

杨树多倍体诱导 技术研究

康向阳 王 君 著



科学出版社

www.sciencep.com

杨树多倍体诱导技术研究

康向阳 王 君 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

林木多倍体育种综合倍性与杂种优势,可通过一次育种过程实现多目标性状遗传改良,是杨树新品种选育的重要途径和方法。本书汇集了著者在杨树多倍体育种理论与技术研究方面的实践与心得,主要包括杨树多倍体育种研究现状、多倍体诱导与检测技术方法、杨树多倍体育种战略分析等内容。著者尤其重视生殖生物学基础研究的指导作用,并突出多倍体诱导与选育效率,强调染色体加倍技术应用的即时性和可操作性等。

本书可供从事植物遗传育种科研和教学的专业人员以及相关专业的研究生等参考。

图书在版编目(CIP)数据

杨树多倍体诱导技术研究/康向阳,王君著. —北京:科学出版社,2010

ISBN 978-7-03-026099-4

I. 杨… II. ①康… ②王… III. 杨属-多倍体-诱导-研究
IV. S792.110.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 215162 号

责任编辑:张会格 席 慧/责任校对:朱光光
责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

盛 志 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年1月第一版 开本:B5(720×1000)

2010年1月第一次印刷 印张:12 插页:4

印数:1—1200 字数:200 000

定价:48.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

前 言

2008年奥运火炬在珠穆朗玛峰的传递让世人惊叹。在洁白而陡峭的冰峰上,登山运动员肩负火炬,蹒跚前行,从一个营地到另一个营地,一步步地向目标挺进。成功登顶时的欢呼场面至今仍令我们感动。

林木育种工作如同登山。育种同登山一样目标明确,一个个育种目标的实现就如同到达登山途中的营地,不同的是育种总是“山”外有“山”,望不见可以企及的“顶峰”;登山需要熟知地理和气候,而掌握遗传、生殖等生物学特性及其与环境互作等对育种有推动作用;先进的装备是登山者安全登顶的保障,而充裕的科研经费支持和优越的研究平台支撑,可以坚定育种者前行的脚步,加快育种进程;登山者每次成功登顶的背后都离不开许许多多无名英雄的支持,而育种更需要团队协作,也同样聚集了一支默默奉献的研究队伍……

我们选择了林木多倍体育种这座“高山”,并努力从促进理论与技术结合的角度出发探寻前进的道路。从三倍体毛白杨的检出开始,毛白杨天然 $2n$ 花粉及天然三倍体的发现,白杨花粉染色体加倍有效处理时期的明确, $2n$ 花粉参与受精竞争能力差的原因的揭示,不同倍性杨树花粉对辐射敏感性差异的证明与应用,雌花序授粉后施合理化处理诱导杨树三倍体的胚囊染色体加倍细胞学机制的阐明,以及杨树大孢子染色体加倍和合子染色体加倍即时判别方法的解决等,有多少次“山重水复疑无路”的沮丧与茫然,就有多少次“柳暗花明又一村”的振奋与欣喜……但随着一个个育种技术问题的解决,新的问题又会相伴而生……

本书的出版只是我们到达又一个“新营地”的阶段性的总结。其中,第1章简述了林木多倍体育种,尤其是杨树多倍体育种在林业生产中的优势;第2章综述了杨树多倍体诱导与鉴定技术研究的历史、现状及问题;第3章汇总了几种杨树天然 $2n$ 花粉发生及其机制方面的研究进展;第4~7章总结了我们在理化诱导杨树花粉染色体加倍、大孢子染色体加倍、胚囊染色体加倍以及合子染色体加倍技术研究等方面所取得的成果;第8章简述了近期利用三倍体与二倍体杂交选育杨树多倍体的初步结果;第9章介绍了在杨树多倍体检测技术方面的探讨;第10章则阐述了我們有关杨树多倍体育种策略方面的思考等。尽管有些工作仍较为稚嫩,有些技术问题仍有待完善,但我们希望能通过相关工作的总结推动林木多倍体育种研究的发展。同时衷心希望本书的出版能对读者有所帮助,并欢迎批评指正。

感谢国家林业局重点项目“毛白杨三倍体诱导技术体系研究(1999-12)”以及国家自然科学基金“毛白杨 $2n$ 配子分子标记与辅助选择研究(30471407)”、

“授粉后施加秋水仙碱处理诱导白杨多倍体的细胞学研究 (30671708)”等课题资助!感谢北京林业大学学校领导、科技处、生物学院、研究生院、重点实验室和学科的信任与条件保障!感谢林木遗传育种学科同事以及国内同行多方面的鼎力相助!感谢山东冠县苗圃张有慧主任、河北威县苗圃李金忠场长,以及内蒙古通辽市林业科学研究所刘立成所长、付贵生高工、姜鹏高工等在材料采集等方面给予的支持!感谢张平冬博士、高鹏博士、李艳华博士、张正海博士、陈洪伟博士、王君博士等十几位博士以及硕士研究生在杨树花枝采集与培养、多倍体诱导技术和机制研究、杂种苗培育、多倍体无性系测定以及数据采集等方面所付出的智慧与辛劳!尤其要感谢导师朱之悌院士和师母林惠斌教授,是他们引领我走入多倍体育种的领域,从而使我和我的学生们有机会体味这种“高山探宝”的过程!

