

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2018.04.009

## 利用秋水仙碱诱导美洲黑杨 2n 花粉的初步研究

赵鑫闻

(辽宁省杨树研究所, 辽宁 盖州 115200)

**摘要:**为了获得美洲黑杨三倍体植株,本试验采用二因素随机区组试验设计,对利用秋水仙碱诱导美洲黑杨 2n 花粉技术进行研究,结果表明:(1)水培 3 d、4 d、5 d 时,利用 0.3%、0.5%、0.8% 的秋水仙碱对美洲黑杨雄花芽进行处理均能得到一定比例的 2n 花粉;(2)在水培 3 d 时,利用 0.5% 的秋水仙碱处理美洲黑杨雄花芽,得到的 2n 花粉最多,为 23.4%。

**关键词:**美洲黑杨;秋水仙碱;2n 花粉

中图分类号:S792.11

文献标识码:A

文章编号:1003-5508(2018)04-0037-04

### A Study of Inducing 2n Pollen of *Populus deltoid* by Colchicines

ZHAO Xin-wen

(Liaoning Provincial Institute of Poplar, Gaizhou 115213, China)

**Abstract:** In order to get the triploids of *P. deltoid*, the technique was researched to induce 2n pollen of *P. deltoid* by colchicines by two-factor randomized block design. The results indicated that (1) a certain proportion of 2n pollen grains could be gotten from the male buds induced by colchicine solution with the concentration of 0.3%, 0.5% and 0.8%, under the condition of water culture for 3, 4 and 5 days. (2) the proportion of 2n pollen grains could be the highest when the male buds were treated by the colchicine solution of 0.5% under the condition of water culture for 3 days, the percentage of A4 ( $d \geq 50$ ) could be up to 1.4%, the percentage of 2n pollen ( $d \geq 37.5$ ) could be up to 23.4%.

**Key words:** *P. deltoid*, Colchicines, 2n pollen

### 1 引言

黑杨派是杨柳科 (Salicaceae) 杨属 (*Populus* L.) 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。<sup>[1-2]</sup>而在辽宁、吉林、内蒙古等省区,美洲黑杨常遭遇冻害,出现干梢和整株死亡现象,遇到干旱少雨年份,生长量也大幅降低,美洲黑杨的抗逆性亟待改良。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 1 条有效途径。

杨树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,现已利用各种方法取得了一定成就。Johnsson 最早采用秋水仙碱处理欧洲山杨、美洲山杨雄花枝,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<sup>[4]</sup>。张志毅 (1992) 等利用高温和秋水仙碱处理毛新杨均获得了 2n 花粉,并取得了三倍体植株;康

收稿日期:2018-04-17

基金项目:辽宁省科学事业公益研究基金 (GY20170045)

作者简介:赵鑫闻 (1983-),女,研究生,工程师,研究方向:林木遗传育种。e-mail:ritaxw@126.com。

向阳等(1996)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杂种三倍体的育种技术体系<sup>[6-9]</sup>。李云等(2001)利用秋水仙碱处理白杨雌花芽,获得13株白杨三倍体<sup>[10]</sup>;李开隆等(2006)利用秋水仙碱诱导大青杨2n花粉,得到了10%直径为 $37.5 < d < 50$ 的大花粉并获得了青杨派三倍体<sup>[11]</sup>;王君等(2007)对授粉后的雌花序施加秋水仙碱诱导青杨派异源三倍体,获得了26株青杨杂种三倍体<sup>[12]</sup>;祁传磊等(2011)利用秋水仙碱对授粉后的大青杨雌花序及直接对种子进行处理也均获得了多倍体植株<sup>[13]</sup>;石乐等(2012)利用高温处理毛新杨×新疆杨合子,获得了杂种三倍体和四倍体植株<sup>[14]</sup>;李静等(2014)利用秋水仙碱处理授粉后的山杨和中国山杨雌花序,均获得了三倍体和四倍体植株<sup>[15]</sup>。而黑杨派倍性育种方面的研究较少,因此本试验将以美洲黑杨为材料,对利用秋水仙碱诱导美洲黑杨花粉染色体加倍技术进行研究,为美洲黑杨的多倍体育种奠定基础。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材 料

美洲黑杨33号杨(*P. deltoides* cl. '33')雄花枝于2016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。

### 2.2 方 法

#### 2.2.1 2n花粉的诱导

将采集的美洲黑杨雄花枝移入温室进行水培,分别在水培3 d、4 d、5 d时(水培2 d时花序尚未伸出鳞片,水培6 d时花序开始产生花粉),利用0.3%、0.5%、0.8%的秋水仙碱溶液处理美洲黑杨雄花芽,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 ul~40 ul,两次处理时间间隔为5 h~7 h。每种处理10~15个雄花芽,每5个雄花芽得到的混合花粉为1次重复(表1)。

