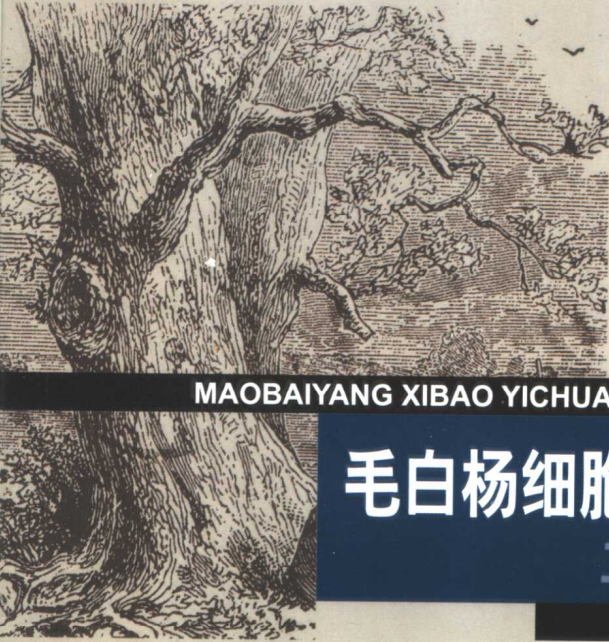


康
向
阳
著



MAOBAIYANG XIBAO YICHUAN YU

毛白杨细胞遗传与 三倍体选育

SANBEITI XUANYU



北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书

中国环境科学出版社

北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书

毛白杨细胞遗传与 三倍体选育

康向阳 著

中国环境科学出版社·北京

图书在版编目(CIP)数据

毛白杨细胞遗传与三倍体选育 / 康向阳著. —北京: 中国环境科学出版社, 2002.10

(北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书)

ISBN 7-80163-406-3

I. 毛… II. 康… III. 毛白杨-选择育种 IV. S792.117.04

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 082603 号

出 版	中国环境科学出版社 (100036 北京海淀区普惠南里 14 号) 网 址: http://www.cesp.com.cn 电子信箱: cesp@95777.com
印 刷	北京联华印刷厂
经 销	各地新华书店
版 次	2002 年 12 月第一版 2002 年 12 月第一次印刷
印 数	1—2 000
开 本	850×1168 1/32
印 张	5.125 插页 13
字 数	131 千字

定 价 15.00 元

北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书

编辑委员会

主 任：朱金兆

副主任：尹伟伦 马履一

委 员：（按姓氏笔画）

王礼先 王向荣 任恒祺 张启翔 李凤兰 孟宪宇

罗菊春 赵广杰 顾正平 续九如 翟明普 贾黎明

秘 书：钟 艳

序一

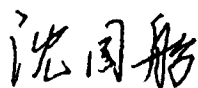
科学技术水平是知识经济时代评价一个国家国力的重要标准。科技水平高则国力强盛，无论在政治、经济、文化、信息、军事诸方面均会占据优势；而科技水平低则国力弱，就赶不上时代的步伐，就会在竞争日趋激烈的国际大舞台上处于劣势。江泽民同志在庆祝北京大学建校 100 周年大会上也强调指出：“当今世界，科学技术突飞猛进，知识经济已见端倪，国力竞争日益激烈。”因此，提高科学技术水平，提高科技创新能力已为世界各国寻求高速发展时所共识。我国将“科教兴国”作为国策也表明了政府对提高科技水平的决心。博士研究生朝气蓬勃，正处于创新思维能力最为活跃的黄金年龄，同时也是我国许多重要科研项目中的中坚力量，他们科研成果水平的高低在一定程度上影响着—一个高校、一个科研院所乃至我国科研的整体水平。国务院学位委员会每年一度的“全国百篇优秀博士论文”评选工作是对我国博士研究生科研水平的集体检阅，已被看做是博士研究生的最高荣誉，对激励博士勇攀科技高峰起到了重要的促进作用。北京林业大学不仅积极参加“全国百篇优秀博士论文”的推荐工作，还依此为契机每年评选出三篇校级优秀博士论文并设立专项基金全额资助论文以丛书形式出版，这是一项非常有意义的工作，对推动学校科研水平的提高将发挥重要作用。

