

大黍无融合生殖研究概况

王艳 许秋生 叶秀麟*

(中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650)

摘要: 从胚胎学和遗传学角度论述了大黍(*Panicum maximum* Jacq.)的无融合生殖研究进展和存在的问题, 展望了大黍作为无融合生殖基因供体, 在无融合生殖研究上的利用前景。

关键词: 大黍; 无融合生殖; 胚胎学; 遗传学

中图分类号: Q944.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2003)01-0083-04

Apomixis in Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.)

WANG Yan XU Qiu-sheng YE Xiu-lin*

(South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: This paper presents recent advances in apomixis studies on embryology and genetics in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). Some problems in relation to apomixis research on guineagrass are discussed. It is pointed out that guineagrass is a promising material both for theoretical and applied studies of apomixis.

Key words: Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.); Apomixis; Embryology; Genetics

大黍(*Panicum maximum* Jacq.)是一种具有无融合生殖(apomixis)特性的热带牧草, 属禾本科黍属植物。其无融合生殖方式是伴随有假受精的无孢子生殖(apospory), 属兼性无融合生殖^[1]。从 50 年代开始至今, 对大黍在胚胎学和遗传学等方面的无融合生殖研究都取得了一定的进展, 并在遗传育种的应用上进行了初步探索, 本文对有关研究进行概述并阐明大黍作为无融合生殖基因供体的优越性。

1 胚胎学研究

在胚胎学水平上, 对大黍的无融合生殖研究最初主要集中在采用切片技术对其发育过程进行观察描述。后来, 采用一些改进的方法(如整体透明法)和不同的手段, 对大黍的无融合生殖有了更深入的认识和了解, 但主要还是在显微结构水平上。此后, 人们尝试用电子显微镜对大黍的无融合生殖超微结构进行研究, 取得了初步进展。但是到目前为止, 还没有找到与大黍胚珠内的不同发育阶段相关的小穗外部形态性状, 也就是说, 还无法根

据它的花部发育特征来用肉眼直接判断出胚珠内无融合生殖的发育时期, 这就给切片取材工作带来了很大的盲目性。因此对大黍的超微结构的研究有相当的难度, 还有待于在方法上的突破。

1.1 无孢子生殖原始细胞

Warmke 1954 年首次报道了大黍的无孢子生殖, 指出大黍的无孢子生殖胚囊起源于由珠心细胞特化而来的无孢子生殖原始细胞^[1]。在后来的研究中, 人们从不同的角度对大黍的无孢子生殖原始细胞进行了进一步的研究, 结果发现: (1) 珠心组织的各层体细胞均有特化为无孢子生殖原始细胞的潜能, 但以珠孔端潜能最大、频率最高^[2]。(2) 大多数情况下, 在大孢子四分体时期, 一个或多个珠心细胞开始膨大, 特化为无孢子生殖原始细胞^[1]。从开始出现第一个原始细胞到细胞发育成的胚囊成熟这段时期内, 不断地有新的原始细胞分化出来, 并随着胚珠的发育而逐渐增多^[2]。因此, 在大黍胚珠中的原始细胞具有出现频率高、持续时间长的特征。(3) 在显微结构水平上, 大黍的无孢子生殖原始细胞的细胞质不同程度液泡化, 细胞和细胞核膨大^[1]。在超微结构水平上, 发育初期细胞及细胞核体积增

收稿日期: 2002-05-08 接受日期: 2002-06-27

基金项目: 国家自然科学基金(30190061)

* 通讯作者 Corresponding author

大,内含许多小液泡和泡囊,壁薄,极少有胞间连丝,随后胞间连丝完全消失,壁增厚,中央核周围分化出大液泡^[3]。

1.2 无孢子生殖胚囊

1.2.1 胚囊发育的类型

在大黍的有性生殖类型中,胚囊发育方式为蓼型。在无融合生殖类型中,发育方式为大黍型^[1]:首先,一个或多个珠心细胞膨大,特化为无孢子生殖原始细胞。接着,无孢子生殖原始细胞并不进行减数分裂,而是直接发育成胚囊,因此所形成的胚囊是未减数的。胚囊的发育过程中,核发生两次连续的有丝分裂,共形成四核。成熟胚囊有两种类型^[1,2,4],一种为四核四细胞型,包含一卵细胞,两个助细胞和一个极核;另一种为四核三细胞型,包含一卵细胞,一个助细胞和两个极核。

