

doi : 10. 16473/j. cnki. xblykx1972. 2019. 01. 023

秋水仙碱诱导美洲黑杨花粉染色体加倍的研究*

赵鑫闻, 彭儒胜, 纪纯阳, 梁德军
(辽宁省杨树研究所, 辽宁 盖州 115200)

摘要: 为提高美洲黑杨抗寒性, 多倍体育种是一条有效途径。本试验在掌握美洲黑杨花粉母细胞减数分裂进程的基础上, 采用二因素随机区组设计, 研究了美洲黑杨花粉染色体加倍的有效处理时期及有效处理浓度。结果表明: (1) 在花粉母细胞减数分裂中期 I 之前利用各浓度 (0.3%、0.5%、0.8%) 的秋水仙碱处理美洲黑杨雄花芽均能获得一定比例的 2n 花粉; (2) 利用 0.5% 的秋水仙碱在花粉母细胞减数分裂粗线期处理美洲黑杨雄花芽, 2n 花粉得率最高, 为 35.5%。本研究为美洲黑杨通过获取 2n 花粉途径进行多倍体育种奠定了基础。

关键词: 美洲黑杨; 减数分裂; 花粉染色体加倍; 秋水仙碱

中图分类号: S 792.11; S 722.3⁺⁵ **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-8246 (2019) 01-0135-04

Inducing Pollen Chromosome Doubling of *Populus deltoid* by Colchicines

ZHAO Xin-wen, PENG Ru-sheng, JI Chun-yang, LIANG De-jun
(Liaoning Provincial Institute of Poplar, Gaizhou Liaoning 115213, P. R. China)

Abstract: The technique of polyploid breeding is an efficient way to improve the resistance of *Populus deltoid*. The effective meiosis period and treating concentration of pollen chromosome doubling were studied by the two-factor randomized block design, based on mastering the meiosis law of microsporocyte of *P. deltoid*. The results showed that: (1) A certain proportion of 2n pollen grains could be gotten from the male flower buds induced by colchicine solution with the concentration of 0.3%, 0.5% and 0.8% before Metaphase I; (2) The highest proportion of the 2n pollen grains could be up to 35.5%, when the male flower buds were treated by the colchicine solution of 0.5% at the pachytene stage. The results of this research lay a basis for polyploid breeding by obtaining the 2n pollen grains.

Key words: *Populus deltoid*; meiosis; pollen chromosome doubling; colchicine

黑杨派是杨柳科 (Salicaceae) 杨属 (*Populus*) 的五大派之一, 栽培利用价值极高, 具有速生丰产、实用性强、无性繁殖能力强等特点, 是世界杨树人工林的重要树种资源^[1-2]。而在辽宁、吉林、内蒙古等省区, 美洲黑杨 (*Populus deltoid*) 常遭遇冻害, 出现干梢或整株死亡现象, 就辽宁省而言, ‘108 杨’曾发生大面积死亡现象, 给林农带来巨大经济损失。美洲黑杨抗寒性亟待改良。实践

证明, 三倍体育种在遗传增益、材质改良、速生、抗逆性等方面有非常大的优势, 是杨树遗传改良的一条有效途径, 因此可通过选育多倍体提高美洲黑杨的抗寒性。

林木多倍体育种的主要方法有从自然界中直接选择天然多倍体、体细胞染色体加倍、不同倍性体间杂交、天然或人工诱导未减数配子杂交等, 这些方法都有其适合的树种及优势, 而人工诱导花粉染

