

四倍体双穗雀稗兼性无孢子生殖的研究

马国华¹ 赵南先¹ 黄学林²

(1. 中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650; 2. 中山大学生命科学学院, 广东广州 510275)

摘要: 研究了四倍体双穗雀稗(*Paspalum distichum* L.)无孢子生殖胚囊、胚胎发育以及假受精特点。当其大孢子母细胞发育至四分体阶段时,大多数情况下会发生四分体退化,同时有多个特化珠心细胞发育为1-3个无孢子生殖胚囊的现象。成熟无孢子生殖胚囊一般3核,包括1个卵细胞和2个极核。卵细胞在抽穗前就能自发分裂形成原胚团,而极核则在抽穗和传粉后参与假受精形成胚乳。当胚珠内存在多个无孢子生殖胚囊时,只是靠近珠孔端的1个无孢子生殖胚囊内的极核与精核结合,而其它的并不参与。种子成熟后出现很低频率的二胚苗。此外,还能观察到少量的有性生殖胚囊的发育以及有性生殖胚囊和无孢子生殖胚囊在同一胚珠中的发育现象,因此判断该类群为兼性无孢子生殖体。

关键词: 双穗雀稗; 无融合生殖; 无孢子生殖

中图分类号: Q944.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2003)03-0255-05

Facultative Apospory in Tetraploid *Paspalum distichum* L.

MA Guo-hua¹ ZHAO Nan-xian¹ HUANG Xue-lin²

(1. South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. College of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Development of aposporous embryo sac, embryo and pseudogamy were studied in tetraploid *Paspalum distichum*. In most cases, shortly after the megasporocyte developed into a tetrad, it began to deteriorate, meanwhile several nucellar cells became active and enlarged. Normally, 1-3 nucellar cells developed into mature aposporous embryo sacs characterized by 1 egg cell and 2 polar nuclei. The egg cell could spontaneously develop into proembryo prior to anthesis, whereas polar nuclei were involved in pseudogamy to develop endosperm after heading and pollination. When several aposporous sacs occurred in an ovule, only the sac near the micropyle developed endosperm while the other sacs did not. The frequency of twin-embryo seedlings geminated from mature seeds was low. Few sexual 8-nucleus embryo sacs as well as both sexual and aposporous sacs in the same ovule were found. It is suggested that the tetraploid *P. distichum* is considered to be a facultative apomict reproduced by apospory.

Key words: *Paspalum distichum* L.; Apomixis; Apospory

禾本科植物包括了全世界最重要的粮食作物,同时也包含了最多的无融合生殖的种类。通过无融合生殖将农作物F₁代的杂种优势固定下来,这对于固定禾本科作物杂种优势的利用具有巨大的潜力^[1,2]。近一二十年来,无融合生殖研究已成为生物科学的新热点。但从当前的研究进展来看,无融合生殖在禾本科作物杂种优势的实际利用上还存在巨大的

困难。最关键的问题是无融合生殖基因库的缺乏以及对禾本科无融合生殖的遗传学、分子生物学等方面的研究还不够深入。

已证实禾本科黍亚科多个属的一些类群的无融合生殖属于无孢子生殖多胚囊发育的类型,如狼尾草属^[3]、雀稗属^[4,5]、裂稗草属^[6]等。其无孢子生殖胚囊内的卵核不经受精即可自发分裂而形成原胚团,

收稿日期: 2002-09-02 接受日期: 2003-01-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(39780034); 中国科学院“九·五”重点项目(KZ952-S1-112)资助

但极核需和精核结合才能发育形成胚乳,这种受精作用称为假受精。在无孢子生殖多胚囊发育中,对其假受精的过程,尚缺乏系统的了解。是 1 个胚囊参与假受精还是多个胚囊参与假受精?是哪个部位的胚囊参与假受精?目前尚缺乏有关胚胎学方面的证据。在雀稗属内,已有几个种的无孢子生殖普遍存在多胚囊和多个原胚发育的现象^[4,5]。但是种子成熟后其二胚或多胚的频率均很低,其中原因如何,尚有待于探讨。