大黍无融合生殖胚囊成熟后,卵细胞不受精,但需受精的刺激才能分裂形成无融合胚,胚乳的形成与有性生殖一样,需极核与精核的融合,属假受精类型^[1]。因此,四细胞型的无融合生殖中染色体数为胚:胚乳:母本组织=2:3:2,而三细胞型的为胚:胚乳:母本组织=2:5:2。由于2:3:2的比例与有性生殖胚囊受精后的情况相同,它更有利于保持平衡,使种子发育更易成功。据此推测,如果其它条件相同,那么具四细胞型的大黍的结实率可能比三细胞型的大黍的结实率要高。

此外,Warmke在大黍的研究中曾观察到胚珠内出现了未减数的八核七细胞型胚囊(包含一卵细胞,两个助细胞,两个极核和三个反足细胞),并因此将大黍无融合生殖胚囊划分为八核型和四核型分别加以描述和讨论^[1]。但是在后来有关大黍无融合生殖的研究中,再没有这类未减数的八核七细胞型胚囊的相关报道。

1.2.2 关于多胚囊现象

大黍的多胚囊现象较普遍,一直受到大黍研究者的关注。Chen和Kozono^[2]对大黍的多胚囊现象进行了较全面的研究,观察到大黍多胚囊的五种现象:(1)一个或多个四核型无融合生殖胚囊存在于同一珠心组织中;(2)两个有性生殖胚囊(五核型^[5]或八核型)存在于同一珠心组织中;(3)胚珠中只有一个八核型有性生殖胚囊存在;(4)一个有性生殖胚囊(五核型或八核型)和一个或多个四核型无融合生殖胚囊存在于同一珠心组织中;(5)两个有性生殖胚囊(五核型或八核型)和一个或多个四核型无融合生殖胚囊存在于同一珠心组织中。

他们对胚珠中同时出现两个有性生殖胚囊的原因进行了探讨,推测有性生殖胚囊可能有两种起源方式:(1)胚珠中有两个大孢子发育成熟,并都进一步形成有性生殖胚囊;(2)无孢子生殖原始细胞除了发育成四核型无融合生殖胚囊外,也会形成五核型或八核型有性生殖胚囊^[2]。在其它具有多胚囊现象的植物中,同一胚珠中由两个大孢子母细胞发育成两个有性生殖胚囊的现象是存在的。但认为无孢子生殖原始细胞能形成五核或八核型有性生殖胚囊,还缺乏足够的证据。更有可能的情况是如前所述,即Warmke曾观察到的特殊的八核型无融合生殖胚囊,那么两个八核胚囊存在于同一珠心中,其中一个可能就是未减数的八核胚囊(起源于无孢子生殖原始细胞),而并非有性生殖胚囊。

2 遗传学研究

分子生物学的手段和方法引入无融合生殖研究,使最终阐明无融合生殖的机制成为可能,并为无融合生殖的应用带来了希望。

2.1 无融合生殖基因的特征

为了实现定位和克隆植物无融合生殖基因,科学家利用遗传操作手段来改变植物的生殖方式,对无融合生殖的遗传机理做了大量的研究。结果发现,控制无融合生殖的基因数目及其显隐性,不同植物表现不同^[6-20]。