感谢所有关心、支持我们的前辈、同行和朋友们!

康向阳

2009年7月6日

目 录

前言

1 引言	1
1.1 优良品种及其在林业生产中的地位	1
1.2 林木多倍体育种及其优势	2
1.3 杨树新品种选育与多倍体诱导	3
2 杨树多倍体诱导与鉴定技术研究进展	5
2.1 杨树多倍体诱导的基本途径	5
2.1.1 利用天然 $2n$ 配子杂交选育杨树三倍体	5
2.1.2 利用人工 $2n$ 花粉杂交选育杨树三倍体	7
2.1.3 通过大孢子染色体加倍选育杨树三倍体	8
2.1.4 通过胚囊染色体加倍选育杨树三倍体	9
2.1.5 体细胞染色体加倍选育杨树四倍体	9
2.1.6 不同倍性体间杂交选育杨树多倍体	10
2.2 杨树多倍体诱导的技术方法	11
2.2.1 化学诱导染色体加倍	11
2.2.2 物理因素诱导染色体加倍	13
2.3 杨树多倍体鉴定的技术方法	13
2.3.1 杨树多倍体间接鉴定	13
2.3.2 杨树多倍体直接鉴定	14
2.4 问题与展望	15
3 杨树天然 $2n$ 花粉发生及其利用	17
3.1 毛白杨天然 $2n$ 花粉发生及其细胞学机制	17
3.1.1 毛白杨 $2n$ 花粉发生及其地理变异	17
3.1.2 毛白杨天然 $2n$ 花粉发生机制	22
3.1.3 毛白杨未减数花粉发生的分子标记	29
3.1.4 毛白杨天然未减数 $2n$ 花粉的利用	33
3.2 青杨派树种天然 $2n$ 花粉发生及其细胞学机制	36
3.2.1 青杨派树种天然 $2n$ 花粉发生及其频率	36
3.2.2 ‘通辽杨’天然 $2n$ 花粉发生的细胞学机制	37
4 杨树花粉染色体加倍与三倍体选育	44
4.1 白杨 $2n$ 花粉诱导与三倍体选育	44

4.1.1	毛新杨小孢子母细胞减数分裂进程观察	44
4.1.2	秋水仙碱诱导白杨花粉染色体加倍的有效处理时期	46
4.1.3	高温诱导白杨花粉染色体加倍的有效处理时期	50
4.1.4	白杨 $2n$ 花粉生命力测定及萌发特征观察	54
4.1.5	不同倍性花粉的辐射敏感性差异及其应用	58
4.1.6	银腺杨与毛新杨正反交杂种三倍体的生长情况	65
4.2	青杨派树种 $2n$ 花粉诱导技术研究	66
4.2.1	小青杨 $2n$ 花粉诱导技术研究	67
4.2.2	‘通辽杨’ $2n$ 花粉诱导技术研究	73
5	杨树大孢子染色体加倍选育三倍体	81
5.1	大孢子染色体加倍选育白杨杂种三倍体	81
5.1.1	银腺杨大、小孢子母细胞减数分裂进程及其对应关系	82
5.1.2	秋水仙碱诱导大孢子染色体加倍选育白杨三倍体	84
5.1.3	源于大孢子染色体加倍的白杨杂种三倍体生长情况	85
5.2	大孢子染色体加倍选育青杨派杂种三倍体	86
5.2.1	‘哲引3号杨’大孢子发生进程及其即时判别	86
5.2.2	秋水仙碱处理诱导青杨大孢子染色体加倍选育三倍体	89
5.2.3	高温处理诱导大孢子染色体加倍选育三倍体	92
5.2.4	源于大孢子染色体加倍的青杨杂种三倍体生长情况	96
6	杨树胚囊染色体加倍选育三倍体	98
6.1	白杨胚囊染色体加倍选育三倍体	98
6.1.1	授粉后施加秋水仙碱处理诱导白杨三倍体	98
6.1.2	授粉后施加秋水仙碱处理诱导白杨三倍体的细胞学机制	99
6.1.3	白杨胚囊染色体加倍有效处理时期的判别方法	102
6.1.4	源于胚囊染色体加倍的白杨杂种三倍体生长情况	104
6.2	胚囊染色体加倍选育青杨杂种三倍体	106
6.2.1	‘哲引3号杨’胚囊发育进程	106
6.2.2	‘哲引3号杨’雌蕊柱头最佳授粉时期	108
6.2.3	秋水仙碱处理诱导‘哲引3号杨’胚囊染色体加倍	111
6.2.4	高温处理诱导‘哲引3号杨’胚囊染色体加倍	113
6.2.5	父本‘北京杨’生殖细胞染色体加倍可能性的排除	117
6.2.6	源于胚囊染色体加倍的青杨杂种三倍体生长情况	119
7	杨树合子染色体加倍选育四倍体	121
7.1	‘哲引3号杨’ $\times$ ‘北京杨’双受精及合子发育	121
7.2	秋水仙碱诱导合子染色体加倍选育青杨杂种四倍体	124
7.3	高温诱导合子染色体加倍选育青杨杂种四倍体	124

