北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

低温诱导毛白杨花粉染色体加倍选育三倍体

龙美玲 杜嘉华 孔博 解云云 张平冬 康向阳

Pollen chromosome doubling induced by low temperature to produce triploid in *Populus tomentosa*

Long Meiling, Du Jiahua, Kong Bo, Xie Yunyun, Zhang Pingdong, Kang Xiangyang

引用本文:
龙美玲, 杜嘉华, 孔博, 解云云, 张平冬, 康向阳. 低温诱导毛白杨花粉染色体加倍选育三倍体[J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(5):26–36. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250018
Long Meiling, Du Jiahua, Kong Bo, Xie Yunyun, Zhang Pingdong, Kang Xiangyang. Pollen chromosome doubling induced by low temperature to produce triploid in *Populus tomentosa*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(5):26–36. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250018

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250018

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

高温诱导大孢子染色体加倍选育毛白杨杂种三倍体

Production of hybrid triploids via inducing chromosome doubling of megaspore with high temperature treatment in *Leuce* poplar

北京林业大学学报, 2018, 40(11): 12–18. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20180215

毛白杨杂种三倍体的2n雌配子形成途径鉴定

Origin identification of 2n female gamete of *Populus tomentosa* triploid hybrids

北京林业大学学报, 2017, 39(5): 17–24. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20170001

秋水仙碱处理诱导银灰杨2n花粉与杂种三倍体创制

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

北京林业大学学报, 2020, 42(3): 119–126. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20190363

青黑杨杂种三倍体花粉母细胞减数分裂染色体行为及其花粉变异研究

Meiotic chromosome behavior of pollen mother cells and pollen variation in triploid hybrid between section Tacamahaca and sect. Aigeiros of *Populus*

北京林业大学学报, 2019, 41(7): 75–82. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20190099

转基因三倍体毛白杨花粉活力及枯落物外源基因检测

Pollen vigor and detection of exogenous genes of litter for transgenic triploid *Populus tomentosa*

北京林业大学学报, 2019, 41(7): 91–100. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20190105

宽窄行栽植模式下三倍体毛白杨小麦复合系统的细根分布及形态特征

Fine root spatial distribution and morphology of triploid *Populus tomentosa*–wheat agroforestry system under wide– and narrow–row spacing planting schemes

北京林业大学学报, 2021, 43(10): 73–80. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200420

DOI:10.12171/j.1000−1522.20250018

低温诱导毛白杨花粉染色体加倍选育三倍体

龙美玲[1,2] 杜嘉华[1,2] 孔 博[1,2] 解云云[1,2] 张平冬[1,2] 康向阳[2]
（1. 北京林业大学林木资源高效生产全国重点实验室，北京 100083；2. 北京林业大学林木育种与生态修复国家工程研究中心，北京 100083）

摘要:【目的】建立低温诱导毛白杨花粉染色体加倍选育三倍体的技术体系，为林木三倍体育种提供理论指导。**【方法】**以山西朔州的毛白杨为研究对象，利用醋酸洋红染色法，在掌握雄花芽减数分裂规律的基础上，施加 4 ℃ 低温处理毛白杨雄花芽，诱导产生 2*n* 花粉；利用免疫荧光技术研究低温胁迫处理条件下花粉母细胞微管骨架动态变化，探索低温诱导毛白杨花粉染色体加倍的内在机制；利用获得的低温诱导型 2*n* 花粉与毛白杨雌株进行授粉杂交，通过流式细胞仪和体细胞染色体计数法检测倍性，筛选获得三倍体。**【结果】**(1)毛白杨花粉母细胞在温室水培条件下完成减数分裂需 4 ~ 5 d，其花粉母细胞减数分裂进程与雄花芽外部形态和花药颜色变化有着明显的对应关系。(2)减数分裂时期和持续处理时间对毛白杨 2*n* 花粉诱导率具有显著影响；处理时期与持续处理时间的交互作用对毛白杨 2*n* 花粉诱导率无显著影响。(3)利用 4 ℃ 低温对发育至减数分裂 II 中期的花粉母细胞进行 2 d 的持续处理是低温诱导毛白杨花粉染色体加倍，获得 2*n* 花粉的最佳处理组合，最高可获得 9.51% 的 2*n* 花粉。(4)利用获得的低温诱导型 2*n* 花粉与毛白杨雌株进行授粉杂交，筛选获得 1 株三倍体。(5)4 ℃ 低温处理可干扰花粉母细胞减数分裂 II 末期辐射状微管的形成，导致四分体时期相邻子核之间的微管部分缺失。**【结论】**本研究首次利用低温诱导获得毛白杨 2*n* 花粉，并通过低温诱导型 2*n* 花粉杂交成功筛选获得三倍体 1 株，验证了利用低温诱导杨树花粉染色体加倍选育三倍体的可行性。

关键词：毛白杨；低温胁迫；染色体加倍；2*n* 花粉；微管；三倍体选育
中图分类号：S792.11 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2025)05−0026−11
引文格式：龙美玲，杜嘉华，孔博，等. 低温诱导毛白杨花粉染色体加倍选育三倍体［J］. 北京林业大学学报，2025，47(5)：26−36. Long Meiling, Du Jiahua, Kong Bo, et al. Pollen chromosome doubling induced by low temperature to produce triploid in *Populus tomentosa*［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(5): 26−36.

Pollen chromosome doubling induced by low temperature to produce triploid in *Populus tomentosa*

Long Meiling[1,2] Du Jiahua[1,2] Kong Bo[1,2] Xie Yunyun[1,2] Zhang Pingdong[1,2] Kang Xiangyang[2]
(1. State Key Laboratory of Efficient Production of Forest Tree Resources, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
2. National Engineering Research Center of Tree Breeding and Ecological Restoration,
Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract:［**Objective**］This study aims to establish a technical system for triploid production of *Populus tomentosa* by inducing pollen chromosome doubling with low temperature, which provides theoretical guidance for triploid breeding of forest tree species.［**Method**］Taking *P. tomentosa* in Shuozhou, Shanxi Province of northern China as the research object, based on the observation of male meiosis of pollen mother cells (PMCs), aceto-carmine staining method was used, and 4°C low temperature treatment was applied to male flower buds of *P. tomentosa* to induce the production of 2*n* pollen. Immunofluorescence technology was utilized to study dynamic changes of microtubule in PMCs under low temperature stress conditions, exploring intrinsic mechanism of low temperature-induced chromosome doubling in *P. tomentosa* pollen.

收稿日期: 2025−01−16 **修回日期:** 2025−03−11
基金项目:“十四五”国家重点研发计划(2021YFD2200105)。
第一作者: 龙美玲。主要研究方向：林木细胞遗传与细胞工程。Email: longlongmeiling@163.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

Using the obtained low-temperature induced 2*n* pollen for pollination hybridization with female *Populus tomentosa* plants, the ploidy was detected by flow cytometry and somatic chromosome counting to screen for triploidy. [**Result**] (1) The microsporocyte of *P. tomentosa* completed meiosis in about 4 to 5 d under greenhouse hydroponic conditions.The meiotic process of PMCs showed a clear correspondence with morphology of male flower buds and dynamic change of anther color. (2) Meiotic stage and duration had significant effects on frequency of cold-induced 2*n* pollen. However, meiotic stage × duration interaction had no significant effect on frequency of cold-induced 2*n* pollen. (3) The optimum treatment combination to induce pollen chromosome doubling was successfully developed, and the PMCs were treated by 4 ℃ for two days when the meiotic stage was at metaphase Ⅱ. The highest average frequency of cold-induced 2*n* pollen was 9.51%. (4) One triploid was detected by crossing cold-induced 2*n* pollen with haploid female gametes of *P. tomentosa* clone SX-1. (5) After treating via low temperature, radial microtubule arrays (RMAs) were interfered in some treated PMCs at telophase Ⅱ, resulting in partial lack of RMAs between the four formed daughter nuclei at tetrad stage. [**Conclusion**] It is the first time for 2*n* pollen induction by low temperature in *P. tomentosa* and one triploid is successfully obtained, which shows that inducing pollen chromosome doubling to breed triploid by low temperature in *Populus* is feasible in a certain.