表1 不同水培时间利用不同浓度秋水仙碱进行美洲黑杨2n花粉的诱导

|    | 浓度   | 水培时间(d) |
|----|------|---------|
| C1 | 0.3% | 3       |
| C2 | 0.3% | 4       |
| C3 | 0.3% | 5       |
| C4 | 0.5% | 3       |
| C5 | 0.5% | 4       |
| C6 | 0.5% | 5       |
| C7 | 0.8% | 3       |
| C8 | 0.8% | 4       |
| C9 | 0.8% | 5       |

#### 2.2.2 2n花粉的统计与纯化

2n花粉的统计与纯化,分别按照不同处理收集获得的花粉,并混合均匀,每个处理取少量花粉做5个临时涂片,每个涂片观察5个视野,测量视野内花粉的直径,A1表示花粉粒直径 $d < 25 \mu\text{m}$ 范围;A2表示 $25 \mu\text{m} < d < 37.5 \mu\text{m}$ ;A3表示 $37.5 \mu\text{m} < d < 50 \mu\text{m}$ ;A4表示 $d > 50 \mu\text{m}$ 。分别统计每个处理中获得的各级花粉数量及所占比例并分析<sup>[11]</sup>。研究表明直径大于 $37 \mu\text{m}$ 的花粉为染色体未减数的2n花粉<sup>[5,7,17]</sup>,因此本试验中A3和A4级花粉为2n花粉。

## 3 结果与分析

### 3.1 不同水培时间及不同浓度秋水仙碱的诱导效果

将采集的美洲黑杨雄花枝移入温室进行水培,水培3 d后花序开始伸长,即开始进行美洲黑杨2n花粉的诱导,分别在水培3 d、4 d、5 d时利用0.3%、0.5%、0.8%的秋水仙碱处理美洲黑杨雄花芽,结果

表2 诱导美洲黑杨各级花粉数及百分率

| 编号 | 样本数 | A1花粉数 | A2花粉数 | A3花粉数 | A4花粉数 | A1百分率(%) | A2百分率(%) | A3百分率(%) | A4百分率(%) |
|----|-----|-------|-------|-------|-------|----------|----------|----------|----------|
| C1 | 25  | 36    | 138   | 29    | 1     | 18       | 68       | 14       | 0.5      |
| C2 | 25  | 50    | 193   | 12    |       | 20       | 76       | 5        | 0.0      |
| C3 | 25  | 15    | 129   | 6     |       | 10       | 86       | 4        | 0.0      |
| C4 | 25  | 45    | 123   | 48    | 3     | 21       | 56       | 22       | 1.4      |
| C5 | 25  | 31    | 131   | 20    | 1     | 17       | 72       | 11       | 0.5      |
| C6 | 25  | 22    | 164   | 12    |       | 11       | 83       | 6        | 0.0      |
| C7 | 25  | 148   | 314   | 12    |       | 31       | 66       | 3        | 0.0      |
| C8 | 25  | 10    | 71    | 3     |       | 12       | 85       | 4        | 0.0      |
| C9 | 25  | 76    | 260   | 12    |       | 22       | 75       | 3        | 0.0      |

注:A1表示花粉粒直径 $d < 25 \mu\text{m}$ 范围;A2表示 $25 \mu\text{m} < d < 37.5 \mu\text{m}$ ;A3表示 $37.5 \mu\text{m} < d < 50 \mu\text{m}$ ;A4表示 $d > 50 \mu\text{m}$ 。

显示,水培 3 d,4 d,5 d 后利用 0.3%、0.5%、0.8% 的秋水仙碱进行处理,均得到了一定比例的 2n 花粉,其中水培 3 d 后利用 0.5% 的秋水仙碱进行处理获得的 2n 花粉数量最多,获得直径  $37.5 \mu\text{m} < d < 50 \mu\text{m}$  的 A3 级花粉百分率为 22%,获得直径为  $d \geq 50$  的 A4 级花粉百分率为 1.4% (表 2)。

### 3.2 美洲黑杨 2n 花粉诱导方差分析

从表 3 方差分析结果来看,处理时间及秋水仙碱浓度对美洲黑杨 2n 花粉的诱导影响均较大,达到极显著水平,因此在利用秋水仙碱进行美洲黑杨大花粉的诱导的过程中,不仅要注意处理时间的把握,同时也要选择合适的秋水仙碱浓度,本试验结果表明,水培 3 d 时利用 0.5% 的秋水仙碱溶液对美洲黑杨雄花芽进行处理得到的 2n 花粉最多。