* 收稿日期: 2018-06-22

基金项目: 阔叶树速生丰产林定向培育技术研究 (2015BAD09B02), 辽宁省科学事业公益研究基金 (GY20170045)。

第一作者简介: 赵鑫闻 (1983-), 女, 工程师, 主要从事林木遗传育种研究。E-mail: ritazxw@126.com

通讯作者简介: 梁德军 (1970-), 男, 教授级高级工程师, 主要从事森林培育研究。E-mail: liangdejun70@163.com

染色体加倍是杨树多倍体育种中最为快捷的途径^[3]。Johnsson等^[4]最早采用秋水仙碱处理欧洲山杨(*P. tremula*)、美洲山杨(*P. tremuloides*)雄花枝,取得了一些 $2n$ 花粉,然后给雌花枝授粉,均得到了三倍体植株。张志毅等^[5]应用秋水仙碱和高温等方法处理获得了毛新杨(*P. tomentosa* × *P. bolleana*)未减数 $2n$ 花粉,并取得三倍体植株。康向阳等^[6-10]则在掌握杨树花粉母细胞减数分裂规律的基础上,明确了决定花粉染色体加倍效果的减数分裂有效处理时期及高效获得白杨派(section *populus*)杂种三倍体的育种技术体系。李开隆等^[11]利用秋水仙碱处理诱导大青杨(*P. ussuriensis*) $2n$ 花粉得到了10%直径为 $37.5 < d < 50$ 的大花粉并获得青杨派三倍体。

目前,在欧洲山杨、美洲山杨、欧洲黑杨、香脂杨(*P. balsamifera*)、银白杨(*P. alba*)、毛新杨、银腺杨(*P. alba* × *P. glandulosa*)、响叶杨(*P. adenopoda* Mazim)、通辽杨(*P. simonii* Carr. × *P. nigra* L. 'Tongliao')树种上,均进行了 $2n$ 花粉的诱导试验,并与正常配子杂交得到了三倍体植株^[12-21],但未见在美洲黑杨上的报道。因此,本研究开展美洲黑杨花粉染色体加倍技术的研究,以期为美洲黑杨的多倍体育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

'美洲黑杨33号杨'(*P. deltoides* cl. '33')雄花枝于2017年3月采集于辽宁省凌海市辽宁省杨树研究所基因库,用塑料膜包裹,保持潮湿,运回后保存于低温的苗木窖中保存。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉母细胞减数分裂进程观察

4月于辽宁省杨树研究所温室内对'美洲黑杨33号杨'雄花枝进行水培处理,室温为 $8-15^{\circ}\text{C}$ 。选取发育适中且外部形态相似的花芽,初期每隔12h用卡诺固定液固定3-5个,待镜检花芽观察到细线期花粉母细胞时,每隔3h固定1次(晚上温度较低,减数分裂进程缓慢,仍为每隔12h固定1次),直至花药变红开始散粉为止。每次固定过夜后将花芽转移至70%乙醇于 4°C 保存待用。花粉母细胞减数分裂进程采用醋酸洋红临时压片法观察^[18]。

1.2.2 花粉母细胞染色体加倍

根据花粉母细胞减数分裂进程观察结果,分别

于花粉母细胞时期、减数分裂细线期、粗线期、终变期、中期I,利用0.3%、0.5%、0.8%的秋水仙碱溶液处理'美洲黑杨33号杨'雄花芽,即用微量注射器将秋水仙碱溶液注入雄花芽中,每天注射3次,每次 $30-40\mu\text{L}$,2次处理时间间隔为 $5-7\text{h}$ 。如次日需注射,则于当晚将处理花枝移入 $0-4^{\circ}\text{C}$ 的室内,以减缓其减数分裂进程,保持处理效用的连续性^[6]。每种处理10-15个雄花芽。

1.2.3 $2n$ 花粉的统计与纯化

分别按照不同处理收集美洲黑杨成熟花粉,并混合均匀,每个处理取少量花粉做3个临时涂片,经醋酸洋红染色后,放置于Olympus BX51光学显微镜下进行镜检,每个涂片观察5个视野,测量视野内花粉的直径,一般直径大于 $37\mu\text{m}$ 的杨树花粉为染色体未减数的 $2n$ 大花粉,分别统计每个处理中获得的 $2n$ 花粉所占比例并分析^[11]。

