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技术体系的优化

杜嘉华 解云云 龙美玲 孔博 马乐洵 赵雅琦 赵元芹 张平冬 康向阳

Technical systemic optimization of pollen chromosome doubling induced by low temperature in *Populus tomentosa*

Du Jiahua, Xie Yunyun, Long Meiling, Kong Bo, Ma Lexun, Zhao Yaqi, Zhao Yuanqin, Zhang Pingdong, Kang Xiangyang

引用本文:
杜嘉华, 解云云, 龙美玲, 孔博, 马乐洵, 赵雅琦, 赵元芹, 张平冬, 康向阳. 低温诱导毛白杨花粉染色体加倍技术体系的优化[J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(9):80–89. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250158
Du Jiahua, Xie Yunyun, Long Meiling, Kong Bo, Ma Lexun, Zhao Yaqi, Zhao Yuanqin, Zhang Pingdong, Kang Xiangyang. Technical systemic optimization of pollen chromosome doubling induced by low temperature in *Populus tomentosa*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(9):80–89. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250158

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250158

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

低温诱导毛白杨花粉染色体加倍选育三倍体

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

北京林业大学学报, 2025, 47(5): 26–36. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250018

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

高温诱导银灰杨花粉败育的细胞学机理研究

Cytological mechanism of pollen abortion induced by high temperature in *Populus canescens*

北京林业大学学报, 2023, 45(5): 25–34. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210498

赤霉素喷洒处理诱导新疆杨2*n*花粉产生及其对微管骨架的影响

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

北京林业大学学报, 2023, 45(1): 40–50. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210449

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

‘正午’牡丹染色体预处理方法优化和在核型分析中的应用

Optimization of chromosome pretreatment method and its application in karyotype analysis of *Paeonia* × *lemoinei* ‘High Noon’

北京林业大学学报, 2021, 43(5): 118–126. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200301

DOI:10.12171/j.1000−1522.20250158

低温诱导毛白杨花粉染色体加倍技术体系的优化

杜嘉华[1,2] 解云云[1,2] 龙美玲[1,2] 孔 博[1,2] 马乐洵[1,2] 赵雅琦[1,2]
赵元芹[3] 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；3. 冠县林业服务中心，山东 冠县 252500）

摘要:【目的】确定低温诱导毛白杨花粉染色体加倍获得 2*n* 花粉的适宜温度范围，提高 2*n* 花粉诱导效率，优化完善低温诱导毛白杨花粉染色体加倍选育林木多倍体的技术体系。**【方法】**本研究以山西朔州的毛白杨雄花枝为试验材料，利用醋酸洋红染色法，在探究毛白杨雄花芽不同发育时期对低温敏感性差异的基础上，开展低温诱导毛白杨花粉染色体加倍技术条件的优化研究；利用获得的低温诱导型 2*n* 花粉与毛白杨、银腺杨雌株进行授粉杂交，通过流式细胞术和体细胞染色体计数法检测倍性。**【结果】**(1)相较于花粉母细胞时期，处于减数分裂阶段的毛白杨花粉母细胞对低温更加敏感，低温处理诱导毛白杨产生 2*n* 花粉的适宜温度范围为−13 ~ −7 ℃；(2)处理温度、减数分裂时期和持续处理时长均对毛白杨 2*n* 花粉诱导率具有极显著影响，确定了利用−13 ℃ 的低温对发育至减数分裂 II 中期的花粉母细胞进行 5 h 的持续处理是低温诱导毛白杨花粉染色体加倍的最佳处理组合，其 2*n* 花粉诱导率可达(31.11 ± 2.93)%；(3)利用高频率的低温诱导型 2*n* 花粉分别与毛白杨、银腺杨单倍性雌配子进行授粉杂交，成功获得 26 株三倍体。**【结论】**本研究优化并完善了低温诱导毛白杨花粉染色体加倍选育三倍体的技术体系，提高了 2*n* 花粉诱导率，并通过低温诱导型 2*n* 花粉杂交获得了 26 株三倍体，建立了一种高效稳定的林木三倍体诱导方法。研究结果将为推动林木三倍体育种理论和技术的发展奠定重要的基础。

关键词：毛白杨；低温；染色体加倍；2*n* 花粉；花粉败育；三倍体育种；遗传改良
中图分类号：S792.11 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2025)09−0080−10
引文格式：杜嘉华，解云云，龙美玲，等. 低温诱导毛白杨花粉染色体加倍技术体系的优化［J］. 北京林业大学学报，2025，47(9)：80−89. Du Jiahua, Xie Yunyun, Long Meiling, et al. Technical systemic optimization of pollen chromosome doubling induced by low temperature in *Populus tomentosa*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(9): 80−89.

Technical systemic optimization of pollen chromosome doubling induced by low temperature in *Populus tomentosa*

Du Jiahua[1,2] Xie Yunyun[1,2] Long Meiling[1,2] Kong Bo[1,2] Ma Lexun[1,2] Zhao Yaqi[1,2]
Zhao Yuanqin[3] 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;
3. Guanxian Forestry Service Center, Guanxian 252500, Shandong, China)

Abstract: [**Objective**] This paper aims to determine the appropriate temperature range for low-temperature-induced chromosome doubling in pollen of *Populus tomentosa* to enhance the induction rate of 2*n* pollen, thereby improving polyploid breeding technology system of forest through inducing pollen chromosome

收稿日期: 2025−05−06 **修回日期:** 2025−07−14
基金项目: “十四五”国家重点研发计划(2021YFD2200105)。

第一作者: 杜嘉华。主要研究方向：林木细胞遗传与细胞工程。Email: dujiahua@bjfu.edu.cn 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

