杨杂交组合, 成苗 76 株; 6 496 粒种子来源于河北杨与银灰杨杂交组合, 成苗 4 879 株。为了减少工作量, 提高流式

细胞仪检测的准确性, 本研究首先采用两株子代苗混合制样检测策略, 若测试结果出现两个峰值(图 4a), 则重新单独检测, 共筛选出 5 株疑似三倍体植株(图 4b)。进一步利用体细胞染色体计数法对 5 株疑似三倍体植株进行镜检确认, 对照二倍体植株的染色体数目为 38 条($2n = 2x = 38$)(图 4c), 三倍体植株的染色体数目为 57 条($2n = 3x = 57$)(图 4d), 说明 5 株疑似三倍体植株均为真正的三倍体。其中, 2 株三倍体来源于河北杨 \times 银灰杨的杂交组合, 另外 3 株三倍体来源于银腺杨 \times 银灰杨的杂交组合。对照组杂交子代未检测出三倍体, 说明天然 2n 花粉未参与受精过程。

由表 3 还可以看出, 不同比例的 2n 花粉与河北杨、银腺杨雌株授粉后, 三倍体得率介于 0% ~ 16.67% 之间变动, 平均三倍体得率仅为 2.35%。与参与授粉的 2n 花粉频率相比, 所有杂交组合的三倍体得率均远低于 2n 花粉频率, 说明授粉过程中 2n 花粉与单倍性花粉之间存在激烈的竞争, 且 2n 花粉的授粉竞争能力明显差于单倍性花粉。