8 利用三倍体白杨授粉杂交选育多倍体	127
8.1 白杨杂种三倍体小孢子母细胞减数分裂观察	127
8.1.1 毛新杨×毛白杨杂种三倍体小孢子母细胞减数分裂观察	127
8.1.2 银腺杨×毛白杨杂种三倍体小孢子母细胞减数分裂及花粉观察	129
8.1.3 ‘银中杨’三倍体小孢子母细胞减数分裂及花粉观察	136
8.2 利用毛白杨杂种三倍体授粉杂交选育多倍体	141
8.2.1 毛白杨杂种三倍体配子育性观察	142
8.2.2 毛白杨杂种三倍体子代形态变异观察	143
8.2.3 毛白杨杂种三倍体杂交后代染色体数目变异	144
9 杨树多倍体植株的鉴定	146
9.1 染色体计数鉴定杨树多倍体	146
9.2 利用叶片大小鉴定杨树多倍体可行性分析	149
9.3 利用气孔性状鉴定杨树多倍体	151
9.4 间期细胞核染色中心计数鉴定杨树多倍体	153
9.5 流式细胞术鉴定杨树多倍体	157
10 杨树多倍体育种策略的思考	160
10.1 杨树多倍体尤其适合纸浆材等纤维用材生产	161
10.2 生殖生物学研究对于杨树多倍体育种具有推动作用	162
10.3 借鉴杂交育种经验利于提高杨树多倍体育种效果	162
10.4 应重视杨树染色体加倍途径在杂合性利用中的差异性	164
10.5 采取梯次选择策略提高杨树多倍体筛选与测定效率	166
10.6 在杨树多倍体良种选育与推广中应注意的其他问题	168
参考文献	170

1 引 言

在日常生活中我们经常会接触“育种”或“品种”等名词，这些名词涵盖的工作与人类的生活息息相关。其中，对我们的生活影响最为直接且最大的应该是作物新品种。我国之所以能用占世界 7% 的耕地，养活占世界 22% 的人口，作物优良品种选育及其应用的作用最为突出。同样，在现代林木育种理论和技术支持下的林木新品种选育和应用，也对林业生产起到了极为重要的促进作用。

1.1 优良品种及其在林业生产中的地位

据国家林业局第 6 次森林资源清查结果显示，我国森林覆被率为 18.21%，仅相当于世界森林覆被率的 61.52%。森林覆被率低、资源匮乏，而社会需求却不断增加，从而导致进口量加大。近年来我国每年进口木材、纸制品、商品纸浆、废纸等的外汇花费超过 150 亿美元，已成为世界木材及浆纸类产品第一大进口国。为解决木材以及环境问题，我国长期坚持走发展人工林的道路。

我国的人工林发展现状是，造林面积增长迅速，人工林面积居世界首位，但林地生产力相对较低。据统计，2001 年以来每年造林面积增加 800 万 hm^2 以上，人工林保存面积已达到 0.53 亿 hm^2 ，但因造林良种化程度低、经营粗放，导致人工林生产力低，平均蓄积不到 $35 \text{ m}^3/\text{hm}^2$ ，远远低于世界林业发达国家的水平（如日本人工林蓄积 $133.17 \text{ m}^3/\text{hm}^2$ ，德国为 $266 \text{ m}^3/\text{hm}^2$ ）。

与那些森林资源富有国家不同，我国人口众多，大部分有效土地需要发展农业，来解决 13 亿人口的吃饭问题。因此，如何充分利用有限的宜林地资源生产更多的木材，使有限的林地与投入能够在较短的时间里获得较高的回报，成为解决我国林业问题的关键。而要提高单位面积林木产量，达到速生、丰产、高效的目标，无外乎采取以下技术措施：一是增加造林抚育管理投入，优化经营模式，通过加强栽培技术、密度管理、水肥控制等提高单位面积的产量；二是通过林木育种，培育速生、高产、优质、抗逆性强的新品种，使林地相同的管理水平下获得更高的收益。

林木生长周期长，大多栽培环境为荒山荒地，仅仅依靠外部栽培条件的改善是有限度的，特别是对于大面积种植的树种而言，采用人为措施改良林木的栽培条件，投资大、成本高，难以实施。在有限的土地上，甚至是生产力较低的土地上，依赖品种突出的丰产性以及抗逆性，采用优良品种造林，可以减少林业生产投入、增加木材产量、改善木材品质，降低采伐年龄，满足社会需求；同时还可以使林产品规格一致，并改进营林方法和生产方式，带动相关产业及国民经济发

展, 因此林木育种的作用更为重要, 是人工林经营的核心。

国内外的林业生产实践已经证明, 在目前的林木育种水平下, 选育并在造林中使用良种, 可以使人工林轮伐期缩短 $1/3 \sim 1/2$, 单位面积林地树木材积 (单位材积) 生长提高 $20\% \sim 50\%$ 。

1.2 林木多倍体育种及其优势

林木育种的方法比较多, 包括选择育种、杂交育种、倍性育种、诱变育种以及细胞工程育种、基因工程育种等。其中多倍体育种 (polyploid breeding) 是指选育体细胞核含有三套及三套以上染色体组的林木新品种育种过程, 涉及多倍体的诱导、鉴定、扩繁、测试以及品种认证等技术环节。其中多倍体诱导 (polyploid induction) 是多倍体育种的基础和关键, 属于染色体工程范畴。

