

以色列二穗短柄草(*Brochypodium distachyon*) 种子的休眠与萌发特性

严俊^{1a,2}, 程剑平^{1b,3*}, 王莹²,

GUTTERMAN Yitzchak², NEVO Eviatar³

(1. 贵州大学, a. 生命科学学院; b. 农学院, 贵阳 550025; 2. 本-古里安大学艾伯特·卡兹国际沙漠学院, 恩德博克 84990, 以色列; 3. 海法大学进化研究所, 海法 31905, 以色列)

摘要:对以色列 3 个群体的二穗短柄草(*Brochypodium distachyon*)种子的休眠与萌发进行了研究。结果表明:以色列二穗短柄草种子都具有休眠的习性,且不属于外源休眠(种壳休眠)类型;储藏温度和时间等因素对不同群体的二穗短柄草种子的休眠和萌发有着极显著的影响,高温(40℃)储藏可以加快种子后熟,打破种子的休眠;3 个群体的二穗短柄草种子休眠深度不同,依次是:Sede Boqer > Yatir > Mt. Carmel;且休眠深度与群体生长地年平均降雨量呈负相关关系。二穗短柄草的这些休眠和萌发特性可能是其长期与环境相互作用,在自然选择压力下进化形成的存活机制。

关键词:以色列;二穗短柄草;种子;休眠;萌发

中图分类号:Q945.35

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2008)02-0104-05

Dormancy and Germination of *Brochypodium distachyon* Caryopses Derived from Israel

YAN Jun^{1a,2}, CHENG Jian-ping^{1b,3*}, WANG Ying², GUTTERMAN Yitzchak², NEVO Eviatar³

(1a. College of Life Sciences; 1b. College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Albert Katz International School for Desert Studies, Ben-Gurion University, Sede Boker 84990, Israel; 3. Institute of Evolution, University of Haifa, Haifa 31905, Israel)

Abstract: The dormancy and germination of *Brochypodium distachyon* caryopses sampled from three populations in Israel were investigated. The results showed that caryopses of *B. distachyon* developed dormancy which was found not to be the type of exogenous dormancy. The factors, such as temperature and duration of dry storage, etc. had significant effects on caryopsis germination of *B. distachyon*. The afterripening process could accelerate and caryopses dormancy could break when stored at high temperature (40℃), and the order of dormancy depth among three populations was Sede Boqer > Yatir > Mt. Carmel. Furthermore, the dormancy depth was found to be correlated negatively with the mean annual rainfall at three local sites. The present results demonstrated that evolutionary background has a strong effect on the intensity of caryopses dormancy of this species, and *B. distachyon* populations have evolved adaptive mechanisms by regulating the time of germination in Israel.

Key words: Israel; *Brochypodium distachyon*; Caryopses; Dormancy; Germination

二穗短柄草(*Brochypodium distachyon*)主要分布于欧洲、地中海地区及土耳其、巴基斯坦、印度和我国的西藏米林地区^[1],为1 a生禾本科(Gramineae)自花授粉植物。二穗短柄草染色体数

目为 $2n = 2x = 10$,其基因组比水稻(*Oryza sativa* L.) (430 Mbp)小,仅为172 Mbp,是禾谷类植物中最小的,与双子叶模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)近似,与水稻相比,它与温带禾谷类植物和牧草的