表 3 不同处理所得 2n 花粉方差分析

| 变异来源   | 平方和    | 自由度 | 均方    | F 值    | p 值   |
|--------|--------|-----|-------|--------|-------|
| 秋水仙碱浓度 | 6.615  | 2   | 3.307 | 19.250 | 0.000 |
| 水培时间   | 3.945  | 2   | 1.973 | 11.481 | 0.001 |
| 误差     | 2.749  | 16  | 0.172 |        |       |
| 总变异    | 17.189 | 26  |       |        |       |

## 4 结论与讨论

本试验研究结果表明,水培 3 d 时利用 0.5% 的秋水仙碱溶液对美洲黑杨雄花芽进行处理得到的 2n 花粉最多,获得 A3 级 ( $37.5 \mu\text{m} < d < 50 \mu\text{m}$ ) 花粉的百分率为 22%,A4 级 ( $d \geq 50$ ) 花粉的百分率为 1.4%。与毛新杨一样只要是在水培 40 h 左右,花序微露至花序伸出鳞片 1/4 之前处理,均能取得较好的加倍效果的研究结果一致<sup>[7]</sup>;而与李开隆诱导大青杨花粉染色体加倍的最佳诱导时间为水培后 4 d 的研究结果略有不同<sup>[11]</sup>。可能是由于不同品种杨树的花粉母细胞减数分裂进程不同。

据朱之悌院士观测,毛白杨雄株花粉中,除那些扁小、空瘪、无核等败育花粉外,均可观察到有大花粉粒的广泛存在,并混杂在众多的小花粉粒中,但大花粉粒直径要超过小花粉粒 1 倍以上,很容易识别;大花粉粒直径变动在  $35 \mu\text{m} \sim 45 \mu\text{m}$  之间,疑为未减数的二倍体花粉<sup>[16]</sup>。据 Einspahr 和 Mashkina 经验,直径大于  $37 \mu\text{m}$  的花粉为染色体未减数的 2n 花粉<sup>[17]</sup>。张志毅等研究表明 2n 花粉粒直径远远大