doubling of *P. tomentosa* by low temperature. [**Method**] Based on an investigation of differential sensitivity at different developmental stages of male flower buds to low temperature in *P. tomentosa*, aceto-carmine staining method was used, the experimental conditions for inducing 2*n* pollen by low temperature were systematically optimized by taking male floral branches of *P. tomentosa* collected from Shuozhou, Shanxi Province of northern China. Furthermore, triploids were generated by pollinating the obtained low-temperature-induced 2*n* pollen with female *P. tomentosa* and *Populus alba* × *P. glandulosa,* and were determined by flow cytometry and somatic chromosome counting. [**Result**] (1) Compared with pollen mother cell stage, pollen mother cells (PMCs) of *P. tomentosa* at meiotic stage exhibited higher sensitivity for low temperature. The optimal temperature for inducing 2*n* pollen ranged from −13 to −7 ℃. (2) The dominant meiotic stage, temperature, and duration significantly affected the induction rate of low temperature-induced 2*n* pollen. The optimal treatment combination for inducing pollen chromosome doubling in *Populus tomentosa* by low temperature was determined to be 5 h of continuous treatment of pollen mother cells at −13 ℃ during metaphase II. The highest induction rate of 2*n* pollen was (31.11 ± 2.93)%. (3) Twenty-six triploids were produced by crossing low temperature-induced 2*n* pollen with haploid female gametes of *P. tomentosa* and *Populus alba* × *P. glandulosa*. [**Conclusion**] In this study, to increase induction rate of 2*n* pollen, the technical system for inducing pollen chromosome doubling by low temperature in *P. tomentosa* has been optimized and 26 triploids were produced by crossing low temperature-induced 2*n* pollen. Therefore, an efficient and stable method to produce triploids for woody plants is established. These results lay a solid foundation for the development of theoretical frameworks and technical applications in triploid breeding of forest trees.

Key words: *Populus tomentosa*; low temperature; chromosome doubling; 2*n* pollen; pollen abortion; triploid breeding; genetic improvement

毛白杨(*Populus tomentosa*)是杨柳科(Salicaceae)杨属的落叶乔木，广泛分布于黄河中下游流域、华北及西北地区，是我国特有的乡土树种。其具有生长快、材质好、树干挺拔、冠形优美和适应性强等特点，是黄淮海平原区速生用材林、农田防护林网以及城乡绿化的重要造林树种之一[1]，具有重要的生态与经济价值。毛白杨遗传改良尤其是三倍体育种研究具有重要的理论和实践价值。与二倍体相比，三倍体毛白杨具有材积生长量大、纤维长、木质素含量低、纤维素含量高等优良特性，在生长、材性和抗逆性等方面具有突出优势，是纤维工业原料林建设的适宜品种[2−3]。

人工诱导花粉染色体加倍与单倍性雌配子进行杂交是创制林木三倍体新种质的一条重要途径。低温作为一种重要的物理诱变因子，在诱导高等植物产生 2*n* 配子过程中发挥了重要作用。目前，低温已被成功应用于辣椒(*Capsicum annuum*)[4]、日本柿子(*Diospyros kaki*)[5]、小叶盾薯蓣(*Dioscorea esculenta*)[6]、油菜(*Brassica napus*)[7]及拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)[8]等植物的花粉染色体加倍研究中，并诱导获得了一定比例的 2*n* 花粉。近年来，龙美玲等[9]利用 4 ℃ 低温，对处于不同减数分裂时期的毛白杨雄花芽进行 2～4 h 的持续处理，开展了低温诱导毛白杨花粉染色体加倍选育三倍体的研究。实验结果表明，利用 4 ℃ 低温对发育至减数分裂 II 中期的毛白杨雄花芽施加 2 d 的持续处理，2*n* 花粉诱导率最高可达 9.51%，这证明了低温诱导毛白杨花粉染色体加倍的可行性。但由于该诱导实验仅设置了 1 个温度梯度(4 ℃)，未对最佳处理温度进行筛选，使得低温诱导毛白杨花粉染色体加倍技术体系仍不完善，从而导致 2*n* 花粉诱导率偏低，难以满足三倍体育种实践的要求。因此，开展低温诱导毛白杨花粉染色体加倍技术体系的优化研究，进一步优化影响 2*n* 花粉诱导率的关键因素(如处理温度、持续处理时间以及有效处理时期)是非常必要的。

基于上述研究背景和技术挑战，本研究拟以山西朔州的毛白杨雄株无性系为试材，在探究毛白杨雄花芽不同发育时期对低温的敏感性差异的基础上，开展低温诱导毛白杨花粉染色体加倍的技术条件优化研究，旨在提高低温诱导型 2*n* 花粉比例。研究结果将对丰富林木三倍体育种理论，促进林木三倍体诱导技术发展等具有重要的理论与实践意义。

1　材料与方法

1.1　试验材料

本研究所用材料包括毛白杨雄株无性系 SX-

145、毛白杨雌株无性系(SX-121)、银腺杨(*Populus alba* × *P. glandulosa*)‘84K’雄株无性系和银腺杨雌株无性系 YX2 的花枝。其中 SX-145 和 SX-121 的花枝采自于山西省朔州市朔城区金沙植物园，银腺杨‘84K’和 YX2 的花枝采自山东省聊城市国有冠县毛白杨林场。2023 年和 2024 年 1 月上旬，采集粗约 1.5 cm、长约 70 cm 的花枝，用塑料布包裹，运送至北京林业大学温室，置于阴凉避风处保存备用。

1.2 研究方法

1.2.1 毛白杨雄花芽对低温处理的敏感性测试

将毛白杨 SX-145 雄花枝分为两组，分别水培于 10～20 ℃ 的温室。当雄花芽处于花粉母细胞时期或进入减数分裂后，分别将花枝放置于−7、−10、−13、−15 ℃ 的冰箱内，持续处理 3、4 和 5 h。试验重复 3 次，每处理重复 2～3 个花枝。低温处理后的花枝继续水培于温室，一周后分别统计花芽死亡率。存活的花芽培养至花药成熟开裂，不同处理组合分别收集花粉，经硅胶干燥后保存于−20 ℃ 冰箱，用于统计败育花粉比例。

用镊子分别夹取不同处理组合的少量花粉，涂撒在滴有 100 μL 醋酸洋红的载玻片上，制作成 3～5 张临时制片。然后将临时制片放置于 Olympus BX-61 光学显微镜下，每张临时制片随机挑选 5～8 个视野进行观察拍照，败育花粉的观察和统计参考李智群等[10]方法。试验重复 3 次，每次重复需统计 200～300 个花粉粒。