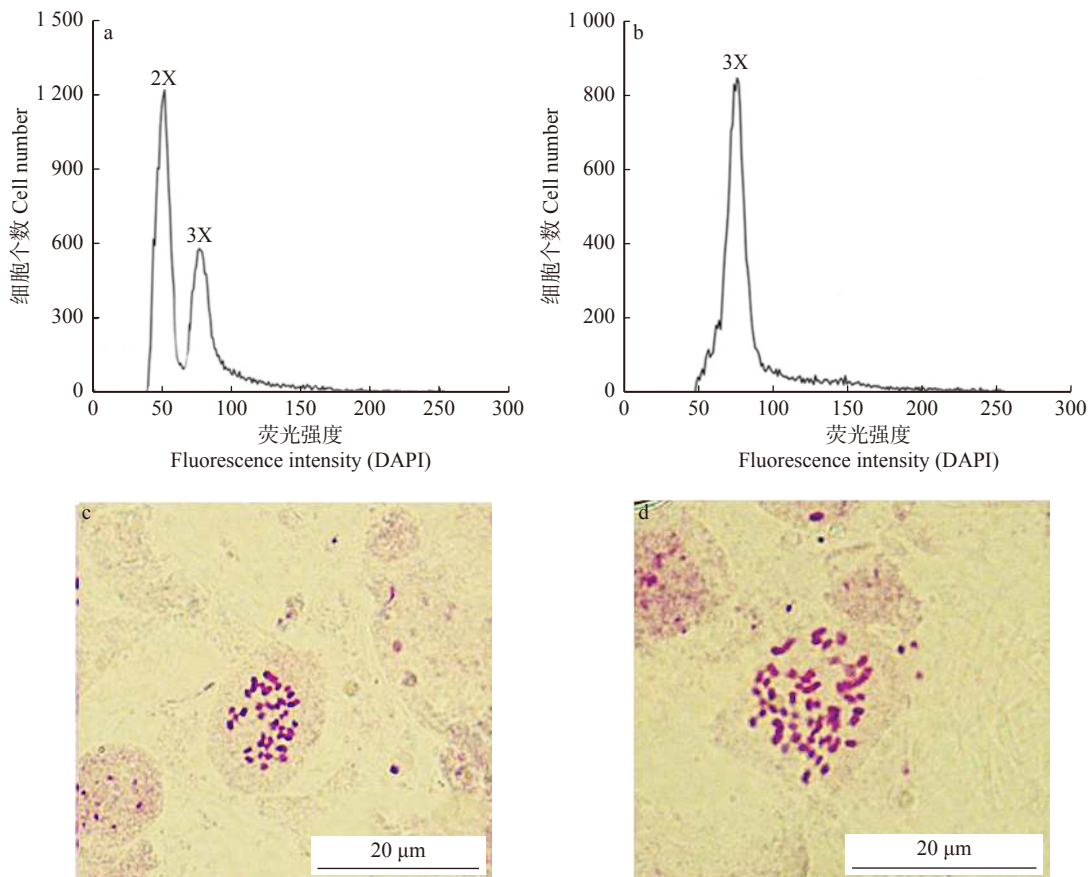
3 讨 论

自秋水仙碱被发现具有诱导植物细胞染色体加倍的功效以来, 已广泛用于诱导植物花粉染色体加倍选育三倍体的育种实践^[25]。当人工利用秋水仙碱诱导花粉母细胞染色体加倍获得 2n 花粉时, 花粉母细胞减数分裂时期, 秋水仙碱浓度以及注射次数等因素成为决定 2n 花粉能否成功诱导的关键^[26]。因此, 针对特定处理对象, 筛选适宜的秋水仙碱浓度、处理方式及关键时期进行有效处理, 是诱导获得高比例 2n 花粉的重要参数。康向阳^[27]对秋水仙碱诱导毛新杨花粉染色体加倍的有效处理时期开展了研究, 发现当花粉母细胞减数分裂由细线末期到终变期之前, 利用 0.5% 的秋水仙碱进行 3 ~ 5 次注射处理, 2n 花粉诱导率最高, 可达 88%。李开隆等^[28]以大青杨为材料, 开展 2n 花粉人工诱导试验时发现, 当雄花枝水培 4 d 时, 利用浓度为 0.3% 的秋水仙碱进行注射处理为最优技术组合, 2n 花粉诱导率为 10.9%。李赞等^[29]筛选出秋水仙碱诱导银白杨花粉染色体加倍的最佳处理组合是: 当花粉母细胞发育至细线末期到粗线期时, 利用 0.5% 的秋水仙碱进行 7 次注射处理, 其最高 2n 花粉比例可达 82.33%。据赵鑫闻等^[30]报道, 采用浓度为 0.5% 的秋水仙碱于粗线期进行注射处理是诱导美洲黑杨产生 2n 花粉的适宜技术条件, 2n 花粉的诱导为 35.5%。由此可见, 不同树种诱导 2n 花粉适宜技术条件组合亦不尽相同。即使在诱导技术条件优化的前提下, 不同

表3 银灰杨秋水仙碱诱导型 2n 花粉与河北杨、银腺杨雌配子杂交创制三倍体

Tab. 3 Crossing colchicine-induced 2n pollen in *P. canescens* with female gametes in *P. hopeiensis* and *P. alba* × *P. glandulosa* to produce triploids

序号 No.	母本 Female parent	2n花粉比率 Frequency of 2n pollen/%	种子数 Number of seeds	成苗数 Number of seedlings	三倍体数 Number of triploids	三倍体得率 Triploid production rate/%
1	河北杨 <i>P. hopeiensis</i>	30.27	38	6	1	16.67
2		20.36	33	9	1	11.11
3		16.70	64	21	0	0
4		15.11	31	16	0	0
5		11.03	52	20	0	0
6		10.53	27	4	0	0
7		9.05	912	610	2	0.33
8		8.76	1 027	864	1	0.12
9	银腺杨 <i>P. alba</i> × <i>P. glandulosa</i>	6.22	704	563	0	0
10		5.79	975	623	0	0
11		5.46	1 217	964	0	0
12		4.34	694	552	0	0
对照 Control		2.08	967	703	0	0
总计 Total			6 741	4 955	5	



a. 二倍体与三倍体混样流式分析; b. 三倍体流式分析; c. 二倍体染色体数目; d. 三倍体染色体数目。a, flow cytometric analysis of the mixed sample of diploid plant and triploid plant; b, flow cytometric analysis of the triploid plant; c, chromosome number of the diploid ($2n = 2x = 38$); d, chromosome number of the triploid ($2n = 3x = 57$).