到目前为止,在大黍的无融合生殖遗传机理研究中,人们普遍接受单基因控制模式,认为大黍的无融合生殖可能是遵循显性单基因的简单遗传模式^[13,17,21-29]。

2.2 无融合生殖的 DNA 分子标记

通过PCR(聚合酶链式反应)产生的RAPD markers, RFLP markers, DDRF、SDRF markers, STS marker都可作为分子标记进行有性生殖和无融合生殖的区分研究,在染色体上定位。Ebina等对大黍的RAPD分析结果发现:在所用的16个引物中有8个可以区分无融合生殖和有性生殖。其中以OPC4为引物时,可找到一段能明显区分有性生殖和无融合生殖的0.9 kb的特殊带型,这种RAPD带型具有无融合生殖特异性,只存在于无融合生殖体中^[27]。它为直接通过分子标记法对大黍进行生殖类型的区分和鉴定提供了可能性。

2.3 无融合生殖基因的分离

为分离大黍无融合生殖基因,人们进行了不同

的尝试,但目前还没有取得突破性的进展。

Chen 等从大黍成功分离出与无融合生殖胚囊发育有关的 A2-134 cDNA,以无融合生殖特异基因 *ASG-1* 为标志。该基因只在无融合生殖类型的花蕾中表达,在有性生殖类型中不表达,同时该基因只在大孢子发生时才开始表达,并且只能在无孢子生殖原始细胞出现的阶段才能找到。对其序列分析表明,A2-134 cDNA 由约 1 177 bp 组成,编码 1 个含 305 个氨基酸、分子量为 34.2 kD 的蛋白质,而且该蛋白质的氨基酸序列与种子特异性和干旱诱导基因 *RD22*、未知种子蛋白前体 *USP*、生长素负调节基因 *ADR6p* 等相近,推测 A2-134 的表达可能会引起珠心细胞的膨大,从而启动无融合生殖原始细胞的发生;它还可能与生长素的调节和细胞壁的生长有关。Southern blot 结果表明,该基因在有性生殖和无融合生殖类型中都存在,表明 *ASG-1* 是与有性胚囊发育有关的基因的修饰变异,因而推断兼性无孢子生殖可能是由于控制有性基因行使正常功能的程序失败导致的^[29]。在了解无融合生殖,尤其是无孢子生殖的分子机制,以及将无融合生殖特性导入重要作物方面,这一 cDNA 库和 *ASG-1* 基因将成为有效的工具,也为定位和克隆植物无融合生殖基因以及利用遗传操作的手段来改变植物的生殖方式奠定了理论基础。

2.4 无融合生殖特性在遗传育种上的应用前景

农业生产上,由于具有杂种优势的杂种后代会发生性状或育性的分离,而导致了生产上只能利用杂交一代的杂种优势,需要年年制种。二倍体无融合生殖没有经过减数分裂,能形成与母体植株遗传构成完全相同的后代个体,所以,如果将这种无融合生殖特性导入有杂种优势的 F_1 ,可以使 F_1 既有杂种优势,又能将优势代代相传,即固定杂种优势。大黍的无孢子生殖类型属于二倍体无融合生殖的一种,因此在固定杂种优势上具有较大的研究和开发价值。

大黍的无融合生殖特性除了在自身的育种研究上得到了应用^[21,29]之外,人们也常常将大黍作为无融合生殖基因供体,试图将其无融合生殖特性导入其它重要的农作物中。在我国,利用粳稻广亲和品系 02428 与大黍品系 OK85,经过不对称体细胞杂交后,已经成功地获得再生植株,移栽成活植株能开花且具有无融合生殖的某些特征^[30]。此外,还通过穗茎注射法,将大黍总 DNA 导入香 2B,明恢 63 和桂 99 等水稻品系,在 D_1 代群体中就获得生殖性