1.2.2 低温诱导毛白杨花粉染色体加倍技术条件的优化

对毛白杨 SX-145 进行修剪，保留枝条上形态大小近似的雄花芽，并水培于 10～20 ℃ 的温室。待雄花芽开始进入减数分裂后，每次间隔 2 h 随机采集 2～3 个花芽，经新配制的卡诺固定液固定后，利用醋酸洋红压片法和 Olympus BX - 61 光学显微镜进行减数分裂进程观察。染色体制片的具体操作参照鲁敏[11]方法。当观察到雄花芽中大多数花粉母细胞进入减数分裂Ⅰ中期、Ⅱ前期、Ⅱ中期、Ⅱ后期、Ⅱ末期时，按照完全随机区组设计，分别取 6～9 枝处于同一发育阶段的雄花枝分别放置于−7、−10、−13 ℃ 的冰箱内，分别进行 3、4 和 5 h 的低温处理。试验重复 3 次，共计 45 个处理组合，每个处理重复 2～3 个花枝，每花枝保留 15～20 个花芽。经低温处理后的雄花枝继续水培于温室直至花粉成熟，分别收集花粉，经硅胶干燥后放置于−20 ℃ 冰箱保存待用。试验保留少量未经低温处理的雄花枝作为对照。为验证低温诱导杨树雄花芽产生 2*n* 花粉技术的通用性，以银腺杨‘84K’雄花枝为实验材料，前期处理和毛白杨 SX-145 完全相同，当花粉母细胞进入减数分裂Ⅱ中期时，运用−13 ℃ 低温分别对雄花芽进行 3、4 和 5 h 的持续处理，同样收集各处理组合花粉。

1.2.3 2*n* 花粉诱导率的统计

从各低温处理组合中随机夹取少量花粉样本，均匀撒布于滴加有 100 μL 醋酸洋红染色液的载玻片上，制备成临时涂片。然后将临时涂片置于 Olympus BX - 61 光学显微镜下，每张临时涂片随机挑选 5～8 个视野进行观察拍照，进一步利用 Image J 软件进行花粉粒直径测量[12]。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[13]，统计每个视野中总花粉粒数与 2*n* 花粉粒的数量，计算出不同处理组合的 2*n* 花粉诱导率。试验重复 3 次，每次重复测量 200～300 个花粉粒。

1.2.4 授粉杂交与播种育苗

当温室水培的毛白杨无性系 SX-121 和银腺杨无性系 YX2 雌花序柱头发育至最佳授粉期时，选取 2*n* 花粉诱导率相对高的处理组花粉和对照组花粉，使用毛笔将其均匀涂抹于柱头。授粉后的毛白杨、银腺杨雌花枝继续水培至蒴果成熟，套袋收集种子。随后将种子点播于盛满基质的 50 孔穴盘，每孔播种 1～2 粒种子，并用插签标注处理组合。播种完成后，将育苗盘置于托盘内，移入温室进行培育管理。

1.2.5 杂交子代苗木倍性检测

当幼苗苗高约 10 cm 时，利用流式细胞仪进行杂交子代的倍性水平检测。具体方法如下：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[14]，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，使用流式细胞仪进行倍性检测。经流式细胞仪检测初步确定的疑似三倍体植株需进行体细胞染色体计数以验证其倍性水平。染色体计数的具体操作步骤可参照周晴等[12]方法。

1.2.6 数据统计

由于 2*n* 花粉诱导率与败育花粉比例等百分比数据不符合正态分布，故需事先进行倒数转换以满足统计分析需求，然后采用 SPSS18.0 统计分析软件进行差异显著性分析与 LSD 多重比较。