雀稗属(*Paspalum*)为禾本科黍亚科多年生或一年生草本植物。全世界有近 400 种,主要分布于热带和亚热带地区,其中许多种类为优良的牧草、草坪草和水土保持植物,是黍亚科最有经济价值的类群之一。雀稗属植物类群极其复杂,其中 80% 以上的类群为多倍体,染色体倍性从二倍体到十六倍体都有,其中以四倍体居多^[7]。自从 Burton^[8]首次报道雀稗属百喜草(*P. notatum*)的无融合生殖以来,不断地有雀稗属无融合生殖种类被发现。到目前为止,已有 40 多种雀稗属植物报道具无融合生殖特性,是目前禾本科中发现无融合生殖种类最多的属^[7,9]。其中多个种类已成为近期无融合生殖遗传学、分子生物学研究最热门的模式材料^[10-13]。

双穗雀稗(*Paspalum distichum*)为广泛分布于全世界温带、热带、亚热带地区的草本植物,在我国华南、西南、中南等地区均有分布。由于其繁殖力强、适应性广,曾作为优良牧草和水土保持植物推广栽培,但在局部地区成为水稻田的恶性杂草。双穗雀稗细胞型非常复杂,其染色体数目有 $2n=20$ 、 40 、 48 、 60 和 120 ,其中染色体数 $2n=40$ 和 60 的类群最为普遍^[16-19]。Bashaw 等^[20]曾罗列了一些禾本科无融合生殖的类群,其中有六倍体双穗雀稗进行无孢子生殖的报道,但缺乏有关无融合生殖胚胎学方面的证据。有报道四倍体双穗雀稗的一些类群的花粉母细胞减数分裂期间常出现异常多变的情形^[9],但也有报道四倍体的类群表现出正常的减数分裂^[21]。我们在前期细胞学工作基础上,确定所收集的双穗雀稗为四倍体类型^[22]。初步的观察双穗雀稗存在较严重的败育现象,通过种子结实繁殖率很低。有关四倍体双穗雀稗的生殖方式如何,国内外尚未见报道。本研究通过研究其胚囊、胚胎发育以及种子的萌发,以揭示其无融合生殖的特性,并对其无孢子生殖的多胚囊和多胚发育进行初步的研究。

1 材料和方法

双穗雀稗(*Paspalum distichum* L.)取自中国科学院华南植物研究所内一水塘边,通过扦插进行盆栽管理。在抽穗期间,取不同发育时期的花序用 FAA 液固定 2 d 并在 75%乙醇中保存。剥出不同发育时期的子房(非常幼嫩的材料仅去外颖壳),采用铁-苏木精染色。按常规石蜡切片法切片,切片厚度为 $8-10\mu\text{m}$ 。观察双穗雀稗胚珠内胚囊及胚胎的发育。种子成熟后,放在培养皿中浸种催芽,观察其发芽并统计二(多)胚苗的频率。

2 结果

2.1 胚囊发育

通过观察,胚珠内孢原细胞(图版 I:1)能够发育形成大孢子母细胞。而大孢子母细胞通过减数分裂能够发育形成四分体(图版 I:2)。之后出现以下 3 种情况:

大多数情况下,只观察到无融合生殖胚囊,胚珠内只产生无孢子生殖胚囊的频率达 86%。四分体细胞逐渐退化,与此同时,1-3 个特化的珠心细胞开始发育。特化珠心细胞较大,细胞核明显(图版 I:3)。随着它的进一步增大发育,在胚珠内形成融合的胚囊腔。胚囊腔内发育形成多个无孢子生殖胚囊。无孢子生殖胚囊经过一次有丝分裂,形成二核胚囊(图版 I:4)。无孢子生殖二核胚囊长梭形,中间有明显的液泡。随着二核胚囊核的进一步发育,靠近合点端的核往往能够分裂成为 2 核(图版 I:3),最终发育形成成熟的胚囊,通常情况下只包含 1 个卵核和 2 个极核。在成熟的无孢子生殖胚囊内,始终没有观察到助细胞或反足细胞的形成。由于胚珠内多个特化珠心细胞的竞争发育,通常是靠近珠孔端的特化珠心细胞优先发育为成熟胚囊,而靠近合点端的特化珠心细胞较晚发育甚至不发育(图版 I:5)。

少数情况下,只进行有性生殖,胚珠内只产生一个有性生殖胚囊的频率为 9%。四分体中靠近合点端的大孢子发育为功能大孢子,并直接发育成为有性生殖胚囊,由于没有特化珠心细胞的发育或无孢子生殖胚囊的存在,即胚珠内只有 1 个有性胚囊。成熟的有性生殖胚囊 8 核。胚囊内没有原胚的形成,只有通过双受精后才能分别形成合子胚和胚乳。