状发生明显改变的单株^[31]。目前,日本和美国正在尝试从大黍中克隆出无融合生殖基因,然后通过生物技术将它导入其它重要农作物中。

3 问题及展望

多年来对大黍无融合生殖的研究,无论在细胞水平上,还是在分子水平上都开展了一些工作,对无融合生殖的胚胎发育、遗传机制到育种等方面都进行了大量的研究,并取得了一定的进展,但离完全揭开其无融合生殖机理还有很大的距离。目前,以有性生殖为基础的生物学科知识尚不能解释无融合生殖的诸多问题,这主要是由于植物本身的复杂性和现有实验技术的限制性等因素造成的。因此,至今还存在着许多有待解决的问题,如:(1)在大黍的同一珠心内可以同时存在有性生殖的大孢子母细胞、无孢子生殖的原始细胞和普通的珠心细胞。怎样理解在同一基因型的组织中不同细胞之间能出现明显的分化?(2)大黍无孢子生殖原始细胞发生之前,大多数情况下都有有性生殖的行为,只是发育到大孢子四分体时期便退化、解体了。是什么原因导致了这种状况的发生?有性生殖的退化和无融合生殖的发生之间是否存在联系?如果有,又是什么程度、什么方式的联系?(3)目前,在很多植物中,包括有性生殖类型、专性无融合生殖类型以及兼性无融合生殖类型,都发现有胚珠附器的存在。大黍中未见关于胚珠附器的报道,但是从其它有关大黍研究的图片中^[2],可以看出大黍很可能具有这样的结构。对胚珠附器的深入研究,有利于更全面的理解胚珠发育的营养机制,以及有性生殖和无融合生殖的本质区别。(4)将大黍的无融合生殖特性导入重要农作物,通过常规杂交法是很难成功的,因为这种杂交一般都是属间远缘杂交。所以主要依靠基因工程技术进行无融合生殖基因的导入。但是,大黍无融合生殖基因还未克隆成功,目前还无法利用基因工程手段操作,还有待对其生殖方式的遗传基础进行更深入的研究。

无融合生殖作为一种新的遗传育种工具不仅可能为传统农业带来变革,同时它还是国际生殖生物学研究的热点,二十世纪七十年代以后这一领域的研究十分活跃。在无孢子生殖类型中,无融合生殖胚囊起源于无孢子生殖原始细胞,这些原始细胞只出现于无融合生殖类型的胚珠中。据此推测无孢子生殖原始细胞出现的时间可能与无融合生殖基因表达时间一致^[2]。因此,为了阐明无融合生殖的机

制,实现无融合生殖特性在农业生产上的应用,有必要首先对无孢子生殖原始细胞的形成和发育进行深入的研究。大黍无孢子生殖原始细胞不但出现的频率高,而且持续的时间长,此外,其遵循显性单基因的简单遗传模式,这些都使大黍无融合生殖基因的定位、分离和克隆研究更具可行性。因此,以大黍为无融合生殖基因供体,进行无融合生殖的理论和应用研究,将更易获得鼓舞人心的进展。