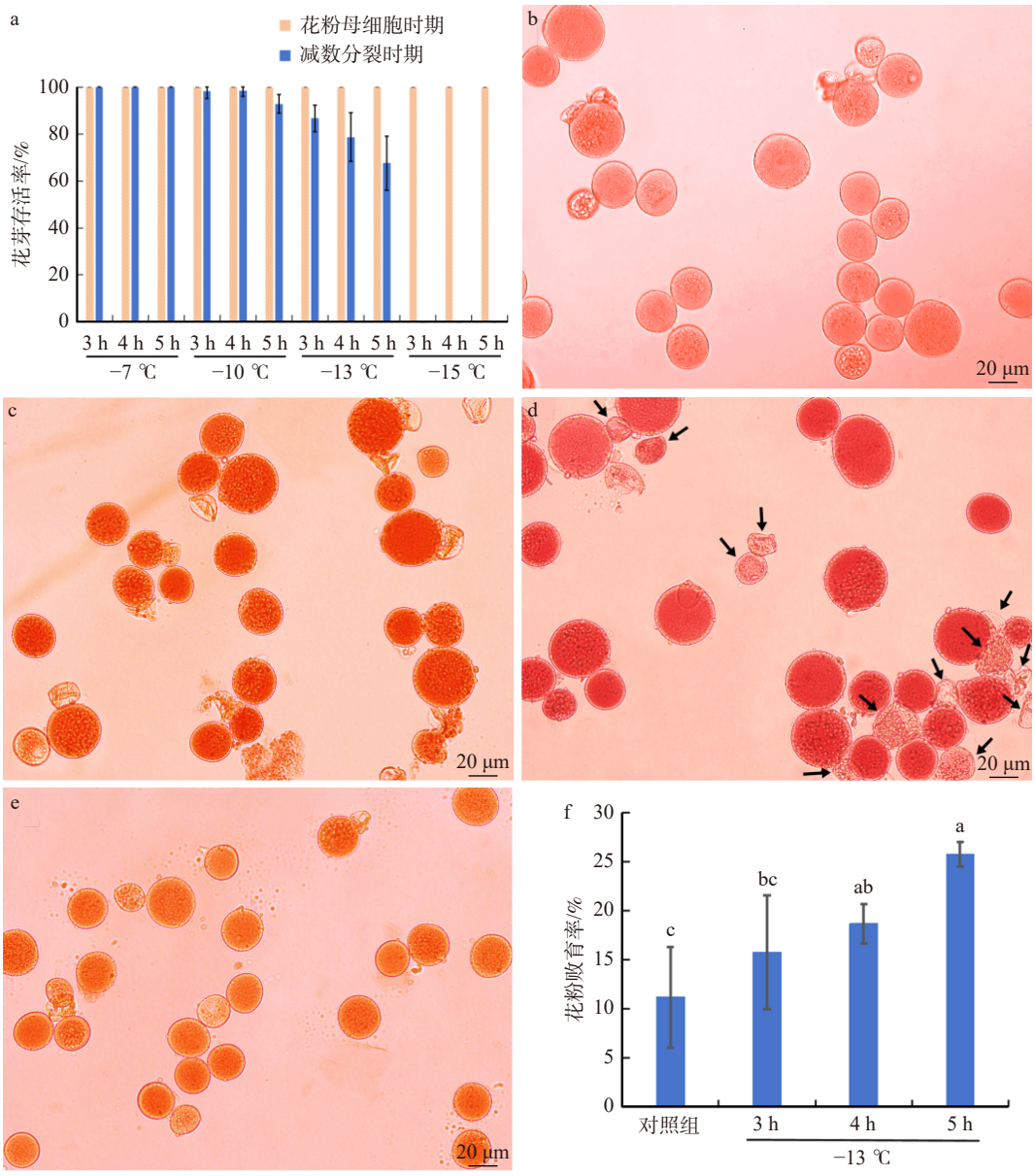
2 结果与分析

2.1 毛白杨雄花芽不同发育时期对低温处理的敏感性差异

毛白杨雄花芽未进入减数分裂前，即处于花粉母细胞时期，利用−15～−7 ℃ 的低温对其进行不同时间的持续低温处理，经不同低温处理后的雄花枝继续水培于温室，雄花芽能够继续发育，未观察到低

温致死的情况，花芽存活率达 100.0%（图 1a），表明持续低温处理不会对处于花粉母细胞时期的毛白杨雄花芽造成明显的伤害。然而，当毛白杨雄花芽进入减数分裂后，经低温处理的花粉母细胞发育速度明显减缓，部分花芽因低温伤害致死。−7 ℃ 低温分别处理 3、4 和 5 h 后，雄花芽未见明显伤害，花芽均继续发育；−10 ℃ 低温持续处理 3 h 后，雄花芽开始出现死亡现象，花芽存活率为（98.25 ± 3.04）%；随着处理温度降低和处理时间的延长，花芽死亡率持续上升，−13 ℃ 低温持续处理 5 h 的花芽存活率仅为（67.64 ± 11.55）%；当温度降低至−15 ℃ 时，处理后的雄花芽全部死亡（图 1a）。这说明相较于花粉母细胞时期，处于减数分裂阶段的毛白杨雄花芽对环境温度变化更为敏感。

将存活的毛白杨雄花芽置于温室继续水培至花粉成熟，分处理收集花粉。经醋酸洋红染色后，各处理组的花粉中均可观察到大量着色浅的败育花粉（图 1b ~ d）。尽管对照组花粉中亦可观察到一定数量的败育花粉（图 1e），但其花粉败育率明显低于处理组。随着处理温度的降低和持续处理时间的延长，各低温处理组合的花粉败育率均有所增加。当毛白杨花粉母细胞发育至减数分裂 II 中期时，利用−13 ℃ 低温持续处理 3 h 组合的败育花粉率为（15.77 ± 5.14）%，显著低于持续处理 5 h 组合的败育率（图 1f）。综合考虑低温处理对毛白杨雄花芽的致死和花粉败育双重效应，确定了低温处理诱导毛白杨花粉染色



a. 低温胁迫下毛白杨无性系 SX-145 不同时期雄花芽存活率；b、c、d 分别为−13 ℃ 处理 3、4 和 5 h 的花粉；e. 对照组花粉；f. −13 ℃ 低温处理不同时间后花粉败育率。图中箭头指向败育花粉，不同的小写字母表示不同处理组存在显著差异（$P < 0.05$）。

图 1　低温胁迫下毛白杨无性系 SX-145 雄花芽存活率和花粉败育情况

Fig. 1　Survival rates and pollen abortion condition of male flower buds in *Populus tomentosa* clone SX-145 under low temperature stress

体加倍的适宜温度范围为−13 ~ −7 ℃。

2.2 低温诱导毛白杨花粉染色体加倍技术条件的优化

当观察到大部分花粉母细胞进入减数分裂 I 中期、II 前期、II 中期、II 后期、II 末期时，将毛白杨雄花枝分别用−7、−10 和−13 ℃ 的温度进行 3、4 和 5 h 的持续处理，各处理组合均可诱导花粉染色体加倍获得 2*n* 花粉(图 2)，不同处理组合 2*n* 花粉诱导率统计结果见表 1。对照组中有少量天然 2*n* 花粉存在(图 2a)，但其 2*n* 花粉仅占 0.48%。各低温处理组中，低温诱导型 2*n* 花粉的诱导率介于 1.26% ~ 31.11% 之间(图 2b ~ d)。其中，当花粉母细胞进入减数分裂 II 末期时，利用−7 ℃ 低温持续处理 3 h 的 2*n* 花粉诱导率最低，为(1.26 ± 0.27)%；花粉母细胞发育至减数分裂 II 中期时，利用−13 ℃ 低温持续处理 5 h 的 2*n* 花粉诱导率最高，达(31.11 ± 2.93)%。不同低温处理组合 2*n* 花粉诱导率的差异显著性分析结果(表 2)表明，处理温度($F = 30.656$，$P < 0.001$)、减数分裂时期($F = 19.804$，$P < 0.001$)和持续处理时长($F = 5.554$，$P = 0.005$)均对 2*n* 花粉诱导率具有极显著影响。进一步的多重比较结果(表 3)显示：−13 ℃ 低温处理的平均 2*n* 花粉诱导率显著高于−7 和−10 ℃ 处理；减数分裂 II 中期的平均 2*n* 花粉诱导率显著高于其他分裂时期；低温持续处理 5 h 的平均 2*n* 花粉诱导率高于其他时间处理，其中显著高于 3 h 处理。综合以上结果，确定了利用−13 ℃ 的低温对发育至减数分裂 II 中期的花粉母细胞进行 5 h 的持续处理是低温诱导毛白杨花粉染色体加倍的最佳处理组合。