在极少数情况下,无融合生殖胚囊和有性生殖胚囊同时存在,其频率约为5%。四分体中靠近珠孔端的3个细胞退化,而最靠近合点端的1个细胞发育为功能大孢子,并逐渐发育成为有性胚囊。在功能大孢子发育成为有性生殖胚囊的同时,珠心内1-5个特化珠心细胞开始发育,逐渐形成无孢子生殖胚囊。此时,胚珠内有性生殖胚囊和无孢子生殖胚囊同时存在(图版I:7,8)。在这种胚珠中,早期发育的有性生殖胚囊和无孢子生殖胚囊并不容易区别。但是通常情况下,有性生殖胚囊先发育。我们观察到:当有性生殖胚囊已发育到多核胚囊时,而无孢子生殖胚囊仍然处于单核胚囊时期(图版I:7)。有性生殖胚囊发育成熟后,其胚囊为8核(包括1个卵核、2个助细胞、2个极核以及3个反足细胞),而无融合生殖胚囊只含1个卵核和2个极核。通过观察胚囊内的核数目,可以有效地区分有性生殖胚囊和无孢子生殖胚囊(图版I:8)。有性生殖胚囊内的卵核通过受精后才能发育成胚,而无孢子生殖胚囊内的卵核在抽穗前往往可直接发育成原胚。

2.2 原胚的发育

在抽穗前,双穗雀稗无孢子生殖胚囊内的卵核已自发分裂形成多核的原胚团。此时在无孢子生殖胚囊内,一方面,卵核自发分裂形成多核的原胚团(图版I:6);而另一方面,胚囊内的极核仍然存在。表明双穗雀稗的无孢子生殖胚囊内卵的发育属于自发的原胚发育,为典型的无融合生殖特性。在有多个无孢子生殖胚囊存在的情形下,通常是靠近珠孔端的胚囊内的卵核先发育形成原胚,而其它部位的则相对较迟;在有多个原胚的情形下,除存在于珠孔端外,也存在胚囊内其它部位如中部或合点端。所有原胚都是靠近胚囊内壁。

2.3 假受精

在授粉前,观察不到胚乳的发育。只有当授粉后12h或1d后,才观察到初生胚乳核的形成。表明双穗雀稗胚乳的发育需要极核和精核的结合才能完成。由于无孢子生殖胚囊内已开始了原胚的发育,它并不需要同精核结合就可发育为胚,因此双穗雀稗无孢子生殖胚囊内的受精作用属假受精。

观察结果表明:在多个无孢子生殖胚囊存在的情况下,只有靠近珠孔端的1个无孢子生殖胚囊进行假受精,并形成胚乳。而其它部位的胚囊内的极核仍然存在,它们并不进行假受精(图版I:9-11)并且不会自发的形成胚乳。由于胚乳的营养作用,通

常靠近珠孔端参与假受精的胚囊内的原胚能够正常发育。而对于其它部位的胚囊内的卵核或原胚团,因为得不到充足的营养,发育缓慢甚至退化,被假受精后发育的胚乳排挤到边缘部位。那些部位通常靠近合点端位置。通过切片观察,在种子发育几乎成熟后,种子内只有1个胚乳团的发育,目前尚未发现2个或多个胚乳团发育的例子。

假受精后,原胚团经过不断的分裂形成球形胚。在有多个原胚发育的情况下,一般是靠近珠孔端的原胚最先发育,最早成熟,而其它部位的原胚发育迟缓甚至不发育(图版I:12)。大部分情况下,只有靠近珠孔端的胚能够发育成熟,而其它部位的胚一般不能够发育成熟。

2.4 种子发芽观察

尽管无孢子生殖多胚囊和多个原胚团在胚珠中普遍存在,但成熟种子发芽所形成的二胚苗频率很低(3.7%),目前尚未发现多胚苗的情形。

3 讨论

在四倍体双穗雀稗的胚囊发育和胚胎发育过程中,观察到多个特化珠心细胞发育为多个无孢子生殖胚囊、原胚现象,可以肯定四倍体双穗雀稗属无孢子生殖类型的无融合生殖。此外还观察到少量的有性生殖胚囊的发育,因此四倍体双穗雀稗属于兼性无融合生殖体。