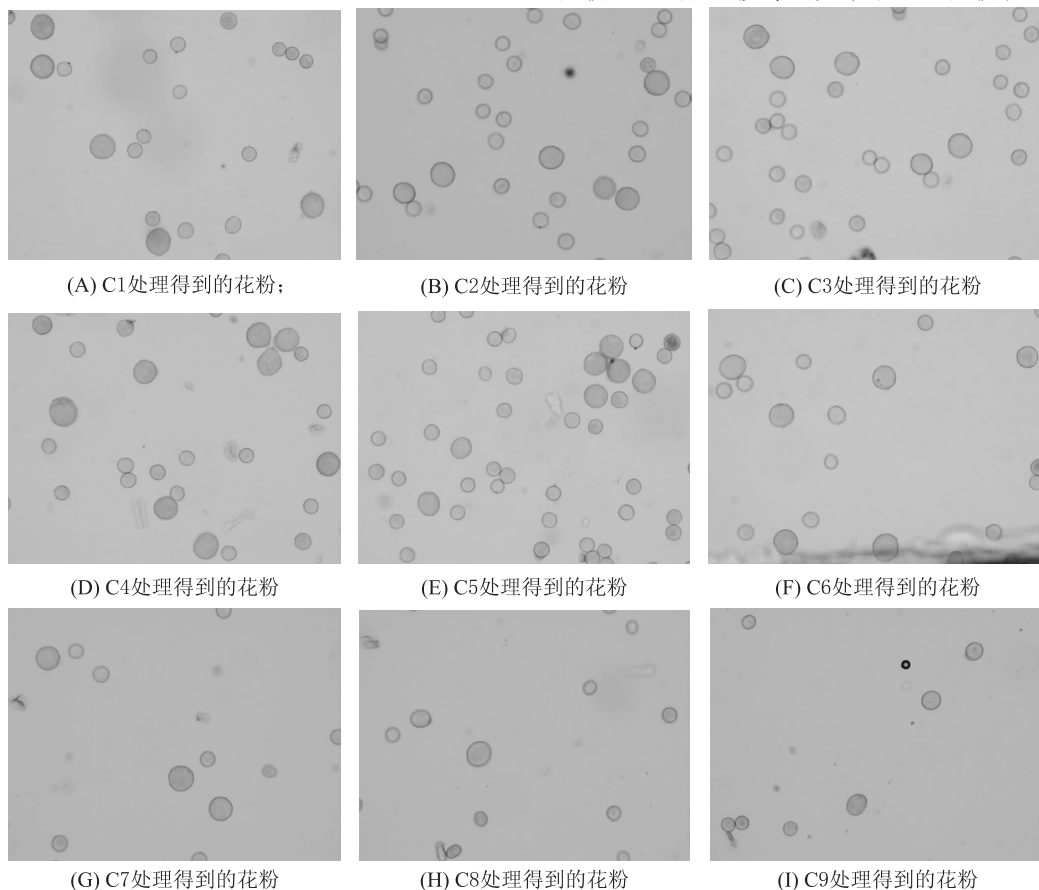


图 1 经秋水仙碱处理的不同级别的美洲黑杨花粉

于正常的单倍体花粉粒,约在 37  $\mu\text{m}$  以上<sup>[5]</sup>。康向阳经发芽镜检,其染色体数为 38,一般的正常毛白杨单倍体花粉染色体数为 19<sup>[7]</sup>。通过光学显微镜测定,经过加倍处理的美洲黑杨花粉直径通常在 15  $\mu\text{m}$  ~ 45  $\mu\text{m}$  之间,因此我们要根据其花粉直径的大小进行分级研究,我们将直径大于 37  $\mu\text{m}$  的花粉作为大花粉的标志加以统计,得到的 A3 和 A4 级花粉极有可能是 2n 花粉。下一步我们将对其进行鉴定研究。得到的 2n 花粉也有可能是天然大花粉,但其数量较少,而且每个处理中都有可能产生天然大花粉,不影响试验结果,因此在本试验中没有设计对照。

人工诱导花粉染色体加倍途径获取杨树多倍体是最简洁、可靠的途径之一<sup>[7]</sup>。利用秋水仙碱或高温等诱导方法获得的 2n 雌雄配子在欧洲山杨、美洲山杨、香脂杨、毛新杨、银腺杨、青杨、大青杨等杨树中,均已获得三倍体植株<sup>[4-17]</sup>。杨树多倍体植株通常在一些性状上优于二倍体<sup>[18]</sup>。具体表现在巨大性、抗性和一些生理结构的变化,例如生长量增加、抗寒、抗旱、抗病虫害、器官大小、成分含量等<sup>[19]</sup>。欧洲山杨 (*Populus tremula*) 三倍体比二倍体生长快 30%<sup>[20]</sup>,材积为二倍体的 1.35 倍<sup>[21]</sup>。我国选育的毛白杨 (*P. tomentosa*) 异源三倍体最优无性系 (B301) 单株材积是自然二倍体的 3.5 倍 (8a 生时)<sup>[18]</sup>。三倍体欧洲山杨抗干旱和瘠薄性能较其亲本二倍体有明显的优势,并且还有较强的抗病虫害的能力<sup>[22]</sup>。实践证明倍性育种是对杨树进行遗传改良的有效途径。

#### 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] Johnsson H, Eklundh C. Colchicine treatment as a method in breeding hardwood species. 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. 北京林业大学学报, 1992, 14 (增刊 3): 52 ~ 58.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [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] 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.
- [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] 王君, 康向阳, 李代丽, 等. 授粉后施加秋水仙碱处理诱导青杨派异源三倍体 [J]. 北京林业大学学报, 2007, 29 (5): 18 ~ 21.
- [13] 祁传磊. 大青杨多倍体的诱导. 硕士学位论文. 东北林业大学. pp1 - 9.
- [14] 石乐, 张平冬, 毛彦科, 等. 高温处理诱导染色体加倍获得白杨杂种多倍体 [J]. 核农学报, 2012, 26 (8): 1118 ~ 1123.
- [15] 李静, 李春明, 卓泳杉, 等. 秋水仙碱诱导山杨异源多倍体 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42 (4): 1098 ~ 1100.
- [16] 朱之悌, 康向阳, 等. 毛白杨天然三倍体选种研究. 林业科学, 1998, 34 (4): 22 ~ 31.
- [17] 朱之悌, 林惠斌, 等. 毛白杨异源三倍体 B301 等无性系选育的研究. 林业科学, 1995, 31 (6): 499 ~ 505.
- [18] Ehrendorfer F. Polyploidy and distribution [J]. Basic Life Sci, 1979, 13: 45 ~ 60.
- [19] Ramsey J, Schemske D W. Neopolyploidy in flowering plants [J]. Ann Rev Ecol Syst, 2002, 33: 589 ~ 639.
- [20] Johnsson H. Ten years' aspen breeding by the Swedish Forest Tree Breeding Association. Medd Foren Vaxtforadl Skogstrad, No. 46, pp. 9. Repr Svensk PappTidn 1947, 50: 17 ~ 20.
- [21] Johnsson H. Two newspaper cuttings on the giant aspen. Skogen, 1948, 35 (9): 107.
- [22] Johnsson H. Development of triploid and diploid populus tremula during the juvenile period [J]. Z Forstgenet, 1953, 2 (4): 73 ~ 77.