Key words: *Populus tomentosa*; low temperature stress; chromosome doubling; 2*n* pollen; microtubule; triploid breeding

毛白杨（*Populus tomentosa*）隶属杨柳科（Salicaceae）杨属（*Populus*），属于落叶大乔木。它具有生长迅速、树干笔直挺拔、木材材质优良、树冠形态优美、适应能力强等优良特性，主要分布于黄河流域中下游，尤其在河北、山西、陕西、山东、河南等地区，是平原地区用材林营造、农田林网建设以及城乡绿化的主要栽培树种之一，具有重要的生态价值和经济价值[1]。研究[2−3]表明，三倍体育种综合了倍性优势与杂种优势，使三倍体植株在生长、抗逆性、不育性、材性等方面表现出显著的优良特性，是毛白杨遗传改良的重要途径之一。

利用 2*n* 花粉与单倍性雌配子进行杂交，是人工诱导获取林木三倍体的一条关键途径。“北林雄株 1 号”“北林雄株 2 号”以及“三毛杨”系列杨树新品种就是通过此途径选育而成的[4−5]。秋水仙碱作为一种高效的化学诱变剂，已广泛应用于杨树（*Populus* spp.）[6]、杜仲（*Eucommia ulmoides*）[7]、桉树（*Eucalyptus* spp.）[8]等树种的 2*n* 花粉人工诱导，获得了诱导率高达 82.23% 的 2*n* 花粉[6]。然而，秋水仙碱具有剧毒，属于管制化学品，购置难度较大。高温亦是一种高效的物理诱变剂，已广泛用于杨树[9]、杜仲[10]、月季（*Rosa chinensis*）[11]等物种的 2*n* 花粉人工诱导。Tian 等[9]利用 38 ℃ 的高温，对发育至终变期的银灰杨（*Populus canescens*）花粉母细胞持续处理 6 h，获得了诱导率高达 56.3% 的 2*n* 花粉。利用这些高频率高温诱导型 2*n* 花粉与银白杨（*Populus alba*）单倍性雌配子杂交，成功获得 42 株三倍体。进一步的遗传组成分析表明，这 42 株三倍体均来源于 SDR 型 2*n* 花粉，说明高温处理诱导产生的 2*n* 花粉均为 SDR（second division restitution）型。SDR（第一次减数分裂正常，第二次减数分裂异常）和 FDR（第一次减数分裂异常，第二次减数分裂正常）是两种减数分裂异常机制，鉴于 SDR 型 2*n* 花粉传递亲本杂合性的能力远低于 FDR（first division restitution）型 2*n* 花粉，这在一定程度上限制了高温在三倍体育种实践中的应用。因此，研发新型的林木 2*n* 花粉诱变剂，以提高诱导效率和遗传多样性，显得尤为迫切。

低温是一种有效的物理诱变剂，已被证实能够诱导拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）[12]、日本柿子（*Diospyros kaki*）[13]、辣椒（*Capsicum annuum*）[14]等多种植物的花粉染色体加倍，从而产生 2*n* 花粉。然而，低温诱导植物花粉染色体加倍的技术体系仍不完善，如适宜处理温度、持续处理时间以及有效处理时期等影响 2*n* 花粉诱导效率的关键因素还有待优化，导致 2*n* 花粉诱导率普遍偏低。4 ℃ 低温处理水培 3 d 的银毛杨（*Populus bolleana* × *P. tomentosa*）雌花序或 −2 ℃ 低温处理水培 2 d 的毛新杨（*P. tomentosa* × *P. bolleana*）和银毛杨雌花芽，均可获得三倍体[15]。这表明低温处理诱导杨树雌配子染色体加倍选育三倍体是可行的。但有关低温诱导杨树花粉染色体加倍选育三倍体的研究至今尚未见报道。

本研究以山西朔州的毛白杨（*Populus tomentosa*）为研究对象，拟通过醋酸洋红染色法，探究其花粉母细胞减数分裂规律，在此基础上，进一步开展低温诱导毛白杨花粉染色体加倍以获得 2*n* 花粉的研究，并

探讨低温处理对花粉母细胞微管骨架的影响，从而探索低温处理诱导毛白杨花粉染色体加倍以选育三倍体技术的可行性。研究结果对于完善林木三倍体育种理论，开发新型林木 2*n* 配子诱变剂等具有重要的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2023 年冬季落叶后，于山西朔州金沙植物园采集毛白杨雄株无性系（SX-145）与雌株无性系（SX-1）的花枝，用塑料布包裹，托运至北京林业大学温室，放置于低温避光处待使用。

1.2 研究方法

1.2.1 毛白杨花芽外部形态与花粉母细胞减数分裂进程观察

将毛白杨雄花枝置于 10 ~ 20 ℃ 的温室中进行切枝水培。每隔 2 ~ 3 h，随机挑选 2 ~ 3 个雄花芽，将鳞片去除后，随机摘取花芽中部位置的小花，利用 Olympus SZX12 体视显微镜对不同花芽的外部形态和花药颜色进行观察，并采用 Olympus C5060 Wide Zoom 型数码相机进行拍照记录。紧接着，将花芽置于新配制的卡诺固定液中，于 4 ℃ 的冰箱固定 24 h。摘取少量固定好的花药，运用醋酸洋红染色制片法和 Olympus BX-51 光学显微镜对花粉母细胞的减数分裂过程展开观察[16]，并运用 Olympus DP70 数码摄像系统进行照相。染色体制片的具体操作参照鲁敏等[17]的方法。

1.2.2 低温诱导毛白杨 2*n* 花粉

将毛白杨雄花枝分成对照组与处理组，水培于 10 ~ 20 ℃ 的温室。对照组水培至花药成熟，自然散粉后，收集花粉并将其放置于−20 ℃ 的冰箱干燥密封保存。同时，运用醋酸洋红染色制片法实时观测处理组的花粉母细胞减数分裂进程，当雄花芽中大多数花粉母细胞分别处于粗线期、终变期、减 Ⅰ 中期、减 Ⅰ 后期、减 Ⅰ 末期、减 Ⅱ 前期、减 Ⅱ 中期、减 Ⅱ 后期、减 Ⅱ 末期 9 个时期时，选取 6 ~ 9 个雄花枝，置于 4 ℃ 的冰箱中，分别低温持续处理 1、2、3 d，总计 27 个处理组合。低温处理后，将花枝从冰箱中取出，在温室中继续水培，直至花药成熟散粉，依据不同的处理组合分别收集花粉，在−20 ℃ 条件下进行干燥密封，留存备用。试验重复 3 次，每次重复 2 ~ 3 个花枝。