在禾本科众多的无融合生殖种类中,同一胚珠内同时存在有性生殖胚囊或无孢子生殖胚囊的现象并不普遍。有报道草地早熟禾(*Poa pratensis*)双多胚苗现象来源于存在有性生殖胚囊和特化珠心发育形成无孢子生殖胚囊的情形^[23-25]。在雀稗属内,也有报道同一胚珠内存在有性生殖胚囊和无孢子生殖胚囊的情况^[26,27],但缺乏胚胎学方面的直接证据。在大多数情况下,要么只进行有性生殖,其胚珠内只有1个胚囊,要么进行无融合生殖一胚珠内有一个或多个无融合生殖胚囊(主要是无孢子生殖胚囊)。通过我们对四倍体双穗雀稗兼性无孢子生殖的胚囊和胚胎发育的研究,我们不仅发现无孢子生殖胚囊和有性生殖胚囊同时存在于同一胚珠内,还观察到有性生殖胚囊和无孢子生殖胚囊发育特征,其有性生殖胚囊比无孢子生殖胚囊发育要早,这一结果对于揭示植物无融合生殖以及有性生殖的发育具有重要的意义。

在观察双穗雀稗的假受精过程中,我们观察到

多个无孢子生殖胚囊同时存在,但只是靠近珠孔端的 1 个胚囊发生了假受精,而其它的无孢子生殖胚囊则没有。假受精后,对于参与假受精的胚囊,由于胚乳的营养作用,其胚的发育得以延续。但是没有参与假受精的胚囊被发育扩张的胚乳排挤到胚珠的边缘,不能得到正常的发育,最终退化或胚发育不良。这一结果对于我们解释雀稗属多个种存在高频率的多个无孢子生殖胚囊或多个原胚的发育,却只产生低频率的二(多)胚苗现象^[4,5]是一个有力的证据。

参考文献

- [1] Asker S E, Jerling L. Apomixis in Plants [M]. London: CRC Press, 1992. 100-190.
- [2] Vielle-Calzada J P, Crane C F, Stelly D M. Apomixis: the asexual revolution [J]. Science, 1996, 274:1322-1323.
- [3] Wen X S (温沁山), Ye X L (叶秀麟), Chen Z L (陈泽濂), et al. Embryological studies on apomixis in *Pennisetum squamulatum* [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1998, 40 (7):598-604. (in Chinese)
- [4] Burton B L, Bennett H W. Cytology, method of reproduction, and fertility of brunswickgrass, *Paspalum nicorae* Parodi [J]. Crop Sci, 1970, 10:184-187.
- [5] Burson B L. Cytology of some apomictic *Paspalum* species [J]. Crop Sci, 1975, 15:229-232.
- [6] Carman J G, Hatch S L. Aposporous apomixis in *Sachizochyrium* (Poaceae: Andropogoneae) [J]. Crop Sci, 1982, 22:1252-1255.
- [7] Quarin C L. The nature of apomixis and its origin in panicoid grasses [J]. Apomixis Newslet, 1992, 5:8-15.
- [8] Burton G W. The method of reproduction in common Bahiagrass, *Paspalum notatum* [J]. J Amer Soc Agron, 1948, 40:443-452.
- [9] Ma G H (马国华), Zhao N X (赵南先), Huang X L (黄学林). Apomixis in the Gramineae [J]. J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 2001, 9 (1):83-92. (in Chinese)
- [10] Burton G W. Efforts to create apomictic diploids of *Paspalum notatum* var. *parodi* [J]. Apomixis Newslet, 1999, 11:35.
- [11] Quarin C L. Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum* [J]. Sex Plant Reprod, 1999, 11:331-335.
- [12] Caceres M E, Pupilli F, Quarin C L, et al. Feulgen-DNA densitometry of embryo sacs permits discrimination between sexual and apmictic plants in *Paspalum simplex* [J]. Euphitica, 1999, 110: 161-167.
- [13] Quarin C L, Espinoza F, Martinez E J, et al. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum* [J]. Sex Plant Reprod, 2001, 13:243-249.
- [14] Pupilli F, Caceres M E, Quarin C L, et al. Segregation analysis of RFLP markers reveals a tetrasomic inheritance in apomictic *Paspalum simplex* [J]. Genome, 1997, 40 (6):822-828.
- [15] Pupilli F. The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homoeologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12 [J]. Mol Breed, 2001, 8(1):53-61.
- [16] Burton G W. A cytological study of some species in the tribe Paniceae [J]. Amer J Bot, 1942, 29:355-359.
- [17] Gould F W, Soderstrom H. Chromosome numbers of some Ceylon grasses [J]. Can J Bot, 1974, 52:1075-1090.
- [18] Katayama T, Ikeda H. Cytogenetic studies on *Paspalum distichum* L. [J]. Cytologia, 1974, 40:759-764.
- [19] Queiros M. Contribucao para o conhecimento citotaxonomico das spermatophyta de Portugal. I. Gramineae [J]. Supl I Bol Soc Brot, 1973, 47(2):77-103.
- [20] Bashaw E C, Hovin A W, Holt E C. Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In: Norman M T J. Proc 11th International Grassland Congress [C]. Brisbane: University of Queensland Press, 1970. 245-248.
- [21] Quarin C L, Burson B L. Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species [J]. Cytologia, 1991, 56:223-228.
- [22] Ma G H (马国华), Zhao N X (赵南先), Hu X Y (胡晓颖), et al. Pollen morphology and poly-aperture in *Paspalum* [J]. J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 2001, 9(3):201-204. (in Chinese)
- [23] Nielsen E L. The origin of multiple macrogametophytes in *Poa pratensis* [J]. Bot Gaz, 1946, 108:41-45.
- [24] Smith D C, Nielsen E L, Ahlgren V. Variation in cytotypes of *Poa pratensis* [J]. Bot Gaz, 1946, 108:143-166.
- [25] Lei H T (雷和田), Zhao Y Y (赵云云), Wang J L (王景林), et al. Research on multiple embryo-sacs and polyembryony in *Poa pratensis* L. in Wu-Ling-Shan [J]. Chin Bull Bot (植物学通报), 2000, 17 (3) : 270-273. (in Chinese)
- [26] Normann G A, Quarin C L, Burson B L. Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species [J]. J Heredity, 1989, 80:24-28.
- [27] Quarin C L, Normann G A, Francisco E. Evidence for autopolyploidy in apomictic *Paspalum rufum* [J]. Hereditas, 1998, 129:119-124.