从人才培养的角度来看，如何提高博士研究生的创新思维能力和综合素质，高质量地向社会输送人才备受世人关注。提高培养质量的措施很多，但在培养中引入激励机制，评选优秀博士论文并资助出版，不失为一种好方法。博士生和导师可据此证明自己的学术能力，确立自己的学术地位；也可激励新入学的研究

生尽早树立目标，从而在培养的全过程严格要求自己，提高自身的素质。

因学科的特殊性，要想出色完成林业大学的博士论文有许多其他学科所不会遇到的困难，如研究周期长，野外条件难于严格控制，工作条件艰苦等等。非常欣慰的是北京林业大学的博士生们不仅克服困难完成了学业，而且已经有人中选“全国百篇优秀博士论文”。而该丛书资助出版的“校级优秀博士论文”所涉及的研究领域、研究成果的水平也属博士论文中的佼佼者，令我欣喜。对这些博士生所取得的成果我表示祝贺，同时也希望他们以及今后的同学们再接再厉，取得更好的成绩报效祖国。

中国工程院副院长、院士

The image shows a handwritten signature in black ink. The characters are '沈国舫' (Shen Guosheng), written in a cursive, flowing style. The first character '沈' is on the left, followed by '国' and '舫' on the right. The strokes are bold and expressive.

2002年8月10日

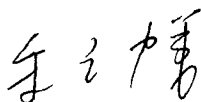
序二

自 1991 年康向阳作为我的硕士研究生入校起，与他相识已经超过 10 年了。他作为三倍体毛白杨新品种选育的见证人以及出色参与者，伴随着三倍体毛白杨事业的发展也日渐成熟起来。看到弟子成长、成材，我由衷地高兴。

本书是在康向阳博士论文的基础上完成的，其中最为可贵之处是能够将细胞遗传与倍性育种结合起来研究，通过对毛白杨细胞遗传学规律的揭示推进三倍体诱导，取得了丰硕的成果。三倍体毛白杨是历时“六五”至“八五”国家科技攻关的结晶，其中康向阳博士娴熟的染色体分析技术发挥了重要作用。

近年来，三倍体毛白杨得到了社会各界的广泛关注，并掀起了广植三倍体毛白杨新品种的热潮，一些造纸企业也纷纷选择三倍体毛白杨营建自己的纸浆林基地。造纸等企业的积极参与，孕育着三倍体毛白杨事业的无限发展潜力。国务院朱镕基总理、温家宝副总理等国家领导人对三倍体的科研与推广均给予了高度重视并作了重要批示，国家林业局拨专项经费支持三倍体毛白杨的纵深研究，这也正是可以大有作为的天地。

记得本书作者在博士论文答辩后，我作为导师曾给他写过这样一段话：人的一生中最为成功、最值得记忆之处，在于他将其一生及他的名字与某项事业的缔造联系起来，事业所在，千古流芳。仍以此与弟子康向阳博士共勉。



2002 年 6 月 18 日 于北林

目录

1 引言.....	1
2 国内外研究概述.....	4
2.1 杨树细胞遗传学研究概况.....	4
2.2 杨树三倍体育种研究进展.....	8
3 基本研究思路.....	15
4 研究材料与方法.....	18
4.1 研究材料及其来源.....	18
4.2 研究方法.....	19
4.2.1 体细胞染色体观察.....	19
4.2.2 花粉母细胞减数分裂观察.....	20
4.2.3 花粉染色体人工加倍.....	21
4.2.4 花粉染色体数目及萌发过程观察.....	21
4.2.5 $2n$ 花粉的统计与纯化.....	22
4.2.6 $2n$ 花粉生命力测定.....	23
4.2.7 花粉辐射及其效应观测.....	23
4.2.8 授粉杂交及苗木管理.....	24
4.2.9 三倍体毛白杨配子育性及子代变异观察.....	24
5 结果与讨论.....	26
5.1 毛白杨细胞遗传学研究.....	26