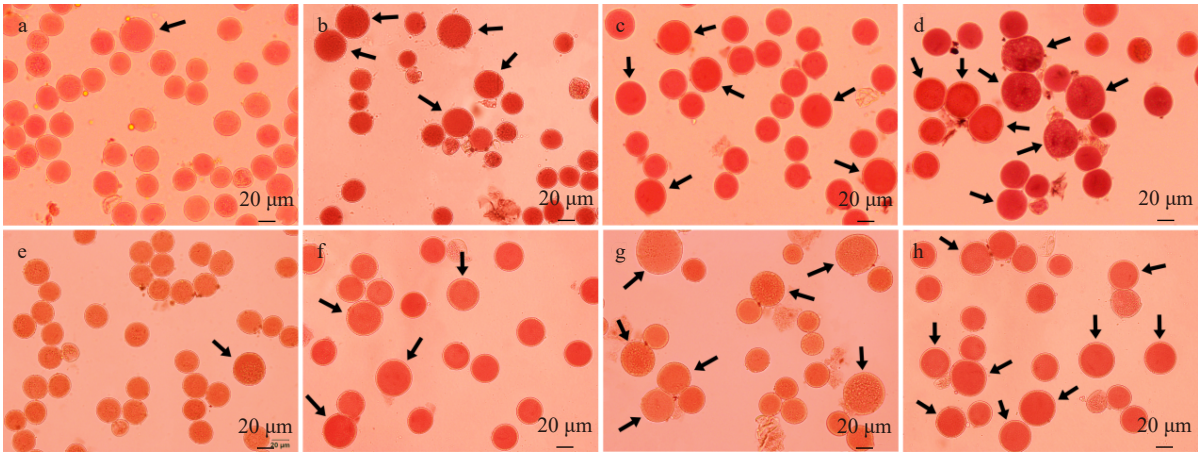
为了验证低温诱导杨树雄花芽产生 2*n* 花粉技术的通用性，本研究选择以银腺杨‘84K’的雄花枝为实验材料，当花粉母细胞进入减数分裂 II 中期时，运用−13 ℃ 低温分别对雄花芽进行 3、4 和 5 h 的持续处理，并统计各低温处理组合的 2*n* 花粉诱导率。研究结果与毛白杨无性系 SX-145 相似，银腺杨‘84K’对照组中亦发现有少量天然 2*n* 花粉(图 2e)，但其 2*n* 花粉仅占 0.34%。各低温处理组中均存在一定量的低温诱导型 2*n* 花粉(图 2f ~ h)，2*n* 花粉诱导率介于 10.45% ~ 39.17% 之间，说明低温诱导毛白杨花粉染色体加倍获得 2*n* 花粉的技术亦适用于其他杨树种，具有通用性。

2.3 低温诱导杨树 2*n* 花粉与单倍性雌配子杂交创制三倍体

选取毛白杨和银腺杨‘84K’中 2*n* 花粉诱导率相对高且花粉产量较大的 6 个处理组合的花粉，分别与银腺杨无性系 YX2 以及毛白杨无性系 SX-121 的雌花序进行授粉杂交，最终获得 6 167 粒种子，成苗 1 540 株(表 4)。当幼苗苗高约 10 cm 时，使用流式细胞仪对所有杂交子代进行逐一检测，从中筛选获得疑似三倍体共计 26 株(图 3a，b)。进一步利用体细胞染色体计数法对疑似三倍体植株进行倍性水平验证，发现二倍体对照的染色体数为 38 条($2n = 2x = 38$，图 3c)，所有疑似三倍体的染色体数目均确定为 57 条($2n = 3x = 57$，图 3d)，均为真正的三倍体。在获得的 26 株三倍体中，其中 6 株来自于毛白杨 SX-121 与银腺杨‘84K’的杂交组合；20 株来自于银腺杨 YX2 与毛白杨 SX-145 的杂交组合。对照组的杂交子代中未检测到三倍体(表 4)，说明低频率的天然 2*n* 花粉未能参与受精。

3 讨 论

温度是影响植物生长发育的重要环境因子。当植物处于开花期，如果遇到极端低温或高温天气，均会对植物生殖生长造成重要影响。温度胁迫对花粉



a. 毛白杨无性系 SX-145 的天然 2*n* 花粉；b、c 和 d 分别代表 −13 ℃ 处理 3、4 和 5 h 的毛白杨低温诱导型 2*n* 花粉；e. 银腺杨‘84K’的天然 2*n* 花粉；f、g 和 h 分别代表−13 ℃ 处理 3、4 和 5 h 的银腺杨低温诱导型 2*n* 花粉。图中箭头指向 2*n* 花粉。

图 2 毛白杨无性系 SX-145 和银腺杨‘84K’中的天然 2*n* 花粉与低温诱导型 2*n* 花粉

Fig. 2 Natural 2*n* pollen and low temperature-induced 2*n* pollen in *P. tomentosa* clone SX-145 and *P. alba* × *P. glandulosa* ‘84K’

表 1　不同处理组合的 2*n* 花粉诱导率

Tab. 1　Induction rates of 2*n* pollen derived from different treatment combinations

减数分裂时期	温度/℃	持续处理时间/h	处理编号	2*n*花粉诱导率/%
Ⅰ中期	−7	3	M1	1.55 ± 0.04
		4	M2	1.84 ± 0.88
		5	M3	2.00 ± 0.56
	−10	3	M4	2.07 ± 0.26
		4	M5	2.46 ± 0.84
		5	M6	2.85 ± 0.46
	−13	3	M7	2.89 ± 1.43
		4	M8	3.27 ± 0.25
		5	M9	4.21 ± 2.52
Ⅱ前期	−7	3	M10	1.68 ± 0.27
		4	M11	2.17 ± 1.22
		5	M12	2.30 ± 0.89
	−10	3	M13	2.37 ± 0.84
		4	M14	2.84 ± 1.16
		5	M15	3.27 ± 1.50
	−13	3	M16	3.70 ± 0.77
		4	M17	4.31 ± 1.65
		5	M18	6.11 ± 2.25
Ⅱ中期	−7	3	M19	2.45 ± 1.01
		4	M20	4.28 ± 1.32
		5	M21	5.10 ± 1.21
	−10	3	M22	6.88 ± 1.62
		4	M23	8.11 ± 1.63
		5	M24	10.22 ± 2.31
	−13	3	M25	14.92 ± 1.74
		4	M26	19.86 ± 3.53
		5	M27	31.11 ± 2.93
Ⅱ后期	−7	3	M28	2.13 ± 0.49
		4	M29	2.65 ± 1.11
		5	M30	2.74 ± 1.01
	−10	3	M31	2.86 ± 1.24
		4	M32	3.16 ± 1.62
		5	M33	3.81 ± 2.73
	−13	3	M34	4.25 ± 2.04
		4	M35	5.64 ± 2.33
		5	M36	7.40 ± 3.77
Ⅱ末期	−7	3	M37	1.26 ± 0.27
		4	M38	1.56 ± 0.11
		5	M39	1.86 ± 0.74
	−10	3	M40	1.99 ± 0.77
		4	M41	2.36 ± 1.55
		5	M42	2.56 ± 0.81
	−13	3	M43	2.79 ± 1.50
		4	M44	3.00 ± 1.32
		5	M45	3.97 ± 1.49
对照			CK	0.48 ± 0.16