图版说明

图版 I

A: 孢原细胞; as: 无孢子生殖胚囊; e: 胚; ec: 卵细胞; en: 胚乳; nc: 珠心细胞; pn: 极核; pe: 原胚; ss: 有性生殖胚囊; t: 四分体; vc: 液泡

1. 孢原细胞; ×500
2. 四分体, 其中远离珠孔端的大孢子已退化; ×250
3. 四分体退化的同时, 出现几个特化的珠心细胞并发育为单核胚囊; ×250
4. 几个二核的无孢子生殖胚囊; ×250
5. 同一胚珠内 2 个成熟的无孢子生殖胚囊, 包括 1 个卵核和 2 个极核; ×250
6. 抽穗前原胚的发育; ×250
7. 同一胚珠内有性生殖胚囊处于多核时期, 而无孢子生殖胚囊则尚处于单核期; ×500
8. 成熟有性生殖胚囊和无孢子生殖胚囊同在一胚珠中; ×500
- 9-11. 连续切片—假受精, 示靠近珠孔端的无孢子生殖胚囊参

与假受精; 而另一个靠近合点端的胚囊则未参与假受精, 其原胚和极核仍然存在; $\times 250$

12. 二胚(正纵切). $\times 100$

Explanation of plates

Plate 1

A: Archeporoidal cell; as: Aposporous embryo sac; e: Embryo; ec: Egg cell; en: Endosperm; nc: Nucellar cell; pn: Polar nuclei; pe: Proembryo; ss: Sexual embryo sac; t: Tetrad; vc: Vacuole.