2 结果与分析

2.1 花粉母细胞减数分裂进程观察

对不同时期采集的'美洲黑杨33号杨'花芽进行压片观察,见图1。

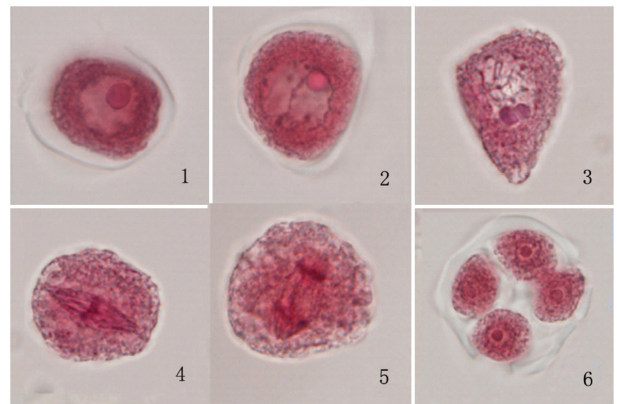


图1 美洲黑杨花粉母细胞减数分裂进程

注:1为前期I,2为细线期,3为粗线期,

4为中期I,5为后期I,6为四分体

Fig. 1 Meiosis of pollen mother cells in *P. deltoides*

图1显示,水培24h后,大多数花粉母细胞进入减数分裂细线期;水培36h后,观察到有些花粉母细胞进入减数分裂粗线期,有些花粉母细胞还处于减数分裂细线末期;水培42h后,发现大多数花粉母细胞进入减数分裂粗线期;水培48h后,则有的花粉母细胞进入粗线期,有的进入终变期;水培54h后,多数花粉母细胞进入减数分裂中期I,此

时也观察到还有少量的花粉母细胞已经进入减数分裂后期 I；水培 60h 后，多数花粉母细胞进入减数分裂后期 I；水培 72h 后大多数花粉母细胞进入四分体时期，减数分裂基本完成。

2.2 花粉母细胞染色体加倍

将处于不同减数分裂时期的‘美洲黑杨 33 号杨’雄花芽利用不同浓度的秋水仙碱溶液进行处理，获得的 2n 花粉所占的百分率见表 1。由表 1 可知在花粉母细胞减数分裂中期 I 之前，利用不同浓度的秋水仙碱溶液（0.3%、0.5%、0.8%）对‘美洲黑杨 33 号杨’雄花芽进行处理均能得到 2n 花粉。处理时期对 2n 花粉的诱导率影响较大，在花粉母细胞处于减数分裂细线期和粗线期时对美洲黑杨雄花芽进行处理获得的诱导率显著高于其他处理；处理浓度对 2n 花粉的诱导率也有一定影响，利用浓度为 0.5% 的秋水仙碱对雄花芽进行处理时，获得的 2n 花粉诱导率最高。其中，当秋水仙碱的浓度为 0.5%，处理时期为减数分裂粗线期时，获得的‘美洲黑杨 33 号杨’2n 花粉诱导率最高，为 35.5%。

表 1 花粉染色体加倍的始处理时期与 2n 花粉的比率

Tab. 1 The initiation treatment period of pollen chromosome doubling and the percentage of 2n pollen

处理	处理时期	处理浓度/%	2n 花粉比例/%			平均
			重复 I	重复 II	重复 III	
CR-1	花粉母细胞	0.3	1.0	2.3	-	1.7
CR-2	细线期	0.3	12.2	10.3	6.0	9.5
CR-3	粗线期	0.3	10.0	5.1	13.2	9.4
CR-4	终变期	0.3	2.1	3.7	-	2.9
CR-5	中期 I	0.3	6.2	-	2	4.1
CR-6	花粉母细胞	0.5	8.5	5.1	2.9	5.5
CR-7	细线期	0.5	12.5	15.0	16.2	14.6
CR-8	粗线期	0.5	33.6	40.1	32.8	35.5
CR-9	终变期	0.5	5.1	-	3.0	4.1
CR-10	中期 I	0.5	3.5	-	-	3.5
CR-11	花粉母细胞	0.8	1.5	-	-	1.5
CR-12	细线期	0.8	10.2	8.0	3.5	7.2
CR-13	粗线期	0.8	20.0	15.4	23.3	19.6
CR-14	终变期	0.8	3.6	-	2.0	2.8
CR-15	中期 I	0.8	2.5	-	-	2.5

3 结论与讨论

利用获取 2n 花粉途径进行杨树三倍体育种，是获得杨树三倍体较为快捷、可靠的途径之一^[6]。本试验利用不同浓度的秋水仙碱在花粉母细胞不同减数分裂时期进行美洲黑杨 2n 花粉的诱导，研究