1.2.3 2*n* 花粉诱导率的统计

取少许来自不同处理组合的诱导型花粉，逐一均匀地撒在滴有醋酸洋红染色液的载玻片上，制作临时涂片。将制作好的涂片放置在 Olympus BX-51 光学显微镜下进行镜检，每个涂片随机挑选 5 ~ 10 个视野进行拍照记录，再借助 Image J 软件，对图像中的花粉直径进行测量。以对照组花粉粒平均直径的 1.28 倍作为判别 2*n* 花粉的标准[18]，统计每个视野中 2*n* 花粉粒数目和总花粉粒的数目，以 2*n* 花粉占统计花粉粒总数的百分比作为 2*n* 花粉诱导率。选取诱导率比较高的处理组（减数分裂 Ⅱ 中期）3 个处理组合和对照组花粉的直径分布情况进行统计分析。该试验重复 3 次，每次重复选取 200 ~ 300 个花粉粒。

1.2.4 毛白杨花粉母细胞减数分裂微管骨架的免疫荧光标记

采集对照组与减数分裂 Ⅱ 中期低温处理后的毛白杨雄花芽，摘取花药，分别进行微管蛋白免疫荧光标记，参考张平冬等[19]方法进行制片操作和免疫荧光标记。制备好的片子使用 Leica TCS-SP8 型激光共聚焦扫描显微镜观察和拍照，其中 DAPI 的激发波长设置为 364 nm，FITC 的激发波长为 488 nm。

1.2.5 授粉杂交育苗

毛白杨雌花枝水培于 10 ~ 20 ℃ 的温室，待雌花序柱头发育至最佳可授期时[20]，从处理组合中选取 2*n* 花粉诱导率相对高的处理组和对照组花粉，用毛笔将其均匀涂抹于毛白杨雌花柱头进行授粉杂交。将授完粉的毛白杨雌花枝继续置于温室水培，直至蒴果成熟自然开裂，随后套袋收集种子。将收集的种子点播于 50 孔穴盘，每孔点播 1 ~ 2 粒种子，不同处理组合做好标记，随后将穴盘置于温室中培育，以促进种子萌发生长，定期浇水看护。

1.2.6 杂交子代倍性检测

利用流式细胞仪对存活的杂种幼苗进行倍性水平检测，具体参考周晴等[21]方法。在子代苗木经流式细胞仪初步检测判定为三倍体后，为了精准确定杂交子代的倍性水平，须采用体细胞染色体计数法对疑似三倍体植株进行染色体计数分析，确定其染色体数目。染色体计数的具体步骤参考周晴等[21]方法。

1.2.7 数据分析

2*n* 花粉诱导率等百分比数据先经反正弦变换[22]后，再利用 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 毛白杨花芽外部形态与花粉母细胞减数分裂进程观察

毛白杨花粉母细胞减数分裂进程与雄花芽的外部形态和花药颜色变化有着明显的对应关系（表 1）。

表 1　毛白杨减数分裂进程与雄花芽外部形态及其花药颜色变化的对应关系

Tab. 1　Corresponding relationship between meiosis stage process and male flower bud morphological and anther color change of *Populus tomentosa*

水培时间/h	花芽(序)变化	花芽颜色		小花颜色	减数分裂时期
		顶部	基部		
75	花芽略微膨大，芽鳞尚未开裂	嫩绿色	嫩绿色	嫩绿色	细线期
93	芽鳞开裂，花序微露	黄绿色	微红色	微红色	双线期
101	花序明显露出	微红色	浅红色	浅红色	减Ⅰ后期
104	花芽进一步膨大，花序露出	浅红色	鲜红色	鲜红色	减Ⅱ后期
105	花序露出芽鳞约1/3	鲜红色	深红色	深红色	四分体时期

温室条件下水培可加快花粉母细胞减数分裂进程，花粉母细胞发育到四分体时期大概历时 4～5 d。花枝水培约 75 h，花芽略微膨大，芽鳞尚未开裂(图 1，1a)，花芽顶部与基部均为嫩绿色(图 1，1b)，小花嫩绿(图 1，1c)，减数分裂进入细线期(图 2a)。水培至 93 h，芽鳞开裂，花序微露(图 1，2a)，花芽顶部黄绿色，基部呈现微红色(图 1，2b)，小花颜色微红(图 1，2c)，花粉母细胞减数分裂经历偶线期(图 2b)、粗线期(图 2c)，发育至双线期(图 2d)。水培 101 h，此时花序明显露出(图 1，3a)，花芽顶部微红，基部由微红色转变为浅红色(图 1，3b)，小花亦为浅红色(图 1，3c)，花粉母细胞由终变期(图 2e)、中期Ⅰ(图 2f)发育至减Ⅰ后期(图 2g)。水培 104 h，花粉母细胞经历末期Ⅰ(图 2h)、前期Ⅱ(图 2i)和中期Ⅱ(图 2j)，发育至减Ⅱ后期(图 2k)，此时的花芽进一步膨大，花序露出(图 1，4a)，花芽顶部浅红色，基部转变为鲜红色(图 1，4b)，小花鲜红(图 1，4c)。水培 105 h，花芽膨大，花序露出芽鳞约 1/3(图 1，5a)，此时花芽顶部颜色鲜红，基部深红(图 1，5b)，小花为深红色(图 1，5c)，花粉母细胞由末期Ⅱ(图 2l～n)进入四分体时期(图 2o)。

2.2　低温诱导获得毛白杨 2*n* 花粉

不同低温处理组合 2*n* 花粉的诱导率统计结果如表 2 所示。各处理组合的 2*n* 花粉诱导率呈现出一定程度的差异，其中，在减Ⅱ中期低温 4 ℃ 持续处理 2 d 的诱导效果最为突出，平均 2*n* 花粉诱导率达(9.51 ± 1.33)%；而在粗线期以 4 ℃ 持续处理 1 d 的诱导效果最不理想，平均 2*n* 花粉诱导率仅为(1.36 ± 1.18)%。不同处理组合的 2*n* 花粉诱导率的差异显著性分析结果(表 3)表明，减数分裂时期和持续处理天数均对毛白杨 2*n* 花粉诱导率具有显著影响，但二者的交互作用对毛白杨 2*n* 花粉诱导率的影响并不显著。进一步的多重比较结果(表 4)表明：减Ⅱ中期的平均 2*n* 花粉诱导率总体上显著高于其他减数分裂时期；持续处理 2 d 的平均 2*n* 花粉诱导率显著高于持续处理 1 d 和 3 d 的 2*n* 花粉诱导率。因此，利用 4 ℃ 低温对处于减Ⅱ中期的花粉母细胞进行 2 d 的持续处理是低温诱导毛白杨 2*n* 花粉的适宜处理组合。

低温处理组的花粉经醋酸洋红染色后，置于光学显微镜下镜检，可观察到大多数花粉粒被染成红色，且着色均匀，表明其生活力良好(图 3)。2*n* 花粉镜检结果表明，对不同发育阶段的毛白杨雄花序进行低温处理，均能获得一定比例的 2*n* 花粉(图 3a)。对照组花粉中也存在少量天然 2*n* 花粉(图 3b)，但其发生频率相对较低，仅为(0.33 ± 0.24)%。通过比较诱导率比较高的减数分裂Ⅱ中期的 3 个处理组合和对照组花粉直径分布(图 4)，发现低温处理组的花粉直径分布范围明显增大，且大花粉比例显著增加，进一步证实了低温处理对花粉染色体加倍的诱导作用。