表 2 各处理组合 2*n* 花粉诱导率的方差分析

Tab. 2 Variance analysis of 2*n* pollen induction rates for each treatment combination

变异来源	df	MS	*F*	*P*
温度	2	8 207.372	30.656	< 0.001
减数分裂时期	4	5 302.168	19.804	< 0.001
处理时长	2	1 486.960	5.554	0.005
温度 × 减数分裂时期	8	116.802	0.436	0.896
温度 × 处理时间	4	36.112	0.135	0.969
减数分裂时期 × 处理时长	8	25.397	0.095	0.999
减数分裂时期 × 温度 × 处理时长	16	40.011	0.149	1.000

表 3 2*n* 花粉诱导率的多重比较

Tab. 3 Multiple comparisons of 2*n* pollen induction rates

处理温度/℃	平均2*n*花粉诱导率/%	处理时期	平均2*n*花粉诱导率/%	持续处理时间/h	平均2*n*花粉诱导率/%
−7	2.37b	I中期	2.57cd	3	3.59b
−10	3.85b	Ⅱ前期	3.19bc	4	4.50ab
−13	7.83a	Ⅱ中期	11.44a	5	5.97a
		Ⅱ后期	3.85b		
		Ⅱ末期	2.37d		

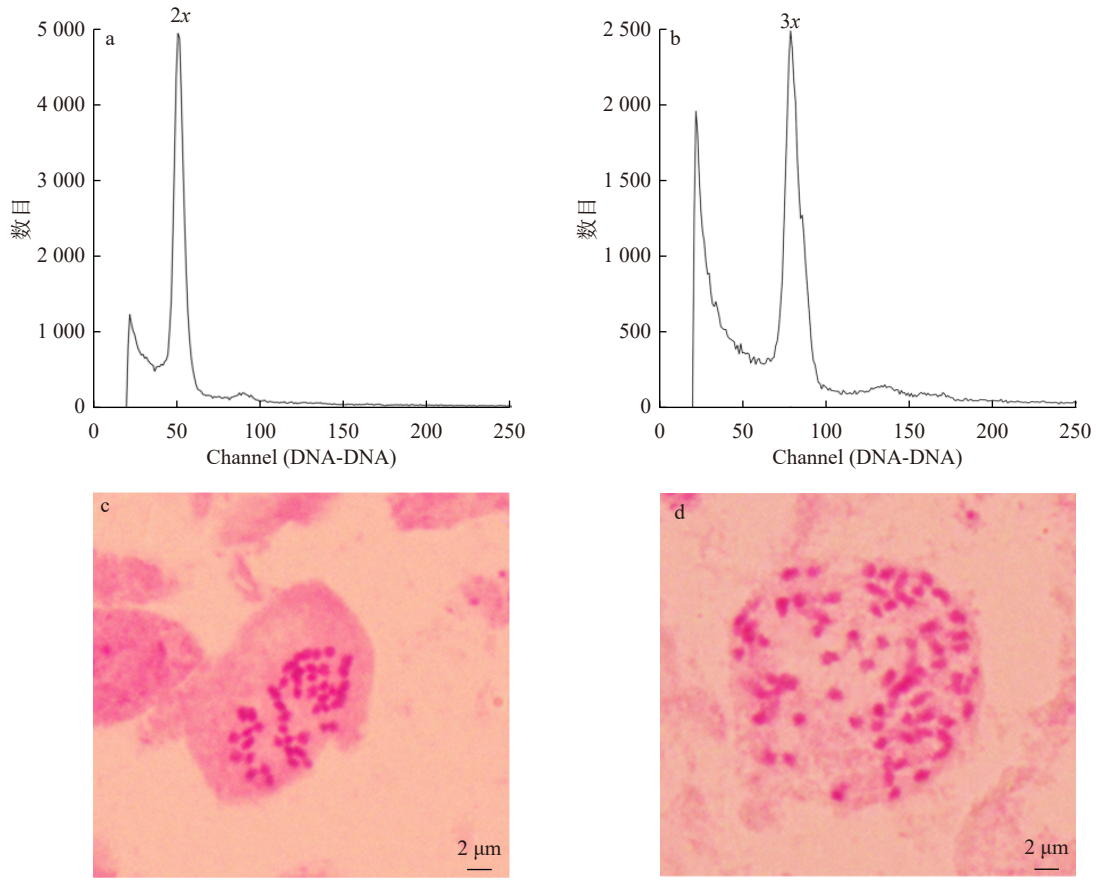
注：不同小写字母表示不同处理间存在显著差异（$P < 0.05$）。

表 4 低温诱导 2*n* 花粉与单倍性雌配子杂交创制三倍体

Tab. 4 Crossing 2*n* pollen induced by low temperature with haploid female gametes to produce triploids

杂交组合	处理编号	2*n*花粉诱导率/%	种子数	成苗数	三倍体株数	三倍体得率/%
毛白杨SX-121 × 银腺杨‘84K’	MY1	10.45	1 300	410	0	0
	MY2	12.49	503	37	0	0
	MY3	14.02	805	49	0	0
	MY4	16.00	1 397	367	3	0.82
	MY5	39.17	295	41	0	0
	MY6	30.95	215	64	3	4.69
银腺杨YX2 × 毛白杨SX-145	YM1	6.88	446	123	1	0.81
	YM2	8.11	285	87	1	1.15
	YM3	10.22	93	84	10	11.90
	YM4	14.92	171	16	2	12.50
	YM5	19.86	221	28	4	14.29
	YM6	31.11	36	10	2	20.00
	CK	0.48	400	224	0	0
合计			6 167	1 540	26	1.69