1935 年, 巨型三倍体欧洲山杨 (*Populus tremula*) 的发现 (Nilsson-Ehle, 1936) 成为林木多倍体育种的开端。就主要利用营养器官的林木多倍体育种而言, 与利用生殖器官的农作物明显不同, 由于许多树种能够进行无性繁殖, 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。具体主要用于如下三个方面。

(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林木新品种由于综合了倍性优势和杂种优势, 遗传改良效果显著, 不但材积生长提速, 而且在木材材性改良方面亦收效明显, 实现了多目标性状综合改良。由于多倍体细胞巨大性使林木的纤维长度增大, 单位材积的纤维细胞数以及细胞表面积则减小, 导致位于细胞间的木质素含量与聚戊糖含量等相对降低, 在木材纤维长度、化学组成等方面表现出明显优势。例如, 三倍体毛白杨 (*P. tomentosa*) 的材积生长超过普通毛白杨 $2 \sim 3$ 倍, 且纤维长, 纤维素含量高, 木质素含量低, 是一种优良的纸浆原料 (姚春丽等, 1992; 姚春丽和蒲俊文, 1998; 房桂干等, 2001)。

(2) 利用组织代谢产物的经济林木新品种选育。多倍体的基因剂量倍增, 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的含量也相应提高。在林木育种中, 多倍体育种可望使利用组织代谢产物的经济树种品质性状得到改善提高, 如树木叶蛋白、橡胶以及黄酮等, 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 (*Hevea brasiliensis*) 的产胶量比二倍体亲本提高 34% (林道拔, 1991); 三倍体漆树 (*Toxicodendron vernicifluum*) 的产漆量比二倍体高出 $1 \sim 2$ 倍 (尚宗燕和张继祖, 1985); 三倍体桑树 (*Morus alba*) 在产叶量和叶品质等方面均优于二倍体桑树 (杨今后和杨新华, 1989; 杨今后等, 1992) 等。

(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能力强, 对环

境适应性也强,抗旱、抗寒以及抗病虫害等优势明显。仅从植物地理分布上看,多倍体大多出现在高纬度、高海拔以及北极、沙漠等气候环境变化剧烈的地区,说明植物多倍体比通常的二倍体具有更强适应不利自然条件的能力。通过多倍体育种可提高林木的抗逆性,相应扩大树种的栽培条件与种植范围,如四倍体柳杉(*Cryptomeria japonica*)的耐寒性增强(Wright, 1976);三倍体欧洲山杨比较耐干旱瘠薄,更适宜于条件较差的山地栽植,而且还表现出较强的抗病能力(Johnsson, 1954; Wright, 1976);三倍体桦木(*Betula*)表现对锈病的抗性增强(Eifler, 1960)等。

1.3 杨树新品种选育与多倍体诱导

杨树是世界上分布最广、适应性最强的树种,具有早期速生、无性繁殖容易等特点,可以迅速成林,在短期内提供木材,是速生丰产林、防护林建设和“四旁”绿化的重要树种。目前,杨树良种选育主要途径是杂交育种,几乎所有的重要杨树树种间都进行过杂交试验,并选育出一大批杨树优良品种(徐纬英, 1988; 马常耕, 1995; 朱之悌, 2006)。

与作物相比,由于杨树为异花授粉植物,生长周期长,性成熟较晚,完成一代改良就需要10~20年的时间,难以仿效作物杂交育种的技术路线,因此也就很难实现杂种优势的充分利用。而只能依赖杨树可以无性繁殖的特点,简单选择利用杂交后代中目的性状表现突出的个体。因此,在目前杨树育种技术水平上,若想使材积等方面的遗传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。

杨树多倍体育种同样始于巨型欧洲山杨三倍体的发现(Nilsson-Ehle, 1936)。20世纪六七十年代曾掀起过杨树多倍体育种的热潮,但并没有取得显著成效,此后研究热点逐渐转向基因工程等领域。而据Leran在1945年和1948年的多倍体育种经验(Lewis, 1980),最适宜于染色体加倍改良的植物应该是:①染色体数目少;②以收获营养体为主;③异花授粉。Dewey(1980)又附加两点,即多年生习性和营养繁殖,并认为由此减少植物对种子生产的依赖性,对多倍体育种的成功有重要的意义。显然杨属植物最符合上述5个条件。

20世纪90年代,我国朱之悌等(1995)利用天然未减数($2n$)花粉杂交成功选育出一批速生、质优的三倍体毛白杨新品种。三倍体毛白杨在材积生长和木材材性改良方面的突出优势,使人们开始重新认识多倍体育种的作用。近年来,我国广泛栽培的‘I-214’(*P. × canadensis* ‘I-214’)、‘中林46’(*P. × euramericana* ‘Zhonglin-46’)、‘沙兰杨’(*P. × canadensis* ‘Sacrau 79’)、‘武黑1号’(*P. × euramericana* ‘Wuhe-1’)、‘辽河杨’(*P. × liaohenica*)、‘廊坊3号’(*P. × langfangensis*-3)、‘银中杨’(*P. alba × P. berolinensis*)等著名杨树品种