2.3　低温处理对毛白杨花粉母细胞减数分裂微管骨架的影响

微管蛋白免疫荧光标记结果如图 5 所示。毛白杨花粉母细胞减数分裂微管骨架呈现出规律性变化(图 5a～i)。减数分裂前期，细胞核被网状核周微管环绕，从核膜向细胞质辐射(图 5a)。随着减数分裂进入终变期，核周微管迁移至核内染色体区域，主要集中在细胞核内部，此时染色体形态明显，在核内散乱分布(图 5b)。减Ⅰ中期，着丝粒微管与极丝微管共同组成纺锤体微管，着丝粒微管与着丝粒相连，分布于赤道板区，极丝微管由两极发出，染色体整齐分布于赤道板(图 5c)。减Ⅰ后期，同源染色体随着丝粒微管的延伸而分开，向细胞的两极移动(图 5d)。当同源染色体到达细胞两极后，减数分裂进入减Ⅰ末期，此时具有极性的纺锤体微管解聚并消失，核周微管再次形成，环绕着两个新子核，核仁亦随之出现(图 5e)。

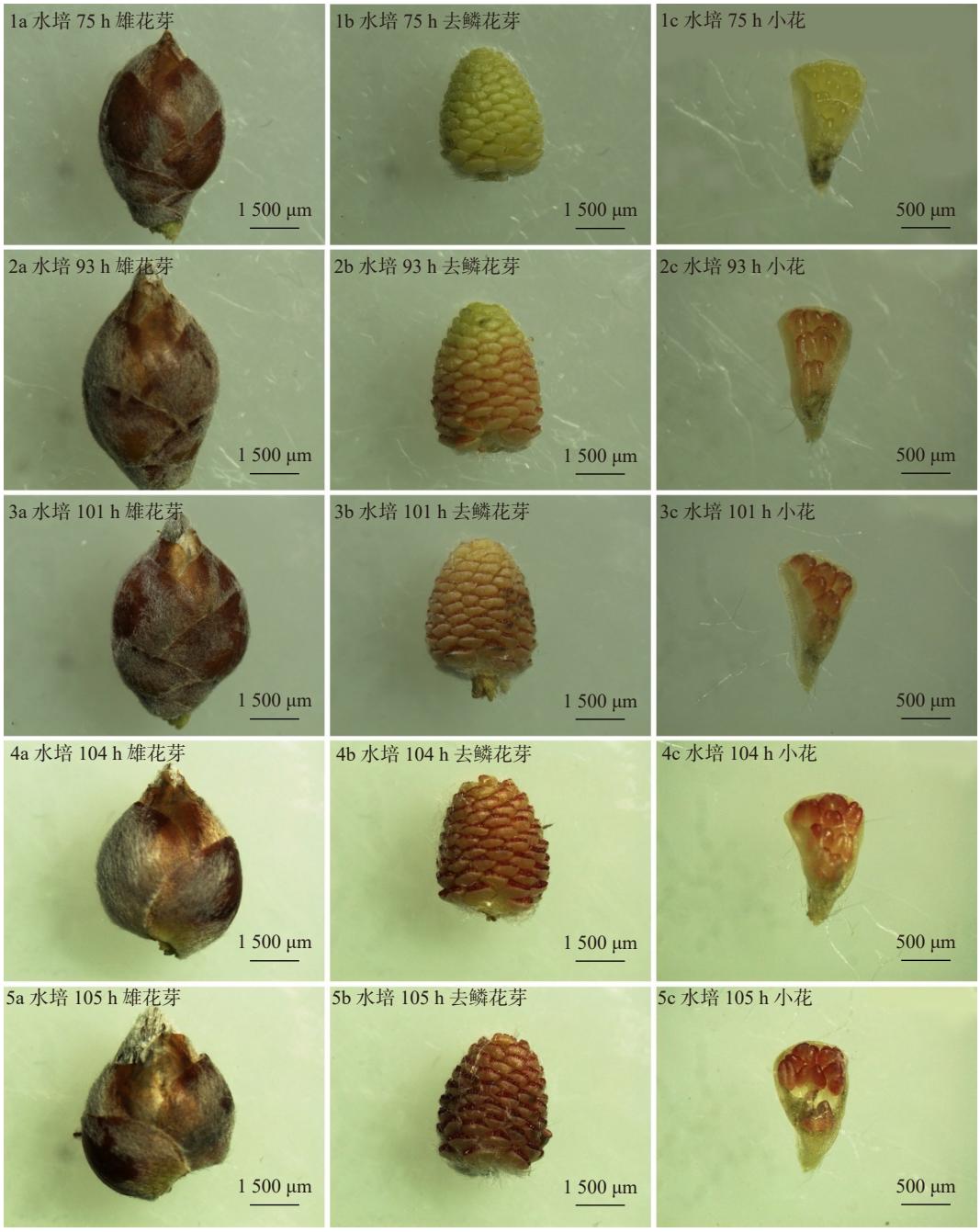


图 1 不同水培时间毛白杨雄花芽不同部位形态变化

Fig. 1 Morphological changes in different parts of male flower buds of *Populus tomentosa* at different hydroponic times

毛白杨花粉母细胞的胞质分裂属于同时型胞质分裂，第一次减数分裂结束后随即启动第二次减数分裂。在减 II 前期，核周微管重新移至两个子细胞核内，并与染色体相连(图 5f)。进入减 II 中期后，两个子核内形成纺锤体微管，着丝粒微管与排列在赤道板上的染色体相连(图 5g)。减 II 后期时，在着丝粒微管的牵引下，两个子核内的姐妹染色单体分别向子细胞两极移动(图 5h)。当姐妹染色单体到达细胞两极后，分裂进入末期 II。此时，纺锤体微管再次解聚，形成 4 个新的子核，核膜重新出现，核周发出辐射状微管连接着 4 个子核(图 5i)。

在减 II 中期的低温处理组中，花粉母细胞在减数分裂前期，微管形态与对照组并无差异(图 5a ~ i)。减 II 中期与减 II 后期微管形态亦无明显异常(图 5j ~ k)。当花粉母细胞发育至减 II 末期，相邻核之间的辐射状微管部分缺失(图 5l ~ o)。

2.4 毛白杨 2*n* 花粉与毛白杨雌配子杂交创制三倍体

选择对照组和 2*n* 花粉比例相对较高的 8 个处理组合的花粉，分别与毛白杨雌花序进行授粉杂交，共收获 4 062 粒种子，成苗 618 株。其中，对照组花粉与毛白杨雌花序杂交获得 127 粒种子，成苗 8 株(表 5)。当苗木生长至 15 ~ 20 cm 时，采用两株子代