发育的影响主要表现为花药绒毡层和胼胝质降解异常，花粉败育，花粉产量降低，花粉粒结构异常，生活力下降，萌发率降低等[15−16]。但植物由于所处的生长发育阶段不同，其对温度变化的敏感程度亦有所差别[17]，故而极端温度胁迫对植物造成的伤害程度也不尽相同。据 Takeoka 等[18]和 Satake 等[19]报道，植物性母细胞自减数分裂开始至四分体形成前这一发育阶段对温度胁迫最为敏感。本研究利用−15 ~ −7 ℃ 低温分别对处于花粉母细胞时期和减数分裂时期的毛白杨雄花芽进行低温处理，发现处于花粉母细胞时期（未进入减数分裂）的雄花芽对低温不甚敏感，未观察到花芽死亡的现象。而对于处于减数分裂时期雄花芽而言，−10 ℃ 低温持续处理 3 h 就可导致少量雄花芽死亡，花芽存活率降为（98.25 ±



a. 二倍体样品流式倍性分析；b. 三倍体样品流式倍性分析；c. 二倍体毛白杨染色体计数（$2n = 2x = 38$）；d. 三倍体毛白杨染色体计数（$2n = 3x = 57$）。

图 3　低温诱导毛白杨无性系 SX-145 与银腺杨‘84K’花粉染色体加倍子代倍性分析

Fig. 3　Ploidy level analysis of offsprings derived from pollen chromosome doubling in *P. tomentosa* clone SX-145 and *P. alba* × *P. glandulosa* ‘84K’

3.04)%；−13 ℃ 低温持续处理 5 h 可导致大量雄花芽死亡，花芽存活率仅为(67.64 ± 11.55)%；当处理温度降至−15 ℃ 时，处理组雄花芽全部死亡。这说明处于减数分裂阶段的毛白杨雄花芽较花粉母细胞时期的雄花芽对低温胁迫更为敏感，这与拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、水稻（*Oryza sativa*）等植物的温度敏感性研究结果相似[20−22]。

减数分裂进程中的植物性母细胞对温度胁迫敏感性除了体现在花芽致死外，还体现在温度胁迫伤害导致配子发育异常，甚至引起配子败育[15]。本研究中，采用−13 ℃ 低温对处于减数分裂 II 中期的毛白杨花粉母细胞进行 3、4 及 5 h 的持续处理，并统计花粉败育率。研究结果表明，败育花粉率随着低温持续处理时间的延长而逐渐上升，持续处理 5 h 时，败育花粉比例达(25.75 ± 2.11)%，这与模式作物水稻花粉受低温胁迫的研究结果相一致。综合考虑低温处理对毛白杨雄花芽的致死和花粉败育双重效应，确定了低温处理诱导毛白杨花粉染色体加倍的适宜温度为−13 ~ −7 ℃，这既考虑了低温诱导的有效性，又平衡了诱导型花粉的产量。

有研究[20]表明，利用诱变剂诱导植物花粉染色体加倍获得 2*n* 花粉时，只有在特定减数分裂时期进行理化处理才能获得高频率的 2*n* 花粉。因此，确定有效的减数分裂时期至关重要。但由于不同诱变剂诱导植物产生 2*n* 花粉的作用机制差异，导致有效处理时期因诱变剂类型不同而有所变化。据前人研究报道：秋水仙碱处理诱导杨树花粉染色体加倍的有效处理时期为粗线期[23−24]，高温处理诱导银灰杨（*Populus canescens*）花粉染色体加倍的有效处理时期为终变期[25]，外源赤霉素诱导新疆杨（*Populus bolleana*）花粉染色体加倍的有效处理时期为减数分裂 II 前期[26]。本研究中，利用−13 ~ −7 ℃ 的低温对处于减数分裂 II 中期的毛白杨雄花芽进行处理获得的 2*n* 花粉诱导率显著高于减数分裂 I 中期、II 前期、II 后期以及 II 末期，故减数分裂中期 II 是低温处理诱导毛白杨花粉染色体加倍的有效减数分裂时期。

无论是采用物理方法还是化学方法诱导林木花粉染色体加倍获得 2*n* 花粉时，处理剂量、减数分裂时期以及持续处理时间均是影响 2*n* 花粉诱导率的关键因素[23]。因此，2*n* 花粉诱导率的高低直接反映了上述多个影响因素的综合效果。要想获得高 2*n* 花粉诱导率，必须对这些影响因素的最佳组合进行优

化筛选。有研究表明：利用 36 ℃ 的高温对正处于开花期的玫瑰（*Rosa* spp.）进行 48 h 的持续胁迫处理可获得 24.5% 的 2*n* 花粉[27]；利用 38 ℃ 的高温对发育至减数分裂终变期的花粉母细胞进行 6 h 的持续处理是高温诱导银灰杨花粉染色体加倍的最佳技术组合，可获得 56.3% 的 2*n* 花粉[28]；银白杨（*Populus alba*）雄花芽经 36 ℃ 高温持续处理 4 h 则可获得 32.75% 的 2*n* 花粉诱导率[29]。而药用木本植物杜仲（*Eucommia ulmoides*）需要更高的处理温度，利用 46 ℃ 高温对其雄花芽进行 4 h 的持续处理可获得最佳诱导效果[30]。

在植物 2*n* 花粉低温诱导研究中，大多因处理温度设置不理想而导致 2*n* 花粉诱导率偏低。de Storme 等[8]利用 4 ℃ 低温对减数分裂时期的拟南芥花蕾进行 40 h 的持续处理，2*n* 花粉诱导率低于 8.0%。张新忠等[31]施加 11 ℃ 的低温对辣椒花蕾进行 48 h 处理，亦仅获得 13.0% 的 2*n* 花粉诱导率。龙美玲等[9]运用 4 ℃ 的低温对减数分裂 II 中期的毛白杨雄花芽进行 2 d 的持续处理，最高 2*n* 花粉诱导率仅为 9.51%。本研究通过优化处理温度、减数分裂时期以及持续处理时间 3 个关键影响因素，发现利用−13 ℃ 对处于减数分裂 II 中期的花粉母细胞持续处理 5 h 是低温诱导毛白杨花粉染色体加倍的最佳技术组合，2*n* 花粉诱导率最高可达 31.11%，是龙美玲等[9]2*n* 花粉诱导率的 3 倍。利用高频率的低温诱导型花粉与毛白杨、银腺杨雌配子进行授粉杂交获得杂交子代，检测获得 26 株三倍体，显著提高了三倍体得率。