1. Archeporoidal cell; $\times 500$

2. Tetrad. One of the megaspores degenerated; $\times 250$

3. Soon after the functional megaspore degenerated, some specialized nucellar cells become active and enlarged to develop into single-nucleus

aposporous embryo sacs; $\times 250$

4. Several 2-nucleus aposporous embryo sacs in an ovule; $\times 250$

5. Two matured aposporous embryo sacs occur in an ovule which are characterized by one egg cell and two polar nuclei; $\times 250$

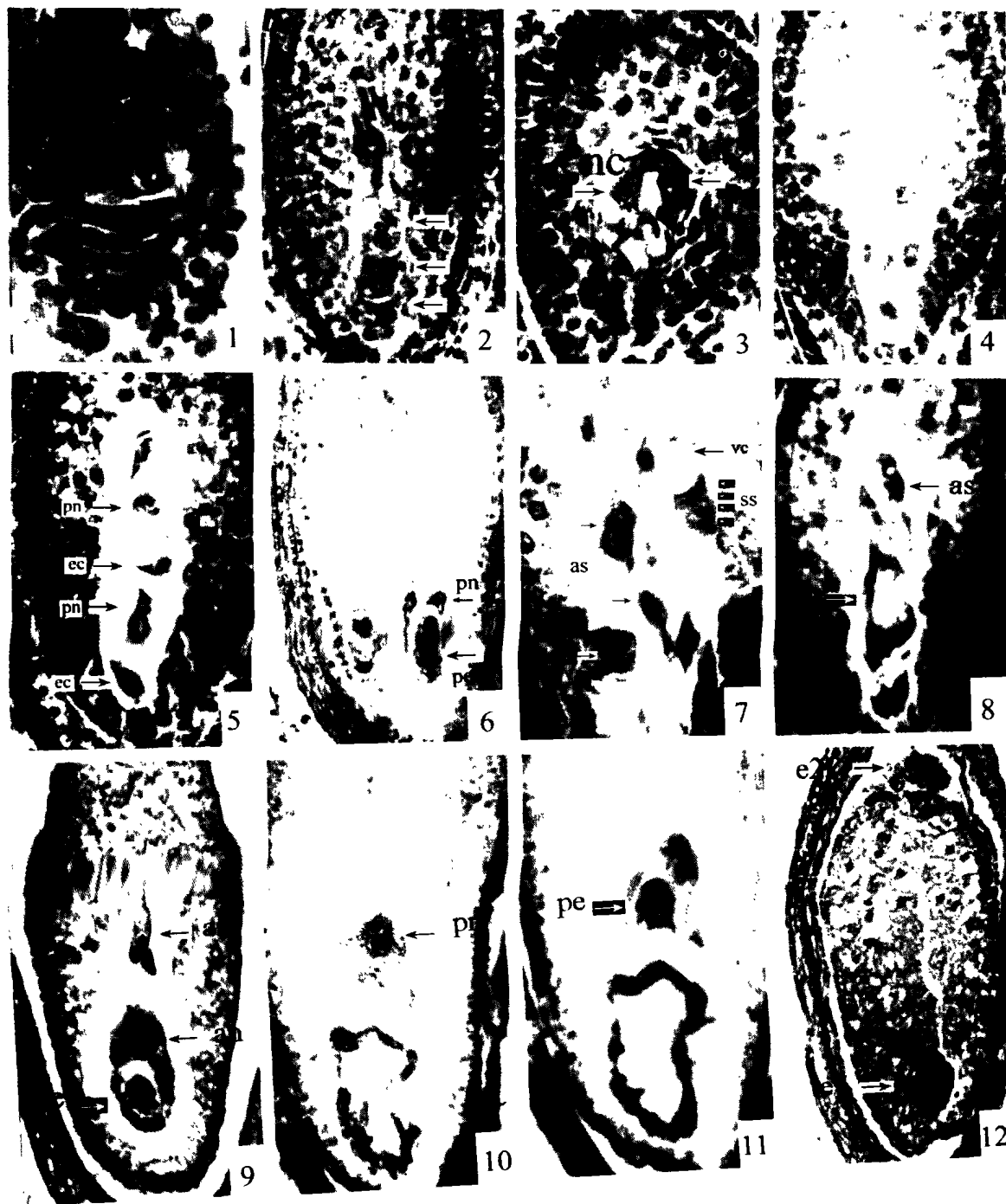
6. A proembryo before anthesis; $\times 250$

7. A sexual embryo sac and several single-nucleus aposporous sacs in an ovule; $\times 500$

8. Sexual and aposporous embryo sac in the same ovule; $\times 250$

9-11. Successive sections: Pseudogamy, showing one aposporous embryo sac which is nearest to micropyle is involved in pseudogamy to develop into endosperm, while another aposporous sac is not involved because the proembryo and polar nuclei are still visible; $\times 250$

12. Two embryos (longitudinal section). $\times 100$



See explanation at the end of text