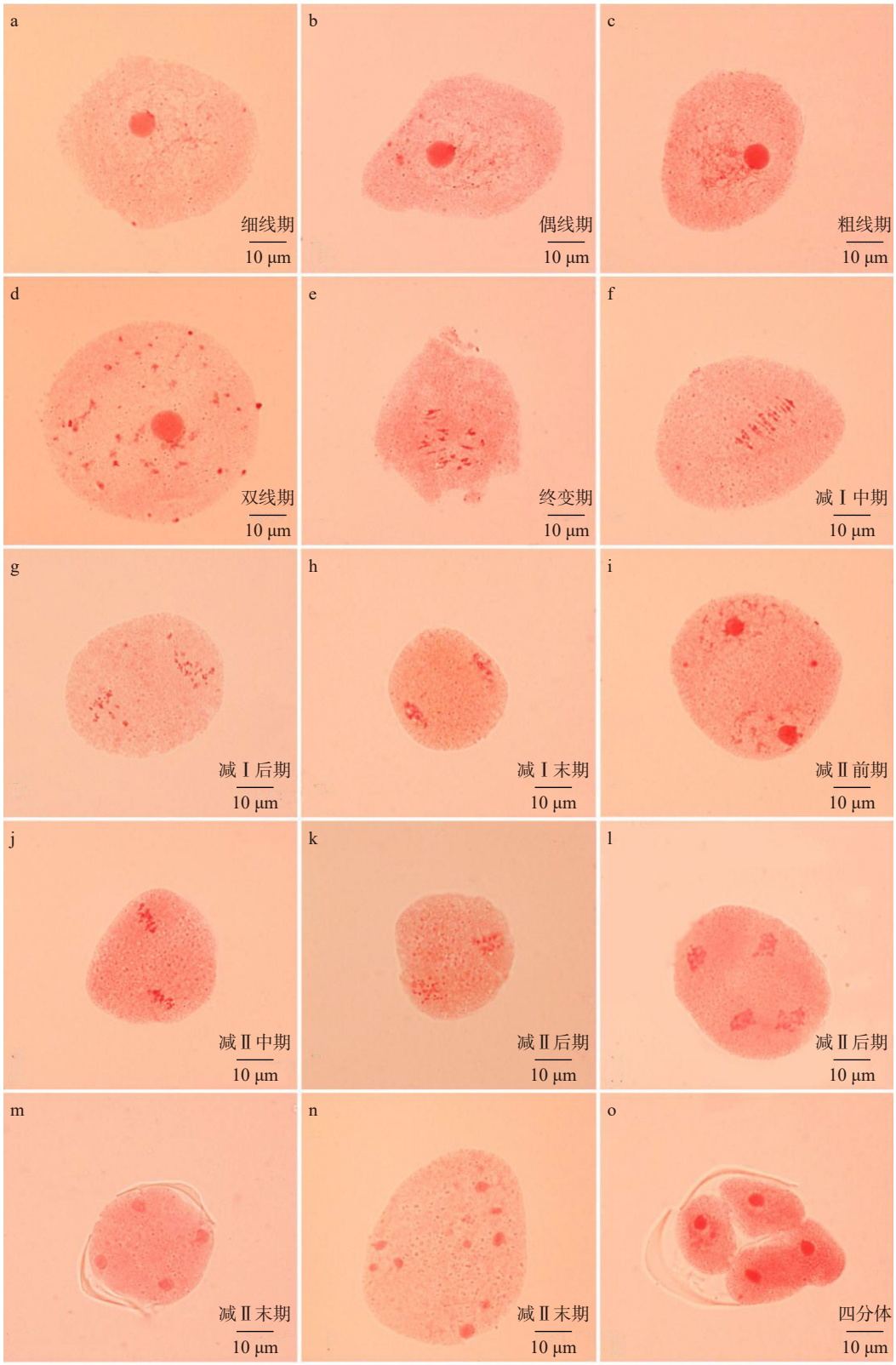


图 2　毛白杨花粉母细胞减数分裂进程

Fig. 2　Meiosis process of pollen mother cells in *P. tomentosa*

苗混合制样策略，利用流式细胞仪对所有杂交子代苗木进行倍性检测，若测试结果呈现两个显著峰值（图 6a），则进一步单独检测[7]，最终从中筛选出 1 株疑似三倍体植株（图 6b）。然后进一步通过染色体计数法验证其倍性水平，二倍体植株的染色体数目为 $2n = 2x = 38$（图 6c），子代植株体细胞染色体数目为 $2n = 3x = 57$（图 6d）时，即可确认为三倍体。本研究中检测出 1 株三倍体，来源于减数分裂 Ⅱ 中期时低温持续处理 2 d 所获得的 $2n$ 花粉与毛白杨雌株的杂交组合。

表 2 不同处理组合的 2*n* 花粉诱导率

Tab. 2 Induction rates of 2*n* pollen derived from different treatments

减数分裂时期	处理天数/d	2*n*花粉诱导率/%	处理编号
粗线期	1	1.36 ± 1.18	M1
	2	3.65 ± 1.58	M2
	3	3.17 ± 1.59	M3
终变期	1	4.67 ± 0.67	M4
	2	8.69 ± 5.96	M5
	3	4.45 ± 2.78	M6
减Ⅰ中期	1	2.60 ± 1.30	M7
	2	5.39 ± 2.45	M8
	3	4.13 ± 2.07	M9
减Ⅰ后期	1	5.51 ± 3.91	M10
	2	5.57 ± 2.69	M11
	3	3.44 ± 2.94	M12
减Ⅰ末期	1	2.90 ± 1.22	M13
	2	4.62 ± 2.86	M14
	3	3.30 ± 1.04	M15
减Ⅱ前期	1	2.88 ± 0.71	M16
	2	4.17 ± 3.61	M17
	3	2.78 ± 0.96	M18
减Ⅱ中期	1	5.11 ± 3.68	M19
	2	9.51 ± 1.33	M20
	3	5.50 ± 1.80	M21
减Ⅱ后期	1	3.33 ± 0.76	M22
	2	5.12 ± 3.33	M23
	3	2.83 ± 0.58	M24
减Ⅱ末期	1	2.38 ± 1.86	M25
	2	6.07 ± 1.52	M26
	3	4.50 ± 2.18	M27
对照	0	0.33 ± 0.24	CK

表 3 不同处理组合毛白杨 2*n* 花粉诱导率的方差分析

Tab. 3 Variance analysis on induction rates of pollen in *P. tomentosa* under different treatment combinations

变异来源	df	*F*	*P*
减数分裂时期	8	2.510	0.021*
处理天数	2	8.023	0.001**
减数分裂时期 × 处理天数	16	0.454	0.958

注：** 代表影响极显著（$P < 0.01$），* 代表影响显著（$P < 0.05$）。

表 4 不同减数分裂时期和不同处理天数毛白杨 2*n* 花粉诱导率的多重比较

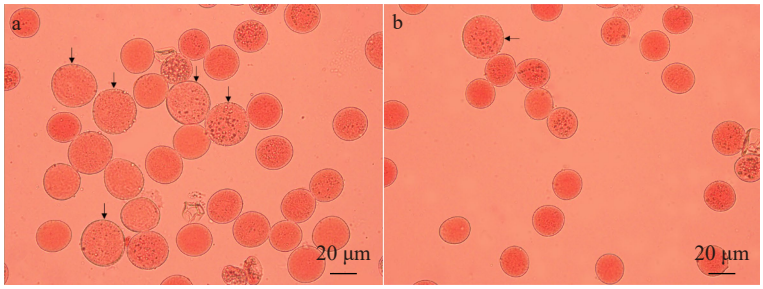
Tab. 4 Multiple comparisons in induction rates of 2*n* pollen under different meiotic stages and varied treating days in *P. tomentosa*