尽管本研究初步确定了低温诱导毛白杨花粉染色体加倍获得 2*n* 花粉的适宜温度范围，显著地提高了 2*n* 花粉诱导效率，建立完善了低温诱导毛白杨花粉染色体加倍选育三倍体的技术体系，但有关低温诱导毛白杨产生 2*n* 花粉的细胞分子机制仍有待揭示。

4 结　　论

基于前期研究基础，本研究以定植于山西省朔州市朔城区金沙植物的毛白杨为实验材料，在探究不同时期毛白杨雄花芽对低温敏感性差异的基础上，开展了低温诱导毛白杨花粉染色体加倍技术条件的优化研究，旨在提高 2*n* 花粉诱导效率，完善低温诱导毛白杨花粉染色体加倍选育三倍体的技术体系。研究主要得到以下结论。

（1）相较于花粉母细胞时期，处于减数分裂阶段的毛白杨花粉母细胞对低温更加敏感，低温处理诱导毛白杨产生 2*n* 花粉的适宜温度范围为−13 ~ −7 ℃。

（2）处理温度、减数分裂时期以及持续处理时间均极显著地影响了毛白杨 2*n* 花粉诱导率，确定了利用−13 ℃ 的低温对发育至减数分裂中期 II 的花粉母细胞进行 5 h 的持续处理是低温诱导毛白杨花粉染色体加倍的最佳处理组合，2*n* 花粉诱导率达（31.11 ± 2.93）%。

（3）利用低温诱导型 2*n* 花粉与毛白杨、银腺杨雌花序进行授粉杂交创制三倍体 26 株，其中 6 株三倍体来源于毛白杨 × 银腺杨的杂交组合，另外 20 株三倍体来源于银腺杨 × 毛白杨的杂交组合。研究结果对于丰富林木三倍体育种理论，促进林木三倍体育种技术的发展具有重要意义。

参 考 文 献

[1] 康向阳. 新一轮毛白杨遗传改良策略的思考和实践 [J]. 北京林业大学学报, 2016, 38(7): 1−8.
Kang X Y. Thinking and practices for strategy on a new round genetic improvement of *Populus tomentosa*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2016, 38(7): 1−8.

[2] 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.

[3] 朱之悌, 林惠斌, 康向阳. 毛白杨异源三倍体 B301 等无性系选育的研究 [J]. 林业科学, 1995, 31(6): 499−505.
Zhu Z T, Lin H B, Kang X Y. Studies on allotriploid breeding of *Populus tomentosa* B301 clones[J]. Scientia Silvae Sinicae, 1995, 31(6): 499−505.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 董志渊, 郭华春. 小花盾叶薯蓣未减数花粉的人工诱导研究 [J]. 西部林业科学, 2008(3): 6−12.
Dong Z Y, Guo H C. Inducement of unreduced pollen in *Dioscorea parviflora*[J]. Journal of West China Forestry Science, 2008(3): 6−12.

[7] Mason A S, Nelson M N, Yan G, et al. Production of viable male unreduced gametes in *Brassica* interspecific hybrids is genotype specific and stimulated by cold temperatures[J]. BMC Plant Biology, 2011, 11(1): 103.

[8] 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.

[9] 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 M L, Du J H, Kong B, 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.

[10] 李智群, 孔博, 程雪桐, 等. 高温诱导银灰杨花粉败育的细胞学机理研究 [J]. 北京林业大学学报, 2023, 45(5): 25−34.
Li Z Q, Kong B, Cheng X T, et al. Cytological mechanism of pollen abortion induced by high temperature in *Populus canescens*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2023, 45(5): 25−34.

[11] 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.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 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.

[15] Aiff H. Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations[J]. Environmental and Experimental Botany, 2011, 74: 9−16.

[16] Mamun E A, Alfred S, Cantrill L C, et al. Effects of chilling on male gametophyte development in rice[J]. Cell Biology International, 2006, 30(7): 583−591.

[17] 冯瑶瑶, 孙继, 俞洋, 等. 温度胁迫对植物花粉发育的影响 [J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(1): 141−149.
Feng Y Y, Sun J, Yu Y, et al. The effects of temperature stress on pollen development[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2019, 41(1): 141−149.

[18] Takeoka Y, Mamun A A, Wada T, et al. Reproductive adaptation of rice to environmental stress[M]. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1992.

[19] Satake T. Determination of the most sensitive stage to sterile-type cool injury in rice plants[J]. Research Bulletin of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station, 1976, 113: 1−43.

[20] Oda S, Kaneko F, Yano K, et al. Morphological and gene expression analysis under cool temperature conditions in rice anther development[J]. Genes & Genetic Systems, 2010, 85(2): 107−120.

[21] Zou C S, Jiang W B, Yu D Q. Male gametophyte-specific *WRKY*34 transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in arabidopsis[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(14): 3901−3914.

[22] 康向阳. 毛白杨花粉败育机制的研究 [J]. 林业科学, 2001, 37(3): 35−39.
Kang X Y. Study on mechanism of pollen abortion in Chinese white poplar (*Populus tomentosa* Carr.)[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2001, 37(3): 35−39.

[23] 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.

[24] 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: 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: 749−756.

[25] 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: 1383−1393.

[26] Zhao Y F, Kong B, Do P U, et al. Gibberellins as novel mutagen for inducing 2*n* gamete in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 13: 1110027.

[27] Pécrix Y, Rallo G, Folzer H, et al. Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp.[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62: 3587−3597.

[28] Zhou Q, Cheng X T, Kong B, et al. Heat shock-induced failure of meiosis Ⅰ to meiosis Ⅱ transition leads to 2*n* pollen formation in a woody plant[J]. Plant Physiology, 2022, 189: 2110−2127.

[29] 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 Science, 2010, 24(6): 1158−1165.

[30] 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.

[31] 张新忠, 刘国俭, 章德明. 热激和低温处理对辣椒 2*n* 花粉产量的影响 [J]. 华北农学报, 1999, 14(1): 144.
Zhang X Z , Liu G J, Zhang D M. Induction of 2*n* pollen by heat shock and low temperature in *Capsicum annuum* L. [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 1999, 14(1): 144.

（责任编辑　赵田芸
责任编委　张建国）