5.1.1 毛白杨染色体形态与数目变异	27
5.1.2 毛白杨花粉母细胞减数分裂的研究	28
5.1.3 毛白杨花粉的多态性	40
5.1.4 几个相关问题的讨论	42
5.2 从毛白杨天然群体中直接选育三倍体	61
5.2.1 毛白杨天然三倍体的起源和分布	61
5.2.2 毛白杨天然三倍体的生长特性	62
5.2.3 毛白杨天然三倍体选育	64
5.3 利用毛白杨天然 2n 花粉选育三倍体	66
5.3.1 毛白杨异源三倍体的检出及形态特点	66
5.3.2 毛白杨异源三倍体的减数分裂观察	69
5.3.3 毛白杨异源三倍体的配子育性及其子代形态 变异	71
5.3.4 毛白杨异源三倍体的生长潜力评价	75
5.3.5 利用毛白杨天然 2n 花粉选育三倍体的讨论	77
5.4 白杨花粉染色体加倍与三倍体选育	78
5.4.1 花粉染色体加倍有效处理时期的研究	79
5.4.2 2n 花粉生命力测定及萌发特征观察	92
5.4.3 不同倍性花粉的辐射敏感性差异及其应用	98
5.5 毛白杨三倍体育种程序的讨论	107
6 结论	113
主要参考文献	121
ABSTRACT	130
附件	136
参考文献	148
后 记	149

1 引言

近年来，随着经济的飞速发展，全世界对纸张的需求骤增，同时对纸张品质的要求也在不断提高。木材制浆造纸具有便于运输、产品质量好、技术成熟、清洁等特点，已经成为浆纸业发展的必然。然而，我国由于受森林资源限制，木浆比例过低，其中中国产造纸用浆只占 6%~7%，加上从国外进口木浆，在我国造纸用浆总量中木浆也仅达 18%，与国外 93% 的木浆使用率相比差距甚远，这样一些高品质的纸张就不得不依赖于进口^[30-31]。随着社会需求的增加以及纸业对外开放力度的加大，为弥补生产能力的不足，特别是对木浆和高档纸产品的需求，进口产品的数量不断加大。1995 年以来，每年进口商品木浆、废纸以及纸、纸板等纸制品花费外汇就达到数十亿美元，已经成为世界上第一大纸类产品进口国，也成为我国轻工业类产品的第一用汇大户^[30-31]。为扭转这一状况，并从根本上解决用于造纸的木浆原料问题，对于缺材少林的中国而言，营建纸浆生产用人工林是一条切实可行之路。

就我国的纸浆林等森林工业用材林建设而言，从林业生产的源头——林木育种抓起是解决问题的关键，这是由中国的国情以及国家森林资源储备的特点所决定的。我国的森林资源现状是天然林已几乎无树可砍，人工林虽发展较快，但最初多是考虑防护效益等进行建设，分布分散，不适合工业化规模生产；加之人口众多，人均土地资源有限，大部分有效土地需要发展农业，用来解决 12 亿人口的吃饭问题；因此有限的投入与有限的土地资源，要求必须在较短的时间里获得较高的回报，否则很难得到造

林者的积极响应。基于这样的认识,我国要解决造纸原料乃至生态环境建设问题,首先就必须解决用于纸浆林等工业用材林建设的适宜品种问题,只有创造出优质、高效的新品种,依靠经济利益的驱动,才有可能在短期内完成原料资源的积累,使林纸一体化成为现实。其中作为纸浆林建设的首选树种之一的杨树,尽管其遗传改良程度是世界林业领域最高的树种,人工选育获得的良种已广为生产应用,然而育种现状大多仍处于利用层次较低的一般选种和杂交等常规育种阶段,在生产中应用的良种无论是生长速度还是木材品质都与短周期工业用材生产要求尚有一定的距离,有必要进一步采用更为先进的育种手段加以改进、提高。

毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)是我国特有的乡土树种,它生长迅速,材质优良,适应性强,一直是黄河流域及华北平原地区用材林、农田林网和城乡绿化的主栽树种之一,深受广大群众的喜爱。而且随着现代森林工业的发展和人类对木材生产要求的拓宽,毛白杨更以其洁白的材质和优良的纤维性状在造纸材生产中倍受关注^[17-18]。然而,由于普通毛白杨具有前期生长缓慢的特点,很难适应现代林业的短周期工业化生产要求,因此,为了更为广泛而充分地利用这一优良基因资源,必须对毛白杨施加品种改良工作,选育出生长快,特别是前期生长快且纤维更长的新品系。因为只有前期生长快,才能实现类似农作物那样短周期集约经营;而只有具备一定的纤维长度,才能满足纸张品质方面的需求,也只有这样的良种,才能在生产中能以较低的投入,获取较高的经济收益,才具有其存在和发展的生命力。

显而易见,在毛白杨现已达到的育种水平上,如想使材积等方面的增益得以进一步提高的话,依赖于杂交等常规育种的潜力是有限的,期望有较大的突破已比较困难,其中有关纤维长度等材质的改良更是如此,除非采用新的育种方法不可。而在被寄予厚望的生物工程技术尚难在现代林木育种中有所作为的今天,只有综合倍性优势和杂交优势的多倍体育种可堪重任。国内外有

关倍性育种的实践证明，白杨三倍体在纸浆材生产中具有更大的潜力[8, 19, 32, 89-98]。因此，本研究的提出就是针对短周期纸浆材新品种选育滞后于林业生产需求的问题，从解决杨树细胞遗传学研究技术方法入手，系统开展毛白杨三倍体育种的理论与技术研究，选育出具有生产潜力的毛白杨及其杂种三倍体，为国家林业产业以及生态环境建设服务。

2 国内外研究概述

2.1 杨树细胞遗传学研究概况

细胞遗传学是遗传学中形成与发展最早的一个分支，是近代作物育种成功的直接基础，是投入相对较低而见效最快的一门基础科学。她的每一项进步都对遗传学起到了重要的推动作用，同时对农业的发展也产生了深远的影响，尤其是在农作物、蔬菜、果树的新品种选育中贡献巨大。我国农业之所以能够以占世界 7% 的耕地生产了 24% 的粮食，并养活了 22% 的人口，主要得益于农作物育种理论和技术方面的创新及其应用，其中细胞遗传学的进步发挥了非常关键性的作用^[4-6]。

杨树细胞遗传学研究资料比较少，最早记载是 Erlanson 和 Hermanh 的工作，1927 年他们对山杨染色体数目进行的检查，证明其单倍体染色体数目为 $n=19$ ，二倍体染色体数目为 $2n=38$ ^[20]。到了 20 世纪 40 年代，杨树染色体数目就已得到确认^[7, 20, 99]。Smith (1941, 1943) 和 Storeva 等 (1967) 通过对杨树一些种和杂种的染色体研究认为，自然界杨属树种大多数是二倍体 ($2n=2x=38$)，而且以光学显微镜的分辨水平来看，杨属树种的染色体形态结构也基本是一致的^[7, 99]。因此 Smith (1941) 根据杨属树种染色体数目及其结构特征的近似性提出了杨属内种的分化假说，即杨属的分化是由地理的、地体的和生理特性的隔离结果产生的，而非结构染色体隔离的结果。他认为有如下几个现象支持这个假说，即：(1) 杨属树种在消除了地理、地体和生理的障

碍之后的人工条件下，相互间都容易杂交；（2）这些杂交后代相对都能结实；（3）虽然有时染色体也有结构上和遗传上的差异，如染色体倒位和不联会，但这些杂种的机能性结实却否定了遗传和结构的染色体隔离，在自然界发现的能较多结实的同源多倍体类型在种子繁殖时都保持下来了，这说明染色体的数目隔离不是形成种的因素。但是，他的这一观点是在当时的染色体研究水平、有限的杨树染色体研究成果、以及为数不多的杨属种间杂交试验的基础上得出的，事实上杨属的派间杂交，特别是胡杨与其它各派杨树的种间杂交是非常困难的，而杨树各个种间，尤其是各派间的外部性状表现也都具有明显的差异，派间杂种严重不育，因此抛开染色体结构的隔离，仅从地理和生理隔离上解释杨属种的形成显然是不客观的。