减数分裂时期	平均2*n*花粉诱导率/%	处理天数/d	平均2*n*花粉诱导率/%
粗线期	2.73 ± 1.64b	1	3.42 ± 2.17b
终变期	5.93 ± 3.90ab	2	5.87 ± 3.21a
减Ⅰ中期	4.04 ± 2.05b	3	3.79 ± 1.83b
减Ⅰ后期	4.84 ± 2.98ab		
减Ⅰ末期	3.61 ± 1.82b		
减Ⅱ前期	3.28 ± 2.02b		
减Ⅱ中期	6.71 ± 3.01a		
减Ⅱ后期	3.76 ± 2.02b		
减Ⅱ末期	4.32 ± 2.28b		

注：同列不同小写字母代表差异显著（$P < 0.05$）。

3 讨 论

林木多倍体在林业生产中占有重要地位，尤其是三倍体植株通常表现出速生、优质、高抗逆性等优点，在生产实践中具有重要的应用价值。人工诱导配子染色体加倍选育三倍体时，实现有效处理时期的即时判别是获得高频率 2*n* 配子，进而提高三倍体育种效率的关键[23]。诱导雌配子染色体加倍时，可通过雌花芽外部形态判断大孢子母细胞的发育进



黑色箭头指向为 2*n* 花粉。

图 3 毛白杨低温诱导型 2*n* 花粉（a）与对照组中天然 2*n* 花粉（b）

Fig. 3 Low temperature-induced 2*n* pollen (a) and natural 2*n* pollen (b) of control group in *P. tomentosa*

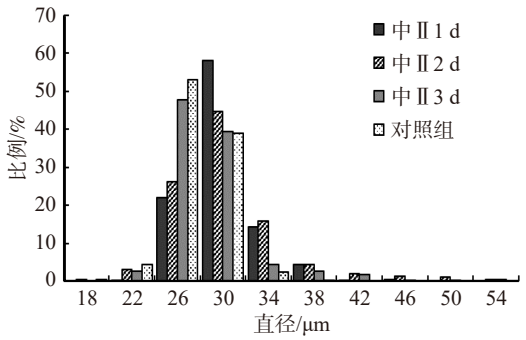


图 4　减数分裂Ⅱ中期处理组花粉与对照组花粉直径分布

Fig. 4　Pollen diameter distribution of metaphase Ⅱ treatment group and control group

程[24]。诱导花粉染色体加倍时，掌握花粉母细胞减数分裂规律有助于判别有效处理时期，可依据花芽外部形态以及花药颜色估测花粉母细胞所处减数分裂时期，省时省力。然而，由于不同树种甚至不同生长环境的同一树种，其减数分裂进程亦有所不同，因此区别具体树种，综合考虑种植环境等因素，开展详细的细胞学观察显得十分必要。本研究对山西朔州的毛白杨雄花芽开展了详尽的细胞学观察，结果表明，毛白杨花粉母细胞在温室水培条件下完成减数分裂约需 4 ~ 5 d，其减数分裂进程与雄花芽外部形态及花药颜色变化具有明显的对应关系。

利用理化方法人工诱导林木花粉染色体加倍获得 2*n* 花粉时，无论是采用物理方法还是化学方法进行诱导，减数分裂时期、持续处理时间和处理剂量等均是影响 2*n* 花粉发生频率的关键因素。周晴等[21]采用秋水仙碱处理诱导银灰杨产生 2*n* 花粉，发现减数分裂时期、注射次数以及减数分裂时期与注射次数之间的交互作用均对 2*n* 花粉诱导率有着极为显著的影响。发育至粗线期的花粉母细胞进行 11 次注射处理是最优处理组合，2*n* 花粉诱导率可达到 30.27%。毛彦科等[10]的研究亦表明，施加高温处理诱导杜仲 2*n* 花粉时，花粉母细胞减数分裂时期、处理温度和持续处理时间均对 2*n* 花粉诱导率有显著影响。在高温处理诱导牡丹产生未减数花粉研究中，40 ℃ 处理 4 h 为最优处理组合，2*n* 花粉诱导率高达 21.98%；而温度调整为 46 ℃ 时，同样处理 4 h，此时 2*n* 花粉诱导率仅为 6.04%[25]。本研究考虑了减数分裂时期和持续处理天数两个关键影响因素。研究结果显示，减数分裂时期与持续处理时间对毛白杨 2*n* 花粉诱导率有显著影响。当花粉母细胞发育至减数分裂Ⅱ中期时，运用 4 ℃ 低温对其进行持续处理 2 d 是低温处理诱导毛白杨产生 2*n* 花粉的最佳处理组合，诱导率最高可达 9.51%。尽管本研究利用 4 ℃ 低温处理毛白杨雄花芽诱导获得了一定比例的 2*n* 花粉，但 2*n* 花粉的诱导率明显偏低，可能与诱导技术条件不够优化有关。因此，在未来的研究中，如果需要获得更高频率的 2*n* 花粉，有必要进一步对低温处理诱导毛白杨花粉染色体加倍的技术条件进行优化。

微管骨架对环境条件和理化因子的反应十分敏感，短期低温能引起细胞骨架的广泛解聚，致使周期细胞的微管消失，从而引起染色体的正常排列秩序遭受破坏。Rikin 等[26]发现低温可诱导棉花（*Gossypium hirsutum*）叶片细胞微管解聚。玉米（*Zea mays*）的悬浮培养细胞在 4 ℃ 冷处理 3 d 后，约 90% 细胞中的微管几乎完全解聚[27]。胡萝卜（*Daucus carota*）细胞在低温悬浮培养中，90% 以上的皮质微管在 1 h 内消失[28]。西瓜（*Citrullus lanatus*）微管在低温处理下亦出现解聚现象，通过自身结构的动态改变来适应外界环境[29]。De Storme 等[12]利用 4 ℃ 低温对正在开花的拟南芥进行 20 ~ 40 h 的持续胁迫处理，可干扰花粉母细胞减数分裂Ⅱ末期辐射状微管的形成，造成减数分裂后细胞板形态建成失败。本研究中，毛白杨花粉母细胞经 4 ℃ 低温胁迫处理 3 d 后，发育至减数分裂Ⅱ末期的花粉母细胞相邻子核之间的辐射状微管亦呈现部分缺失现象，从而引起细胞质分裂异常，导致细胞板形态建成失败，这可能就是低温诱导毛白杨产生 2*n* 花粉的细胞学机理。