相继被证明实际都是三倍体（张守攻等，2003a，2003b，2005；陈成彬等，2004；Zhang et al.，2004）。这些已经在林业生产中得到大规模推广应用的著名杨树品种属于三倍体的事实进一步表明，在主要利用树木营养体的林业生产中，杨树多倍体，尤其是三倍体育种综合倍性与杂种优势，在杨树生长和材性遗传改良方面具有重要的研究、开发和利用价值。

就我国这些已经在生产中应用的杨树三倍体品种而言，实际都来自于杂交过程中天然 $2n$ 配子与正常减数配子的结合。当然，我们可以筛选并利用这些能产生天然 $2n$ 配子的亲本植株进行新的杨树三倍体育种工作，但实际情况是用于选育这些品种的亲本或来自国外，或已经因采伐而丢失，或杂交亲本根本就是随机采取的花枝等， $2n$ 配子植株已无法追寻与鉴定，成功的杂交组合也很难复原。即使我们掌握其中的 $2n$ 配子植株，但由于 $2n$ 配子发生比率较低，其利用受到极大的限制。况且对于那些缺乏 $2n$ 配子杨树亲本的期望杂交组合而言，更不可能指望自然的恩赐。此时我们只有寄希望于人工诱导多倍体的技术途径。

多倍体的诱导实际是针对分裂细胞施加物理或化学方法处理的染色体加倍过程。通过人工诱导选育速生、优质且抗性强的杨树多倍体品种，可以根据需要选配亲本组合，具有机动灵活的特点。而需要解决的问题也很多，如人工诱导杨树多倍体有哪些技术途径可以利用，在杨树多倍体诱导中选择怎样的处理方法和处理方式为好，通过不同诱导途径选育杨树多倍体的技术关键是什么，如何通过理论和技术研究解决这些杨树多倍体诱导的关键技术问题，如何通过一定的技术措施来提高杨树多倍体诱导的效率和效果，又如何从众多的杨树诱变后代中将多倍体筛选出来，以及在杨树多倍体育种中应采取怎样的策略最为经济有效等。这些都是杨树多倍体诱导中必然要面对的问题。有关问题的研究解决，对于推动杨树乃至林木多倍体育种技术进步，以及对于充分发挥杨树多倍体在国家林业生产和生态环境建设中的作用等具有重要的意义。

（康向阳 王 君）

2 杨树多倍体诱导与鉴定技术研究进展

染色体多倍化是植物进化最为重要的方式之一，有 30%~35% 的被子植物经历过一次或数次多倍化事件（洪德元，1990）。多倍体在自然界的广泛分布表明多倍化可以增强植物的适应性和竞争力，而人类也可以效法自然开展多倍体人工诱导及其利用工作。1935 年，Nilsson-Ehle 在瑞典发现了一株叶片巨大、生长迅速的巨型三倍体欧洲山杨，引起了世界对多倍体应用价值的广泛关注，由此成为杨树多倍体育种的开端（Nilsson-Ehle, 1936; Müntzing, 1936）。而一系列杨树多倍体新品种的选育成功和发现（Einspahr et al., 1972; Weisgerber et al., 1980; 朱之悌等，1995; 张守攻等，2003a, 2003b, 2005; 陈成彬等，2004; Zhang et al., 2004），为杨树多倍体诱导及其利用展示了日益广阔的发展前景。

2.1 杨树多倍体诱导的基本途径

植物多倍体育种包括天然多倍体的选择与人工多倍体的诱导。一般而言，杨树天然多倍体已经经历了长期的自然选择与适应，具有很强的遗传稳定性与适应性。然而，杨树天然多倍体数量毕竟是有限的，如何将这些多倍体从其巨大的种群中鉴定出来成为限制其育种利用的难题；况且天然多倍体虽然适应性等表现突出，但在经济性状方面可能很难满足人类的需求，因此人工诱导杨树多倍体成为必然选择。

2.1.1 利用天然 $2n$ 配子杂交选育杨树三倍体

利用天然 $2n$ 配子杂交是获得三倍体的一条最为经济、快捷的途径。在被子植物中， $2n$ 配子发生极为普遍，其中 $2n$ 花粉可通过与正常花粉在大小及形态上的差异而加以区分（Dermen, 1947; Ladizinsky and Shefer, 1982; Myers et al., 1984; Rim and Beuselinck, 1996; Leue and Peloquin, 1980; Veilleux et al., 1982; Orjeda et al., 1990）。就杨属树种而言，Seitz (1954) 最早发现灰杨 (*P. canescens*) 两性花（雌花序上带有部分花药）产生的一些未经减数分裂而形成的体型特大的花粉，用这种花粉对两性花上的雌花进行自花授粉得到了大约 1% 的三倍体。苏联的 Manzos (1960) 筛选出香脂杨 (*P. balsamifera*) 最重的花粉粒给雌花授粉，获得了 2 株三倍体。Larsen 在 1963 年也发现黑杨杂种 (*heidemj*) 花序中存在没有减数的二倍性花粉，并用这些花粉给 2 株雌性美洲黑杨 (*P. deltoides*) 授粉得到了一些三倍体植株（南京林产工业学院，1980）。Mohrdiek (1976) 在西德用灰杨未减数花粉给灰杨、银白杨 (*P. alba*) 和欧洲