亲缘关系更接近^[2],相对于所有的禾谷类来说它拥有最小的5S rDNA 间隔区,而且它只含有不到15%的高度重复的DNA序列^[3]。二穗短柄草植株矮小,有的低至20 cm;生育期也较短,可少于15周;生长条件要求简单,种子多且成熟时不掉粒;有利于高通量遗传突变体筛选,幼胚可进行高容量体细胞再生,且再生植株白化程度低、可育等^[2,4]。因此,二穗短柄草被认为是理想的研究温带禾谷类植物和牧草的模式植物^[2]。近年来,二穗短柄草已被用于植物功能基因组学、比较基因组学和植物分子生物学等研究领域^[5-7],而这些研究所用二穗短柄草大多取自欧洲、土耳其等地。迄今,有关以色列二穗短柄草的研究鲜见报道。在以色列,从湿润的北部山地到半湿润地中海林灌草丛地,再到极端干旱的南部沙漠均有二穗短柄草的分布,并且其与现代栽培大麦(*Hordeum vulgare*)、小麦(*Triticum aestivum*)的祖先即野生二棱大麦(*H. spontaneum*)、野生二粒小麦(*Triticum dicoccoides*)有相同或相近的分布生境。本文对采自以色列3个地区的二穗短柄草种子的休眠与萌发特性进行了研究,以探讨其作为模式植物,研究温带禾谷类植物和牧草种子的休眠和萌发特征、遗传学机理,以及为进一步开展二穗短柄草与麦类作物的比较基因组学及重要功能基因研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 种子采集

研究用二穗短柄草种子(带稃的颖果)于2004年4~5月,在其自然成熟时采自以色列南部的Sede Boqer(位点1),Yatir(2)和北部的Mt. Carmel(3),其地理位置见图1。采收后的种子先装入棕色牛皮纸袋里,后置于室温下保存(约为20℃),在2004年6月1日将种子分成3袋分别贮藏于5℃,25℃和40℃条件下,并于贮藏前用2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride, TTC)测试种子活力。

1.2 萌发实验

将分别于不同温度下贮藏了0、14、28、42、56、70、84和98 d的二穗短柄草种子置于直径为50 mm垫有双层滤纸的培养皿中,加入1.5 ml蒸馏水,在20℃培养箱中避光培养14 d,于第4、7、10和14天检查记录种子萌发数,计算萌发率,种子的萌发以胚根的出现为标志,每个处理用种子25粒,设

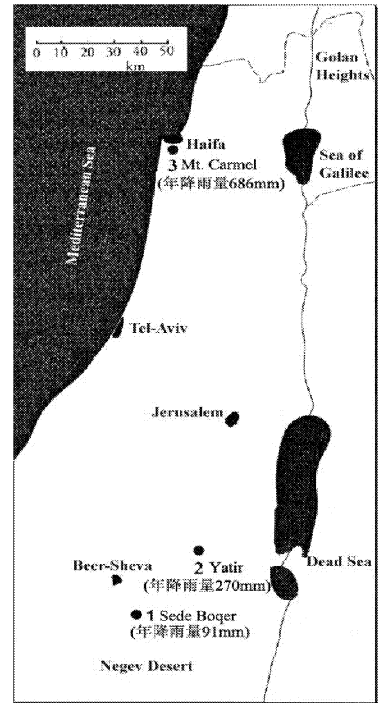


图1 以色列二穗短柄草3个群体的地理分布
Fig. 1 Geographic distribution of three *B. distachyon* populations in Israel

4个重复。同时,为了确定种子是否属于外源休眠(种壳休眠),对上述第0天的萌发实验,同时增加用除去稃壳后的草种子进行萌发作对比实验,除此之外所有实验均用带稃的颖果。

1.3 统计分析

使用软件 STATISTICA 进行 ANOVA 和斯皮尔曼秩(Spearman Rank Order)分析。

2 结果和分析

2.1 二穗短柄草群体种子的休眠特性

用TTC测试二穗短柄草群体种子活力,结果表明:其种子活力均达100%。3个群体种子在20℃培养箱中遮光培养14 d,均不萌发,说明这些种子都具有休眠特性,而且无论有无稃壳都不萌发,说明其不属于外源休眠(种壳休眠)(表1)。

2.2 储藏温度与时间对种子萌发的影响

对种子萌发率的多因素方差分析表明:不同群体、种子储藏温度和时间以及这些因素的相互作用都是极显著的($P=0.0000$)(表2)。

种子储藏于40℃条件下,Mt. Carmel, Yatir 和 Sede Boqer 3个群体种子培养4 d的初始发芽天数分别是28、42和56 d,培养14 d的初始发芽天数分