实际观察所描述的杨树染色体形态多不一致。Smith（1943）认为杨树染色体呈点状和杆状^[44, 99]。Stettler（1971）在研究毛果杨孤雌生殖中发现杨树染色体有点状和杆状两种形态，其中短杆状的染色体在 9 对以下^[20]。陆志华等（1979）对小黑杨、中东杨进行染色体研究后指出，染色体到有丝分裂晚前期或早中期呈蝌蚪状，至中期时则成点状或杆状，其中只有 1~2 对杆状染色体经常出现，长度为点状染色体的 2~3 倍，属中部着丝点^[20]。孙雪新等（1990）首次采用去壁低渗技术对河北杨的染色体核型进行了研究，指出河北杨染色体均为杆状，属中部或近中部着丝点，其中含一对较大的染色体，并根据这一对最大的同源染色体 Gimsa 染色的差异推断河北杨为杂种起源^[21]。Ohri（1991）也报道了采用去壁低渗法对欧洲山杨的染色体核型的研究，尽管提供的照片比较模糊，但仍可分辨出染色体均为杆状等^[100]。这种关于杨树染色体形态的研究结果不一致的原因可能是由于制片技术、制片方法的不同等造成的，当然也不能完全排除杨属不同种间染色体形态固有的差异性。

有关杨树生殖过程中染色体行为的研究也有所涉及。Van

Dillowijm 在研究黑杨和钻天杨减数分裂时发现染色体次级联会现象，所以他认为杨树的染色体组型是次级多倍体 (Secondary Polyploid)，基数 $X=8$ 。在这 8 组次级联会复合体中，有 4 个以二倍数存在，4 个以三倍数存在，其中在以三倍数数存在的染色体中又有 2 个互相合并，最后形成了 19 个染色体。也就是说目前的杨树染色体核型应该是 AAAA、BBBB、CCCC、DDDD、EEEEEE、FFFFFF、GGGGGG、HH (H+H) (H+H)，共计 $2n=38$ ^[20, 101]。但是由于在其它杨树中未见到相类似的资料，仍需加以进一步研究证实。据捷克 Posinia (1978) 对欧洲山杨的减数分裂观察，其雄性二倍体的染色体构型正常为 19II ， $18\text{II}+2\text{I}$ 是非常罕见的。而四倍体则变化在平均数 $7\text{IV}+24\text{II}$ 左右，后期染色体移向两极时常形成落后染色体，并在同型分裂时有三个纺锤体参加，产生多极现象，占总数 35% 的花粉染色体数少于 38 ^[102]。韩一凡等对银白杨、小叶杨、大叶杨的花粉母细胞减数分裂进行了研究，发现其中多数细胞 $n=16$ ，从 $n=10$ 到 $n=19$ 均有不同比率的存在，染色体 $n=19$ 的细胞只占 3%~7%，且有多价体的出现，表现出较强的杂合性^[2]。刘玉喜等 (1979) 经研究指出，在中东杨花粉母细胞的减数分裂过程中异常现象较多，有 1~6 分体、多核小孢子和多核仁小孢子等不正常现象^[22]。减数分裂中染色体行为的观察对于研究物种起源、进化以及种间关系和生殖能力等有重要的参考价值，在林木育种中也具有重要的指导意义。但是由于杨树生长周期长，树体高大，采集材料较困难；配子发育时间较长，减数分裂时期较难捕捉；加之制片技术等方面的原因，有关研究较少且不够深入。

由于杨树染色体数目较多，细胞质浓厚，加之细胞壁的限制，不利于染色体的分散和染色，为此，有关学者在进行杨树细胞遗传学研究的同时，还就杨树染色体制片技术进行了探讨。一般而言，杨树染色体研究多采用孚尔根、醋酸洋红、苏木精等染色压片的方法，效果不甚理想。于启滨等 (1993) 曾应用孚尔根

和吉姆萨双重染色法检查山杨染色体数目，克服了以往用其它染色剂染色效果较差的问题^[23]。孙雪新等（1991）采用酶解去壁、低渗、火焰干燥、Gimsa 染色的方法，获得了分散和染色均佳的河北杨染色体核型^[21]。显然，仅对杨树体细胞染色体制片而言，去壁低渗技术不失为一项较为先进的技术，由于它能真实地、客观地反映杨树染色体全貌，值得开发、推广应用。