山杨授粉, 获得了三倍体, 其在地径、胸径和苗高生长方面比二倍体高 7%~8%。我国的朱之梯等 (1995) 利用毛白杨天然 $2n$ 花粉与毛新杨 (*P. tomentosa* × *P. bolleana*)、银腺杨 (*P. alba* × *P. glandulosa*) 杂交, 最终获得了 26 株生长、材质俱优的异源三倍体。由于天然 $2n$ 花粉的发生具有偶然性, 比率较低, 且与单倍性正常花粉相比存在受精竞争能力差等问题, 给利用造成困难。

植物 $2n$ 雌配子不像 $2n$ 花粉那样能够通过形态观察而检出, 一般只是通过对其杂交后代倍性水平的检验来确定 $2n$ 雌配子的发生, 因此有关利用天然 $2n$ 雌配子杂交获得杨树多倍体的报道较少。只有张金凤 (2006) 利用简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR) 分子标记技术研究一株由天然 $2n$ 花粉授粉杂交途径获得的欧美杨 (*P. × euramericana*) 四倍体植株时, 发现该四倍体的母本存在源于减数第 I 次分裂复原 (first division restitution, FDR) 的天然 $2n$ 雌配子。由于天然 $2n$ 雌配子不存在类似 $2n$ 花粉那样与单倍性配子的竞争问题, 即使其发生的比率较低, 如能通过一定的技术手段选择出 $2n$ 雌配子植株, 仍具有非常高的研究与利用价值。

有关杨树 $2n$ 配子发生机制的研究相对较少。康向阳 (1996a, 2002a) 连续多年对 18 株不同产地的毛白杨花粉进行观察发现, 大多数雄株均可产生 $2n$ 花粉, 且因无性系和年度不同而表现出一定的差异; 毛白杨 $2n$ 花粉发生主要受遗传因素控制, 但环境条件影响也起一定的作用; 通过细胞学研究推测毛白杨 $2n$ 花粉可能来源于平行纺锤体合并, 以及因平行纺锤体而引起细胞板组建紊乱, 进而导致胞质分裂发生异常等两条途径。张正海 (2008) 利用乙酸洋红压片观察, 同样发现在毛白杨小孢子母细胞减数分裂中期 II 存在平行纺锤体, 并最终形成一定比率的三分体和二分体; 进一步通过间接免疫荧光观察推断, 异常纺锤体微管系统定位紊乱引起部分细胞的纺锤体极点融合, 导致 $2n$ 花粉形成; 而减数第 II 次分裂胞质分裂提前也可能是毛白杨产生 $2n$ 花粉的原因。王君 (2009) 发现我国小青杨 (*P. pseudo-simonii*)、小叶杨 (*P. simonii*)、‘通辽杨’ (*P. simonii* × *P. nigra* ‘Tongliao’) 等青杨派树种及杂种无性系能产生天然 $2n$ 花粉, 进一步利用乙酸洋红压片和微管骨架免疫荧光分析发现, ‘通辽杨’小孢子母细胞减数分裂末期 II 部分细胞中存在成膜体 (phragmoplast) 缺失现象, 推断由减数分裂末期 II 细胞成膜体缺失导致的胞质分裂异常是其 $2n$ 花粉发生的主要细胞学机制。

最近, 在我国广泛栽培的著名杨树天然或人工杂交品种欧美杨 ‘I-214’、‘中林 46’、‘沙兰杨’、‘武黑 1 号’、‘辽河杨’、‘廊坊 3 号’、‘银中杨’等相继被证明实际都是三倍体 (张守攻等, 2003a, 2003b, 2005; 陈成彬等, 2004; Zhang et al., 2004)。不论这些三倍体来源于天然 $2n$ 雌配子, 还是天然 $2n$ 花粉, 都进一步表明, 如果杨树中存在天然 $2n$ 配子, 就有直接利用这种 $2n$ 配子进行三倍体育种的可能。