图4 秋水仙碱诱导银灰杨花粉染色体加倍子代倍性分析

Fig. 4 Ploidy analysis of the offsprings derived from pollen chromosome doubling induced by colchicine

树种 2n 花粉诱导率也存在较大差异,可能与树种生物学特性以及同一花序不同花药内花粉母细胞发育不同步有关。本研究中,当银灰杨花粉母细胞发育到粗线期时,利用 0.5% 的秋水仙碱注射 11 次,可获得 30.27% 的 2n 花粉。由此可知,银灰杨花粉染色体加倍有效处理时期与同派树种毛新杨^[27]和银白杨^[29]相当,但 2n 花粉诱导率却低很多。究其原因,可能与以下两个方面密切相关。一是银灰杨同一花芽不同花药内花粉母细胞减数进程同步性差^[5];另一方面是当银灰杨花粉母细胞发育至粗线期前后时,花序已露出约 1/2,缺乏芽鳞包被,注射的秋水仙碱大部分溢出苞片而被蒸发,降低了秋水仙碱的处理效果。

高温是一种高效的物理诱变因素,已经广泛用于植物 2n 花粉诱导^[20,31]。有研究表明,利用 36 °C 持续处理正在减数分裂的玫瑰花,不但可以诱导玫瑰产生高频率的 2n 花粉,还会致使花粉粒表面结构受损,花粉粒表面纹饰出现裂沟,从而导致花粉生活力明显降低^[31]。另据 Tian 等^[20]报道,对处于减数分裂终变期的银灰杨雄花芽进行持续 6 h 的 38 °C 高温处理,可以诱导银灰杨产生 56.3% 的 2n 花粉,导致花粉产量明显下降,还会致使 2n 花粉表面出现明显的裂沟,但不会显著地影响 2n 花粉的萌发率。秋水仙碱作为一种有剧毒性的化学诱变剂,在诱导植物产生 2n 花粉方面的功能勿庸置疑。但秋水仙碱注射是否会导致诱导型 2n 花粉表面结构受损,从而降低 2n 花粉生活力的问题至今未见报道。本研究利用扫描电镜分别对单倍性花粉和秋水仙碱诱导产生的 2n 花粉表面结构进行了观察,发现秋水仙碱诱导型 2n 花粉表面纹饰出现了明显的裂沟,证实了秋水仙碱处理的确会对 2n 花粉表面结构产生影响。进一步利用不同诱导率的 2n 花粉与河北杨、银腺杨雌配子进行授粉杂交,获得了 4 955 株杂交子代。杂交子代经流式细胞仪检测和体细胞染色体计数确认,筛选出 5 株银灰杨杂种三倍体。但至于秋水仙碱处理对银灰杨 2n 花粉生活力的影响程度,还有待于利用花粉离体萌发实验进行证实。此外,由于本研究仅获得 5 株三倍体,因此未对 2n 花粉的遗传组成进行分析。

4 结 论

秋水仙碱诱导银灰杨花粉染色体加倍技术条件优化结果表明,减数分裂时期、注射次数、减数分裂时期与注射次数的交互效应均对 2n 花粉诱导率具有极显著影响。筛选出利用 0.5% 的秋水仙碱溶液对发育至粗线期的花粉母细胞进行 11 次注射处理

是秋水仙碱诱导银灰杨花粉染色体加倍的适宜处理组合,2n 花粉平均诱导率最高可达 $(30.27 \pm 8.69)\%$ 。与天然 2n 花粉粒相比,秋水仙碱诱导型 2n 花粉粒表面结构出现了明显的裂沟,表明秋水仙碱注射处理对 2n 花粉花粉壁形成具有一定的影响。选取产量大且 2n 花粉比例高的花粉,分别与河北杨、银腺杨雌株进行授粉杂交,共收获杂种苗木 4 955 株,检测出三倍体 5 株,其中,2 株三倍体来源于河北杨 × 银灰杨的杂交组合;另 3 株三倍体来源于银腺杨 × 银灰杨的杂交组合。本研究证实了秋水仙碱不但能诱导银灰杨花粉染色体加倍获得 2n 花粉,还会影响 2n 花粉花粉壁的形成,使 2n 花粉粒表面结构产生裂沟。