参考文献

- [1] Warmke H E. Apomixis in *Panicum maximum* [J]. Amer J Bot, 1954, 41:5-11.
- [2] CHEN L Z, Kozono T. Cytology and quantitative analysis of aposporous embryo sac development in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) [J]. Cytologia, 1994, 59:253-260.
- [3] Naumova T N, Willemse M T M. Ultrastructural characterization of apospory in *Panicum maximum* [J]. Sex Plant Rep, 1995, 8:197-204.
- [4] Bashaw E C, Hanna W W. Apomictic reproduction [A]. In: Chapman G P. Reproductive Versatility in the Grasses [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 100-130.
- [5] Nakajima K, Mochizuki N. Degrees of sexual plants of guineagrass by the simplified embryo sac analysis [J]. Japan J Breed, 1983, 33: 45-54.
- [6] Cai D T (蔡得田), Chen D L (陈冬玲). Growing up biological focus: apomixis [J]. Progress Biotechn (生物工程进展), 1995, 15 (3):34-40. (in Chinese)
- [7] Nogler G A. Genetics of apomictic reproduction [J]. Gior Bot Ital, 1986, 120:49-52.
- [8] Peacock W J. Genetic engineering and mutagenesis for apomixis in rice [J]. Apomixis Newsl, 1992, 4(4):3-7.
- [9] Bashaw E C, Hussey M A. Apomixis in *Cenchrus* [A]. In: James H Jr, Miksche J P. Proceedings of Apomixis Workshop [C]. USDA-ARS. 1992. ARS-104. 1-4.
- [10] Taliaferro C M, Bashaw E C. Inheritance and control of obligate apomixis in breeding buffelgrass, *Pennisetum ciliare* [J]. Crop Sci, 1966, 30(6):473-376.
- [11] Rutishauser A. Genetik der Pseudogamie bei *Ranunculus auricomus* [J]. S L W Koch Ber Schw Bot Ges, 1965, 75:157-182.
- [12] Jassem M. Apomixis in the genus Bcta [J]. Apomixis Newsl, 1990, 2(2):7-23.
- [13] Asker S E, Jerling L. Apomixis in Plant [M]. London: CRC Press, 1992. 100-190.
- [14] Nogler G A. Embryology of Angiosperms [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1984. 475-518.
- [15] Sun J S (孙敬三), Liu Y S (刘永胜), Xin H W (辛化伟). Apomixis in Angiosperms [J]. Chin Bull Bot (植物学通报), 1996, 13(1):1-8. (in Chinese)
- [16] Gao J W (高建伟), Li Z D (李志德), Sun Q X (孙其信), et al. Advance of apomixis in plant [J]. Progress Biotechn (生物工程进展), 2000, 20 (5): 43-47. (in Chinese)
- [17] Asker S. Apomixis in plant [J]. Hereditas, 1979, 91(2):231-240.
- [18] Carman J. Gametophytic angiosperm apomicts and the occurrence of polyspory and polyembryony among their relatives [J]. Apomixis Newsl, 1995, 7(8):39-53.
- [19] Anna M K, Ross A R, Abdul M C. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization [J]. Plant Physiol, 1995, 108(1):1345-1352.
- [20] Nogler G A. Genetics of apomictic reproduction [J]. Gior Bot Ital, 1986, 120(2):49-52.
- [21] Nakajima K. The introduction of *Panicum maximum* and the apomixis breeding [J]. Grassland Pasture (草原与牧草), 1991, (3): 17-21.
- [22] Savidan Y H. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) [A]. In: Smith J A, et al. Proc Int Grassl Congr [C]. Boulder: Westview Press, 1983. 182-184.
- [23] Nolger G A. Genetics of apospory in apomitic *Ranunculus auricomus* V. Conclusion [J]. Bot Hel, 1984, 94:411-422.
- [24] Asker S. Gametophytic apomixis: elements and genetic regulation [J]. Hereditas, 1980, 93:277-293.
- [25] Hanna W W, Bashaw E C. Apomixis: Its identification and use in plant breeding [J]. Crop Sci, 1987, 27:1136-1139.
- [26] Savidan Y, Carman J G, Dresselhaus T. Genetic analysis of apomixis[A]. In: The Flowering of Apomixis from Mechanisms to Genetic Engineering [C]. Italy, 2001. 64-79.
- [27] Ebina, Masumi, Toshiya Yamamoto, et al. Molecular markers of apomixis in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) [A]. In: Utilization of Transomic Plant and Genome Analysis in Forage Crops [C]. Japan, 1998. 173-178.
- [28] Chen L Z, Miyazaki C, Kojima A, et al. Isolation and characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic guineagrass (*Panicum maximum*) [J]. J Plant Physiol, 1999, 154:55-62.
- [29] Hitoshi H, Hanna W.W. Induced sexual tetraploids for breeding guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) [J]. J Japan Grassl Sci, 1992, 38(2):152-159.
- [30] Xin H W (辛化伟), Sun J S (孙敬三), Yan Q S (颜秋生), et al. Plant regeneration from asymmetric somatic hybrids of *Oryza sativa* and *Panicum maximum* [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1997, 39 (8): 717-724. (in Chinese)
- [31] Zhao B R (赵炳然). Thought of apomixis research in rice [J]. Crop Res (作物研究), 1995, 9 (3): 1-6. (in Chinese)