遗传学发展到 20 世纪 50 年代，由于 DNA 双螺旋结构的发现以及遗传密码的揭示，使研究热点向分子遗传学转移，细胞遗传学曾一度受到忽视。然而，随着分子遗传学研究的不断深入并向基因结构更为高等的生物类型扩展之后，却发现细胞遗传学信息对于全面阐明有关遗传结构与功能的分子遗传学不仅是必不可少的，而且具有相辅相成的效果，因此，近年来有关细胞遗传学方面的研究又逐渐受到关注，并与分子遗传学形成相互渗透。显而易见，一旦控制生物特定性状的基因能够落实到染色体的确切位置之上，人类对基因结构和功能及其调控的认识能力也必将得到进一步的提高。分子细胞遗传学时期的到来，染色体原位杂交、基因物理定位、特定染色体或其区段的显微切割及其体外扩增、人造染色体等技术的应用为这一遗传学分支增添了新的活力，展示了十分诱人的研究与应用前景^[5-6]。

随着科学的进步，现代育种也已开始从个体水平向细胞水平乃至分子水平迈进，此时与育种相关的遗传基础理论的研究如仍停滞不前，则是很难适应这一变化的。正如鲍文奎先生指出的那样：基因遗传学的不足，对染色体、细胞和个体、群体层次遗传知识的贫乏，和对大量基因相互关系的无知，使育种工作突破性的发展受到了难以逾越的障碍^[24, 25]。而在清除这些障碍的工作中，有一些是细胞遗传学可以胜任的。然而，由于染色体制片技术等基础研究的阻碍，有关杨树的细胞遗传学研究仍处于较低的水平，迄今甚至连较清晰的染色体核型照片也非常少见；而且所获得的研究资料也比较零乱，缺乏系统性，因此当然也就不可能完成与原位杂交、染色

体微切割、人工染色体等现代新技术的结合,实现杨树特定基因在染色体上确定位置的定位、克隆以及染色体操作等。杨树育种以及生产应用的发展进程迫切需要其细胞遗传学理论与技术的创新与突破,这实际上也是整个树木遗传学发展的必然要求。

2.2 杨树三倍体育种研究进展

植物细胞核内染色体组加倍以后,常常带来一些形态和生理上的变化,在提高生长速度、增进遗传品质以及提高目的代谢物含量等方面具有优势^[5, 8-10]。就主要利用营养器官的林木多倍体育种而言,由于许多树种能够进行无性繁殖,可以不必担心多倍体育性差而导致繁殖困难的难题,而多年生习性又保证品种一旦育成就可以长期持续利用等,因此林木多倍体育种的潜力更大,作用更为突出。具体主要体现于如下三个方面:(1)纸浆材等短周期森林工业用材新品种选育。多倍体特别是异源多倍体在染色体加倍后可带来营养器官的巨大性变化,通过多倍体育种培育更为速生、优质的林木新品种,可以缩短栽培利用周期,提高工业利用价值。如欧洲山杨×美洲山杨杂种三倍体的材积生长比本地生长的山杨快1~2倍,纤维长度长18%,比重高出20%,是一种优良的纸浆原料^[93,94,98]。(2)利用组织代谢产物的经济林木新品种选育。由于多倍体的基因剂量倍增,从而使植物的一些生理生化过程随之加强,新陈代谢旺盛,其体内的某些生化成分(如树木叶蛋白、橡胶、杜仲胶以及黄酮等)的含量也相应提高,从而提高林木的利用价值,降低生产成本。有关育种成果已经在生产中得到应用,其中四倍体橡胶树的产胶量比二倍体亲本提高34%^[26];三倍体漆树的产漆量比二倍体高出1~2倍^[27];三倍体桑树在产叶量和叶品质等方面均优于二倍体等^[9,28,29]。(3)抗逆性生态防护型林木新品种选育。多倍体植物一般生活力强,对环