结果表明，在花粉母细胞减数分裂的过程中利用各浓度（0.3%、0.5%、0.8%）的秋水仙碱进行处理均能获得一定比例的 2n 花粉；处理时期对 2n 花粉的诱导率影响较大，在花粉母细胞处于减数分裂细线期和粗线期时对美洲黑杨雄花芽进行处理获得的诱导率显著高于其他处理。当利用 0.5% 的秋水仙碱在花粉母细胞减数分裂粗线期处理美洲黑杨雄花芽时，获得的诱导率最高，为 35.5%。

秋水仙碱是一种微管解聚剂，是最重要的微管工具药物。当秋水仙碱与正在进行有丝分裂的细胞接触时就与微管蛋白异二聚体结合，从而阻断微管蛋白组装成微管，并引起原有微管解聚，使细胞中与微管相关的功能受到阻碍和丧失，不能形成纺锤丝。没有纺锤丝牵引，染色体不能排在赤道板上，也不能使已经复制的染色体分向两极，阻碍了中期以后的细胞分裂进程，进而形成染色体加倍的细胞^[20-21]。因此，秋水仙碱的作用时间，以及利用多大浓度的秋水仙碱对花粉母细胞进行处理成为花粉母细胞染色体加倍技术的关键环节。本试验对美洲黑杨花粉母细胞染色体加倍的有效处理时期及有效处理浓度进行了研究，结果表明，在花粉母细胞减数分裂细线期与粗线期进行美洲黑杨 2n 花粉的诱导效果最好，总体上在减数分裂粗线期进行诱导得到的 2n 花粉最多，并且诱导的最佳浓度为 0.5%，与康向阳等^[6]对杨树花粉染色体加倍有效处理时期的研究以及李赞等^[15]利用秋水仙碱诱导银白杨染色体加倍的研究结果均一致。同时，有研究结果表明秋水仙碱对花粉母细胞的持续作用时间对 2n 花粉诱导率也有一定的影响^[6,22]，而且在花粉加倍过程中，由于每个花芽中花粉母细胞减数分裂进程不同以及处理过程中管理条件的变化等，都会对花粉母细胞染色体加倍的得率造成影响，因此对于如何提高美洲黑杨 2n 花粉的诱导率还有待于进一步研究。

参考文献：

[1] Franco J A. *Populus*. Flora Europaea [M]. Cambridge: University Press, 1993, 1: 64-66.

[2] Linnaeus C. *Populus*. Linn. Sp. Pl. [M]. London: Bernard Quaritch Ltd, 1753: 1034-1035.

[3] 李云. 杨树三倍体选育研究进展 [J]. 植物学通报, 2001, 18(4): 451-458.

[4] Johansson H, Eklundh C. Colchicine treatment as a method in breeding hardwood species [J]. Svensk Papp Tidn, 1940, 43: 373-377.

[5] 张志毅, 李凤兰. 白杨染色体加倍技术研究及三倍体育种(I)花粉染色体加倍技术[J]. 北京林业大学学报, 1992, 14(增刊3): 52-58.

[6] 康向阳, 朱之悌, 林惠斌. 杨树花粉染色体加倍有效处理时期的研究[J]. 林业科学, 1999, 39(4): 21-24.

[7] 康向阳, 朱之悌, 张志毅. 银腺杨与毛新杨正反交三倍体选育[J]. 北京林业大学学报, 2000, 22(6): 8-11.

[8] 康向阳, 朱之悌. 白杨 2n 花粉生命力测定方法及萌发特征的研究[J]. 云南植物研究, 1997, 19(4): 402-406.

[9] 康向阳, 朱之悌, 林惠斌. 白杨不同倍性花粉的辐射敏感性及其应用[J]. 遗传学报, 2000, 27(1): 78-82.

[10] 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.

[11] 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.

[12] Winton L L. Fertilization in forced quaking aspen and cottonwood[J]. *Silvae Genet*, 1968, 17(1): 20-21.

[13] Dwivedi N K, Suryanarayana N, Sikdar A K, *et al* . Cytomorphological studies in triploid mulberry evolved by diploidization of female gamete cells[J]. *Cytologia*, 1989, 54: 13-19.