4　结　　论

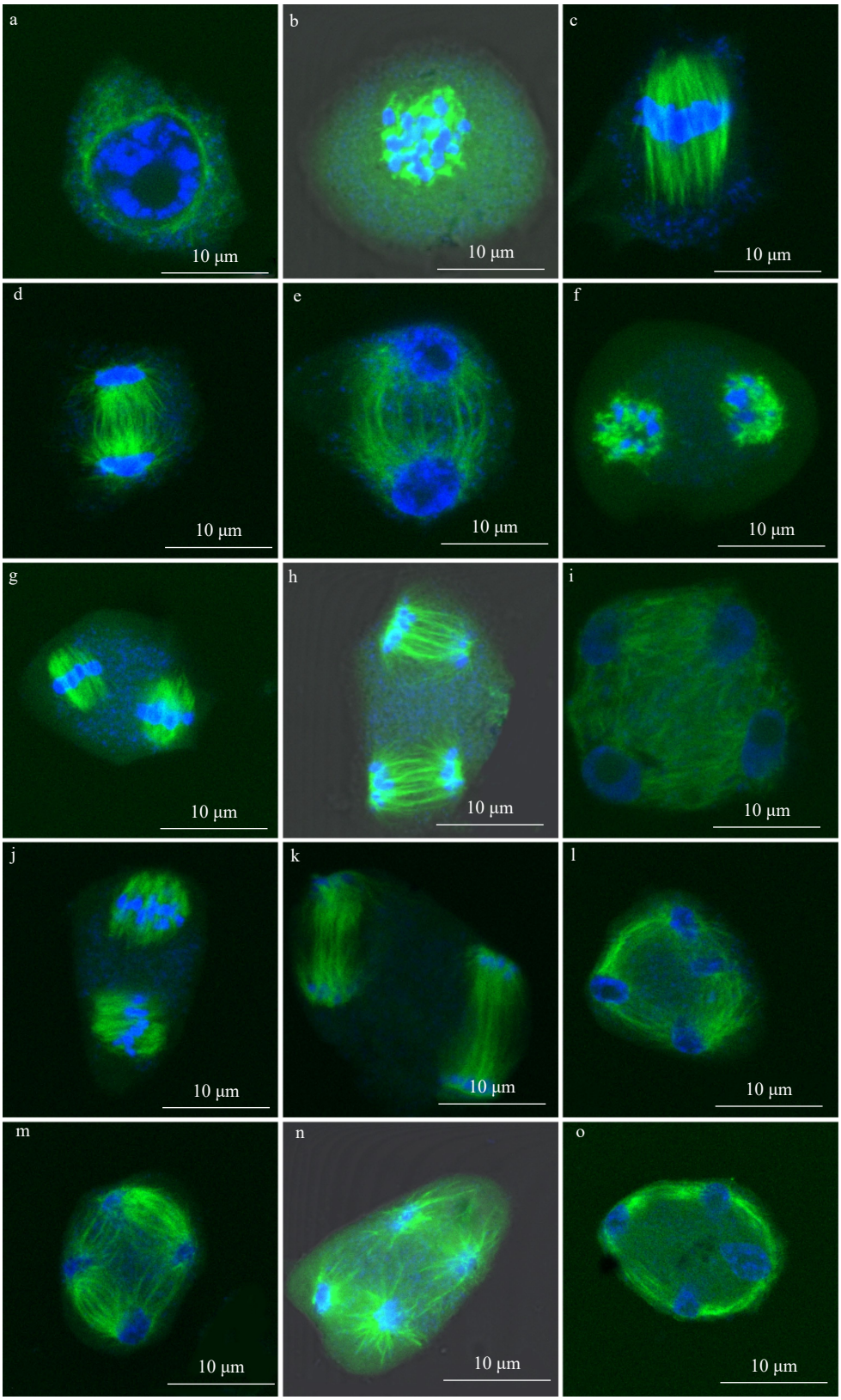
本研究选择以山西朔州的毛白杨为研究对象，针对低温诱导花粉染色体加倍选育三倍体的可行性问题，利用醋酸洋红染色法、免疫荧光技术等方法，开展了毛白杨花芽外部形态与花粉母细胞减数分裂进程观察，低温诱导花粉染色体加倍获得 2*n* 花粉，低温处理对毛白杨花粉母细胞减数分裂微管骨架的影响，低温诱导型 2*n* 花粉与毛白杨雌配子杂交创制三倍体等研究。研究得到以下结论。

（1）毛白杨花粉母细胞在温室水培条件下完成减数分裂约需 4 ~ 5 d，其减数分裂进程与雄花芽外部形态及花药颜色变化具有明显的对应关系。

（2）当花粉母细胞发育至减数分裂Ⅱ中期时，持续施加 2 d 低温处理，可获得最佳加倍效果，其 2*n* 花粉诱导率可达 9.51%。

（3）进一步对不同处理组合的 2*n* 花粉诱导率进行差异显著性分析，结果表明减数分裂时期和处理天数均对毛白杨 2*n* 花粉诱导率具有显著影响。

（4）微管蛋白免疫荧光标记结果显示，低温处理后的花粉母细胞发育至减数分裂Ⅱ末期时，相邻核之间的微管受到破坏。



a. 减数分裂前期; b. 终变期; c. 减Ⅰ中期; d. 减Ⅰ后期; e. 减Ⅰ末期; f. 减Ⅱ前期; g. 减Ⅱ中期; h. 减Ⅱ后期; i. 减Ⅱ末期; j. 低温处理后的减Ⅱ中期; k. 低温处理后的减Ⅱ后期; l～o. 低温处理后的异常减Ⅱ末期。

图 5 毛白杨花粉母细胞减数分裂过程中微管骨架的动态变化

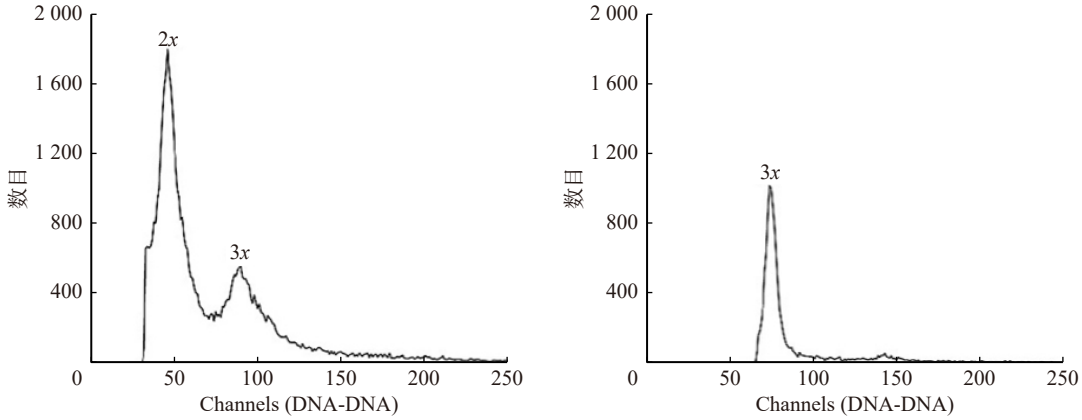
Fig. 5 Dynamic changes of microtubule skeleton during meiosis of PMCs in *P. tomentosa*

(5)利用高频率的低温诱导型 2*n* 花粉与毛白杨雌配子杂交获得杂交子代，经流式细胞仪和染色体计数检测获得三倍体 1 株，验证了低温诱导毛白杨花粉染色体加倍选育三倍体的有效性。研究结果对于丰富林木三倍体育种理论，开发新型林木 2*n* 配子诱变剂等具有重要意义。

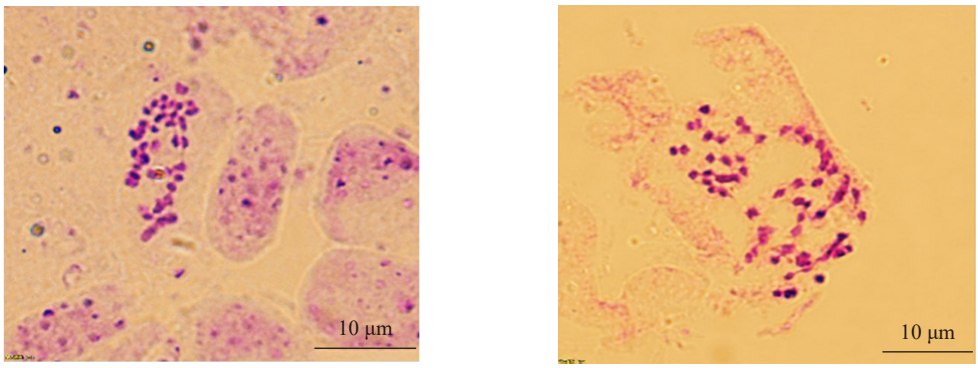
表 5　低温诱导型毛白杨 2*n* 花粉与毛白杨雌配子（SX-1）杂交创制三倍体