参 考 文 献

- [1] 徐秀琴. 银灰杨育种[J]. 中国林业, 2008(7A): 57.
Xu X Q. Breeding of *Populus canescens*[J]. Forestry of China, 2008(7A): 57.
- [2] 郑书星, 张建国, 段爱国, 等. 新疆阿尔泰地区白杨派 3 个树种半同胞家系子代遗传多样性分析[J]. 林业科学研究, 2013, 26(3): 366–372.
Zheng S X, Zhang J G, Duan A G, et al. The genetic diversity of half-sib family progenies of *Populus* (Section *Leuce*) in Altai of Xinjiang[J]. Forest Research, 2013, 26(3): 366–372.
- [3] 李天权, 朱之梯. 白杨派内杂交难易程度及杂交方式的研究[J]. 北京林业大学学报, 1989, 11(3): 54–59.
Li T Q, Zhu Z T. Study on difficulty of hybridization and patterns of crossing within *Leuce*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 1989, 11(3): 54–59.
- [4] 田菊, 牛新月, 铁英, 等. 毛新杨×银灰杨杂种花粉母细胞减数分裂及花粉形态[J]. 东北林业大学学报, 2018, 46(7): 33–37, 43.
Tian J, Niu X Y, Tie Y, et al. Meiosis of microsporocyte and morphology of pollen in hybrid of (*Populus tomentosa* × *P. bolleana*) × *P. canescens*[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2018, 46(7): 33–37, 43.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 董春波. 杨树同源重组特点及 2n 配子杂合性分析[D]. 北京: 北京林业大学, 2015.
Dong C B. Analysis of homologous recombination characteristics and 2n gamete heterozygosity in *Populus*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2015.

- [8] Xi X, Li D, Xu W, et al. 2n egg formation in *Populus × euramericana* (Dode) Guinier[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2012, 8(6): 1237–1245.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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/OL]. *Forests*, 2018, 9(11): 728 [2019–12–30]. <https://doi.org/10.3390/f9110728>.
- [19] 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/OL]. *Euphytica*, 2017, 213(4): 94 [2019–12–30]. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1881-9>.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Galbraith D W, Harkins K R, Maddox J M, et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues[J]. *Science*, 1983, 220: 1049–1051.
- [25] 谭德冠, 庄南生, 黄华孙. 林木多倍体诱导的研究进展[J]. *华南热带农业大学学报*, 2005, 11(1): 27–30.
Tan D G, Zhuang N S, Huang H S. Research advances in tree polyploid induction[J]. *Journal of South China University of Tropical Agriculture*, 2005, 11(1): 27–30.
- [26] 康向阳. 关于杨树多倍体育种的几点认识[J]. *北京林业大学学报*, 2016, 32(5): 149–153.
Kang X Y. Some understandings on polypliod breeding of poplars[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2016, 32(5): 149–153.
- [27] 康向阳, 朱之悌, 林慧斌. 杨树花粉染色体加倍有效处理时期的研究[J]. *林业科学*, 1999, 35(4): 21–24.
Kang X Y, Zhu Z T, Lin H B. Study on the effective treating period for pollen chromosome doubling of *Populus tomentosa* × *P. bolleana*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 1999, 35(4): 21–24.
- [28] 李开隆, 肖静, 刘桂丰, 等. 秋水仙素处理诱导大青杨 2n 花粉方法的优化[J]. *核农学报*, 2006, 20(4): 282–286.
Li K L, Xiao J, Liu G F, et al. Optimization of inducing 2n pollen grain of *Populus ussuriensis* by colchicines[J]. *Journal of Nuclear Agriculture Sciences*, 2006, 20(4): 282–286.
- [29] 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): 749–756.
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 Agriculture Sciences*, 2014, 28(5): 749–756.
- [30] 赵鑫闻, 彭儒胜, 纪纯阳, 等. 秋水仙碱诱导美洲黑杨花粉染色体加倍的研究[J]. *西部林业科学*, 2019, 48(1): 135–138.
Zhao X W, Peng R S, Ji C Y, et al. Inducing pollen chromosome doubling of *Populus deltoid* by colchicines[J]. *Journal of West China Forestry Science*, 2019, 48(1): 135–138.
- [31] Pécrix Y, Géraldine R, Hélène F, et al. Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp.[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(10): 3587–3597.

(责任编辑 范娟 崔艳红
责任编辑 卢孟柱)