[14] Mashkina O S, Burdaeva L M, Belozeroва M M, *et al* .

Method of obtaining diplaid pollen of woody species[J]. *Lesovedenie*, 1989(1): 19-25.

[15] 李赟, 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): 0749-0756.

[16] 许雯婷, 赵健, 赵楠, 等. 欧洲黑杨花粉母细胞减数分裂观察及其不同步性分析[J]. 西北植物学报, 2011, 31(10): 1981-1987.

[17] 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.

[18] 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.

[19] 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.

[20] 康向阳. 毛白杨未减数 2n 花粉发生机制的研究[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(6): 67-70.

[21] 彭尽晖, 张良波, 彭晓英. 秋水仙素在植物倍性育种中的应用进展[J]. 湖南林业科技, 2004, 31(5): 22-25.

[22] 刘丽, 林苗苗, 方金豹, 等. 秋水仙素对‘琼露’猕猴桃多倍体诱导的影响[J]. 经济林研究, 2017, 35(3): 147-151.

(编辑: 李云琴)

[上接第 99 页]

[7] 武素功, 李沛琼. 川西、滇北金沙江河谷的植物区系. 青藏高原研究——横断山考察专集(二)[C]. 北京: 科学技术出版社, 1986: 416-431.

[8] 欧晓昆. 元谋干热河谷植物区系研究[J]. 云南植物研究, 1988, 10(1): 1-18.

[9] 金振洲, 欧晓昆, 周跃. 云南元谋干热河谷植被概况[J]. 植物生态学与地植物学学报, 1987, 11(4): 308-317.

[10] 曹敏, 金振洲. 云南巧家金沙江干热河谷的植被分类[J]. 云南植物研究, 1989, 11(3): 324-336.

[11] 金振洲, 杨永平, 陶国达. 华西南干热河谷种子植物区系的特征、性质和起源[J]. 云南植物研究, 1995, 17(2): 129-143.

[12] 欧晓昆, 金振洲. 金沙江干热河谷植物区系和生态多样性的初步研究[J]. 武汉植物研究, 1996, 14(4): 318-322.

[13] 金振洲. 滇川干热河谷与干暖河谷植物区系特征[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2000: 6-12.

[14] 曹永恒. 云南坝怒江干热河谷植物区系研究[J]. 云南植物研究, 1993, 15(4): 339-345.

[15] 金振洲. 滇川干暖河谷种子植物植物区系成分研究[J]. 广西植物, 1998, 18(4): 313-321.

[16] 骆银辉, 周道银, 朱荣华, 等. 世界自然遗产: ‘三

江’并流区地质生态环境特征及其成因初探[J]. 地质灾害与环境保护, 2008, 19(2): 94-97.

[17] 张荣祖. 青藏高原横断山区科学考察丛书——横断山区干旱河谷[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 20-30, 65-69.

[18] 黄云辉. 得荣干旱特点及成因浅析[J]. 中国科技纵横, 2013(17): 224.

[19] 黄英, 李自顺. 低纬地区的‘干谷’: 滇西北纵向岭谷区雨量之变化分析[J]. 水文, 2006, 26(6): 68-70.

[20] 李云琴, 杜凡, 汪健, 等. 金沙江上游干旱河谷植被[J]. 生物多样性, 2016, 24(4): 489-494.

[21] 吴征镒. 中国植物属的分布区类型的增刊和勘误[J]. 云南植物研究, 1993, 增刊(IV): 141-179.

[22] 杨钦周. 岷江上游干旱河谷灌丛研究[J]. 山地学报. 2007, 25(1): 1-32.

[23] 庄翠珍, 杜凡, 刘宁, 等. 怒江中游西藏境内干旱河谷荒漠植被特征[J]. 植物分类与资源学报, 2011, 33(4): 433-442.

[24] 李锡文, 李捷. 横断山脉地区种子植物区系的初步研究[J]. 云南植物研究, 1993, 15(3): 217-231.

[25] 汪健, 杜凡, 李云琴. 鹅绒藤属(萝科) 一新变种——折叶白前[J]. 西北植物学报, 2012(3): 616-618.

(编辑: 胡光辉)