2.1.2 利用人工 $2n$ 花粉杂交选育杨树三倍体

人工诱导花粉染色体加倍是树木人工多倍体育种中最为快捷的途径。Johnson 和 Eklundh (1940b) 最早采用秋水仙碱处理欧洲山杨、美洲山杨 (*P. tremuloides*) 雄花枝, 取得了一些 $2n$ 花粉, 然后给雌花序授粉, 均得到了三倍体植株。此后在美洲黑杨、香脂杨、银白杨、毛新杨、银腺杨、大青杨 (*P. ussuriensis*)、小青杨等杨树中, 均通过秋水仙碱处理获得了一定比率的 $2n$ 花粉 (Gulyaeva and Sviridova, 1979; 张志毅和李凤兰, 1992; 康向阳, 1996a; Zhang et al., 1997; 黄权军等, 2004; 张金凤, 2006; 李开隆等, 2006; 王君, 2009)。其中, Gulyaeva 和 Sviridova (1979) 将杨树雄花枝水培于温度为 22°C 、湿度为 $75\%\sim 85\%$ 的环境中, 在小孢子母细胞减数分裂前期剥掉花芽的鳞片, 用 1% 的秋水仙碱处理得到了 $2n$ 花粉。张志毅和李凤兰 (1992) 采用 $0.2\%\sim 0.5\%$ 的秋水仙碱溶液处理水培一定时间的毛新杨雄花芽诱导出 $2n$ 花粉, 并用这些花粉授粉获得了三倍体。黄权军等 (2004) 对比了秋水仙碱与戊炔草胺、安磺灵和氟乐灵等药剂诱导白杨 $2n$ 花粉的效果, 证明仍然以秋水仙碱诱导 $2n$ 花粉的效果最好, 但处理费用相对较高; 从中筛选出秋水仙碱的替代化学试剂——戊炔草胺, 其中以浓度为 $200\ \mu\text{mol/L}$ 注射 4 次的处理效果最好, 能诱导产生高达 84.4% 的毛新杨 $2n$ 花粉。

在进行人工诱导花粉染色体加倍时, 掌握树种的相关细胞遗传学规律可以取得事半功倍的效果。康向阳 (1996a, 1999a) 在掌握小孢子母细胞减数分裂规律的基础上, 明确了施加秋水仙碱溶液处理诱导白杨花粉染色体加倍的有效处理时期为小孢子母细胞减数分裂粗线期附近, 适时处理最高可获得 88% 的 $2n$ 花粉, 显著提高了 $2n$ 花粉的诱导效率和效果。进一步研究证明, $2n$ 花粉萌发相对迟缓而导致的受精竞争能力差是利用 $2n$ 花粉授粉杂交途径选育三倍体得率低的根本原因 (康向阳和朱之悌, 1997); 为解决这一问题, 尝试采用了多种提高 $2n$ 花粉竞争力的方法, 证明利用花粉倍性对辐射敏感性 (radiation sensitivity) 的差异可显著增进 $2n$ 花粉在受精过程中参与竞争的概率, 并成功地获得了 16 株毛新杨 $\times$ 银腺杨、银腺杨 $\times$ 毛新杨杂种三倍体 (康向阳等, 2000b), 从而成功地建立了以细胞遗传学研究为基础, 综合花粉染色体加倍、花粉辐射和杂交育种等技术, 高效选育白杨杂种三倍体的技术体系, 为三倍体“大群体、强选择”育种奠定了基础。

与化学诱导相比, 物理诱导具有操作简单、费用低廉、可一次处理大批材料等优点。Mashkina 等 (1989a) 采用 $38\sim 40^{\circ}\text{C}$ 的高温处理小孢子母细胞减数分裂处于前期 I 的香脂杨、美洲黑杨、银白杨及银白杨和欧洲山杨杂种 (*P. alba* $\times$ *P. tremula*) 等的雄花枝 $1.5\sim 2\ \text{h}$, 得到了最高 94.4% 的 $2n$ 花粉, 并用这些 $2n$ 花粉杂交, 获得了三倍体。张志毅和李凤兰 (1992) 用 40°C 高温处理水培一定时间的毛新杨雄花芽, 获得了高达 66.25% 的 $2n$ 花粉比率。康向阳等

(2000c) 研究证明, 在小孢子母细胞减数分裂终变期至中期 I 时施加高温处理诱导杨树 $2n$ 花粉的效果最好, 最高可获得 87.6% 的 $2n$ 花粉, 但花粉量较少。王君 (2009) 在施加高温处理诱导小青杨、‘通辽杨’ $2n$ 花粉时也得到了相似的结果。从目前的研究结果看, 高温诱导杨树 $2n$ 花粉很难保证花粉产量, 相关技术有待进一步研究。

由于不能完全排除单倍性花粉的影响, 三倍体得率仍然是比较低的 (康向阳等, 2000b), 从而限制了通过 $2n$ 花粉授粉杂交选育杨树三倍体途径的利用。在今后的研究中, 有必要进一步探讨新的剔除单倍性正常花粉影响或提高 $2n$ 花粉的竞争力的技术方法。

2.1.3 通过大孢子染色体加倍选育杨树三倍体

既然可以通过理化处理诱导 $2n$ 花粉, 当然也可以对大孢子母细胞减数分裂过程施加理化处理诱导 $2n$ 大孢子。 $2n$ 大孢子进一步发育形成 $2n$ 雌配子后, 对这种 $2n$ 雌配子授以正常花粉可 100% 形成三倍体。李云等 (2000, 2001) 报道采用秋水仙碱和高温处理水培 1~5 d 的毛新杨等雌花芽, 再授以正常花粉获得了三倍体植株。从其花芽发育时期判断, 应该是抑制白杨大孢子母细胞减数分裂中期 I 或中期 II 而实现大孢子染色体加倍的结果。与花粉染色体加倍相比, 由于大孢子母细胞减数分裂进程不能即时观察, 难以确定影响雌配子染色体加倍的减数分裂有效处理时期, 因此有关大孢子染色体加倍研究主要是通过对大量白杨试验材料的批次处理及筛选, 工作量大, 而三倍体得率却较低, 且可重复性较差, 从而限制了 $2n$ 大孢子诱导及其育种应用。