Tab. 5　Crossing 2*n* pollen induced by low temperature in *P. tomentosa* with female gametes in *P. tomentosa* (SX-1) to produce triploids

序号	2*n*花粉诱导率/%	杂交组合	种子数	成苗数	三倍体数
1	9.51	SX-1 × M20	666	197	1
2	8.69	SX-1 × M5	490	110	0
3	6.07	SX-1 × M26	1 363	112	0
4	5.57	SX-1 × M11	19	1	0
5	5.51	SX-1 × M10	471	81	0
6	5.50	SX-1 × M21	55	3	0
7	5.39	SX-1 × M8	79	7	0
8	5.12	SX-1 × M23	792	99	0
对照	0.33	SX-1 × CK	127	8	0
总计			4 062	618	1



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　　d 三倍体染色体

图 6　低温诱导毛白杨花粉染色体加倍子代的倍性分析

Fig. 6　Ploidy analysis of offsprings derived from pollen chromosome doubling induced by low temperature

参　考　文　献

［1］ 康向阳, 王君. 杨树多倍体诱导技术研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.
Kang X Y, Wang J. Poplar polyploid induction technology research[M]. Beijing: Science Press, 2010.

［2］ 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, 2010, 32(5): 149−153.
Kang X Y. Some understandings on polyploid breeding of poplars[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2010, 32(5): 149−153.

［3］ 康向阳. 林木多倍体育种研究进展 [J]. 北京林业大学学报, 2003, 25(4): 70−74.
Kang X Y. Advances in researches on polyploid breeding of forest trees[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2003, 25(4): 70−74.

［4］ 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.
Kang X Y, Zhu Z T, Zhang Z Y. Breeding of triploids by the reciprocal crossing of *Populus alba* × *P. glandulosa* and *P. tomentosa* × *P. bolleana*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2000, 22(6): 8−11.

［5］ 朱之悌. 三倍体毛白杨新品种简介 [J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(增刊 1): 60−62.
Zhu Z T. Introduction of new triploid *Populus tomentosa*

varieties[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2002, 24(Suppl.1): 60−62.

[6] 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): 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 Agricultural Sciences, 2014, 28(5): 749−756.

[7] 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.

[8] 刘钊, 熊涛, 赵英伟, 等. 秋水仙碱诱导粗皮桉花粉染色体加倍研究 [J]. 核农学报, 2021, 35(12): 2704−2715.
Liu Z, Xiong T, Zhao Y W, et al. Pollen chromosome doubling induced by colchicine in *Eucalyptus pellita*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(12): 2704−2715.

[9] Tian M D, Zhang Y, Liu Y, et al. High temperature exposure did not affect induced 2*n* pollen viability in *Populus*[J]. Plant Cell & Environment, 2018, 41(6): 1383−1393.

[10] 毛彦科, 张平冬, 石乐, 等. 高温诱导杜仲 2*n* 花粉最佳处理条件研究 [J]. 北京林业大学学报, 2013, 35(1): 53−58.
Mao Y K, Zhang P D, Shi L, et al. The optimum conditions for inducing 2*n* pollen chromosome doubling by high temperature in *Eucommia ulmoides*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2013, 35(1): 53−58.

[11] Yann P, 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.

[12] de Storme N, Copenhaver G P, Geelen D. Production of diploid male gametes in *Arabidopsis* by cold-induced destabilization of postmeiotic radial microtubule arrays[J]. Plant Physiology, 2012, 160(4): 1808−1826.

[13] Yamada A, Tao R, Sugiura A. Influence of low temperature before flowering on the occurrence of unreduced pollen in Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.)[J]. HortScience, 2005, 40(1): 24−28.

[14] 张新忠, 刘国俭, 闫立英, 等. 热激或低温诱导辣椒产生 2*n* 花粉的细胞遗传学机理 [J]. 河北农业科学, 2003, 7(3): 7−13.
Zhang X Z, Liu G J, Yan L Y, et al. Cytogenetic mechanism of 2*n* pollen formation induced with heat-shock or low temperature in *Capsicum annuum* L.[J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2003, 7(3): 7−13.

[15] 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.

[16] Bajer A. Cine-micrographic studies on dicentric chromosomes[J]. Chromosoma, 1965, 15(5): 630−651.

[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.
Lu M. Techniques of triploid and teraploid induction in *Populus adenopoda* Maxim. [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2013.

[18] Orjeda G, Freyre R, Iwanaga M. Production of 2*n* pollen in diploid *Ipomoea trifida*, a putative wild ancestor of sweet potato[J]. Journal of Heredity, 1990, 81(6): 462−467.

[19] 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 abnormities during microsporogenesis in *Populus euphratica*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2013, 33(11): 2166−2171.

[20] 康向阳. 毛白杨细胞遗传与三倍体选育 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
Kang X Y. Cytogenetics and triploid breeding of *Populus tomentosa*[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002.

[21] 周晴, 吴剑, 桑亚茹, 等. 秋水仙碱处理诱导银灰杨 2*n* 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 Q, Wu J, Sang Y R, 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.

[22] 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 reseaches[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2006, 43(4): 574−576.

[23] 康向阳. 林木三倍体育种研究进展及展望 [J]. 中国科学: 生命科学, 2020, 50(2): 136−143.
Kang X Y. Research progress and prospect of triploid breeding of forest trees[J]. Scientia Sinica Vitae, 2020, 50(2): 136−143.

[24] Lu M, Zhang P D, Kang X Y. Induction of 2*n* female gametes in *Populus adenopoda* Maxim. by high temperature exposure during female gametophyte development[J]. Breeding Science, 2013, 63(1): 96−103.

[25] 程世平, 姚鹏强, 耿喜宁, 等. 高温诱导牡丹产生未减数花粉 [J]. 园艺学报, 2022, 49(3): 581−589.
Cheng S P, Yao P Q, Geng X N, et al. High temperature treatment generates unreduced pollen in *Paeonia suffruticosa*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(3): 581−589.

[26] Rikin A, Dan A, Carlos G. Chilling injury in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): effects of antimicrotubular drugs[J]. Plant and Cell Physiology, 1980, 21: 829−837.

[27] Chu B, Xin Z, Li P H, et al. Depolymerization of cortical microtubules is not a primary cause of chilling injury in corn suspension culture cells[J]. Plant Cell and Environment, 1992, 15: 307−312.

[28] Okamura S, Kakiuchi M, Sano A, et al. Loss of tubulin during cold treatment of cultured carrot cells[J]. Physiologia Plantarum, 1993, 88(1): 93−98.

[29] 王静. 不同温度胁迫下西瓜细胞水平的抗性机制研究 [D]. 海口: 海南大学. 2015.
Wang J. Study for resistance mechanism of watermelon under different temperature stress at cell level[D]. Haikou: Hainan University, 2015.

（责任编辑 赵田芸
责任编委 张建国）