解决大孢子母细胞减数分裂进程即时判别问题, 避免加倍处理的盲目性, 是大孢子染色体加倍选育三倍体技术突破的关键。李艳华等 (2005) 利用白杨雌、雄花芽发育进程的时序性相关, 以雄配子发育进程为参照, 相对准确地解决了大孢子染色体加倍的有效处理时期即时判别的技术方法问题; 并进一步采用雄配子发育进程为参照适时加倍处理, 获得了高达 16.7% 的三倍体诱导得率 (Li et al., 2008), 使白杨大孢子染色体加倍诱导三倍体技术趋于实用化。王君 (2009) 则针对一些杨树缺少雄株参照系的问题, 提出以雌花芽发育形态为参照即时判别青杨派树种大孢子染色体加倍有效处理时期的方法, 首次通过理化处理诱导大孢子染色体加倍途径获得青杨派杂种三倍体 159 株。其中, 施加秋水仙碱处理诱导大孢子染色体加倍的最佳处理时期为大孢子母细胞减数分裂粗线期至双线期, 三倍体得率最高达 13.04%; 施加高温处理诱导大孢子染色体加倍的最佳处理时期为减数分裂双线期至中期 I, 三倍体得率最高达 60% 以上。

无论是以雄配子发育进程为参照, 还是以雌花芽发育形态为参照, 虽然不能像花粉染色体加倍那样做到适时处理, 但至少可保证染色体加倍处理能集中于一个较短的时间段进行, 从而大大减轻了工作量, 同时提高三倍体诱导效率和效果。

2.1.4 通过胚囊染色体加倍选育杨树三倍体

杨树的胚囊发育类型属于蓼型 (*Polygonum* type)。蓼型胚囊发育方式是被子植物中最常见的一种, 约有 70% 被研究过的植物均属此种类型 (Maheshwari, 1950), 其发育过程可分为两个阶段, 即大孢子发生和雌配子体发生 (Drews et al., 1998)。由于蓼型胚囊从功能大孢子到成熟胚囊的发育过程中要经历三次有丝分裂, 而针对这三次有丝分裂过程施加以理化处理, 应该也可以获得 $2n$ 雌配子。

康向阳等 (2004) 以银腺杨为母本、毛白杨为父本, 对授粉后一定时间的雌花序施加秋水仙碱处理, 其中授粉后 24~36 h 施加秋水仙碱处理获得了三倍体植株, 最高处理组合的三倍体得率高达 57.1%, 这一发现为高效诱导白杨三倍体找到了又一条新的途径。李艳华 (2007) 对银腺杨进行胚胎学研究后, 发现对银腺杨授粉后雌花序施加秋水仙碱处理诱导三倍体的有效处理时期正好处于胚囊发育过程; 鉴于在授粉 24 h 之前父本毛白杨花粉的生殖核早已完成有丝分裂形成两个精子, 从而判断授粉后施加秋水仙碱诱导三倍体实际是胚囊染色体加倍产生的 $2n$ 雌配子受精的结果。

王君等 (2007, 2009) 以 ‘哲引 3 号杨’ (*P. pseudo-simonii* × *P. nigra* ‘Zheyin3#’) 雌蕊柱头最佳授粉时期作为起始参照点估测胚囊发育进程, 通过胚囊染色体加倍途径获得青杨派杂种三倍体 68 株, 并证明四核胚囊期是施加以理化处理诱导 ‘哲引 3 号杨’ 胚囊染色体加倍选育三倍体的最佳始处理时期。其中, 施加秋水仙碱处理诱导胚囊染色体加倍以授粉后 54~66 h 的处理效果最好, 三倍体得率最高达 66.7%; 施加高温处理诱导胚囊染色体加倍以授粉后 66~72 h 处理效果较好, 三倍体得率最高达 40%。

显然, 授粉后施加秋水仙碱溶液处理时机的掌握同样是决定胚囊染色体加倍成功与否的关键。以授粉为参照点结合胚囊发育进程观察, 确定授粉后一定时间内进行处理是目前理想而现实的选择。但该方法受培养环境影响较大, 有必要从技术层面上寻找更为有效的胚囊发育时期判别方法。

2.1.5 体细胞染色体加倍选育杨树四倍体

体细胞染色体加倍是最早获取植物多倍体的有效途径。有关研究表明, 机械损伤、高温和低温、辐射、化学试剂等理化处理方法均可获得多倍体, 其中以秋水仙碱诱导效果最佳。尽管在多倍体诱导过程中, 根据植物种的生物学特性、处理的材料及环境温度差异等, 选取不同的处理方法和方式, 掌握最佳处理时期, 并适时调整处理剂量以及持续处理时间, 可增进诱导效果 (康向阳, 1996a, 2002b)。然而在选用多细胞诱变材料时, 由于细胞分裂的不同步性, 很难做到使所有的细胞染色体加倍, 因此体细胞染色体加倍最终获得的大多是混倍体或嵌合体, 影响了倍性优势的发挥。

杨树体细胞染色体加倍相关研究较多, 主要是通过施加以理化因素处理顶芽、种子、合子、幼胚以及愈伤组织等材料诱导四倍体植株 (Mattila, 1961;