别是 14, 28 和 28 d; 而种子储藏在 25℃ 和 5℃, 3 个群体培养 4 d 的初始发芽天数都在 70 d 或 70 d 以上, Sede Boquer 群体储藏在 5℃ 的种子甚至到 98 d 也未见发芽, 即使培养 14 d, 储藏在这两个温度下的 3 个群体种子的初始发芽天数也要 42 d (表 1)。可见, 高温(40℃)储藏加快了种子后熟, 可以打破二穗短柄草种子的休眠。

2.3 种子的休眠深度

种子休眠深度通常用萌发的初始时间和萌发率表示, 初始时间越长, 萌发率越低, 即休眠程度越深^[8]。由表 1 可知, Mt. Carmel 群体储藏在 40℃, 25℃ 和 5℃ 的种子培养 14 d 的初始发芽时间分别是 14, 42 和 42 d, Yatir 和 Sede Boquer 群体均分别是

28, 42 和 42 d, 这似乎差异不大, 但培养 4, 7 和 10 d 的种子发芽的初始时间, Mt. Carmel 群体明显少于其他两个群体(表 1)。Mt. Carmel, Yatir 和 Sede Boquer 群体的种子在 40℃ 储藏 28 d, 培养 14 d 的萌发率分别是 90%、55% 和 10%, 在 25℃ 储藏 42 d 的萌发率分别是 81%、21% 和 6%, 在 5℃ 储藏 42 d 的萌发率分别是 73%、12% 和 10%, 其萌发率的差异非常明显。培养 4, 7 和 10 d 的种子萌发率同样是 Mt. Carmel 群体明显高于 Yatir 和 Sede Boquer 群体, 且 Yatir 高于 Sede Boquer (表 1)。由此可见, 3 个群体的种子休眠深度的顺序是: Sede Boquer > Yatir > Mt. Carmel。方差分析结果(表 2)也显示萌发率在群体上的差异是极显著的($P=0.0000$)。

表 1 不同贮藏温度和培养时间对二穗短柄草三个群体种子萌发率的影响

Table 1 Effects of storage temperatures and culture time on caryopsis germination of *B. distachyon* populations

群体 Population	培养天数 Days of culture	贮藏温度(℃) Storage temperature	贮藏时间 Days of storage							
			0	14	28	42	56	70	84	98
Sede Boque	4	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Yatir	4	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.00 ± 1.00	0.00 ± 0.00
Mt. Carmel	4	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	5.00 ± 1.91	6.00 ± 1.15	31.00 ± 3.42	9.00 ± 2.52
Sede Boque	4	25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.00 ± 1.00	20.00 ± 3.65
Yatir	4	25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	64.00 ± 4.32	66.00 ± 5.29
Mt. Carmel	4	25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	33.00 ± 1.00	92.00 ± 1.63	92.00 ± 1.63
Sede Boque	4	40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.00 ± 1.00	2.00 ± 1.15	77.00 ± 5.97	96.00 ± 2.31
Yatir	4	40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.00 ± 4.00	66.00 ± 6.63	54.00 ± 2.58	93.00 ± 3.00	89.00 ± 3.00
Mt. Carmel	4	40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	23.00 ± 4.43	73.00 ± 2.52	94.00 ± 3.83	90.00 ± 1.15	92.00 ± 1.63	92.00 ± 1.63
Sede Boque	7	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.00 ± 1.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Yatir	7	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.00 ± 1.00	8.00 ± 1.63
Mt. Carmel	7	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	36.00 ± 4.32	39.00 ± 3.00	58.00 ± 6.22	75.00 ± 5.51
Sede Boque	7	25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.00 ± 1.00	73.00 ± 7.55
Yatir	7	25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.00 ± 2.00	17.00 ± 3.42	79.00 ± 3.00	84.00 ± 4.00
Mt. Carmel	7	25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.00 ± 1.00	57.00 ± 5.00	88.00 ± 4.62	95.00 ± 1.91	93.00 ± 1.63
Sede Boque	7	40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.00 ± 1.91	17.00 ± 2.52	21.00 ± 3.42	85.00 ± 4.73	98.00 ± 2.00
Yatir	7	40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	30.00 ± 7.39	82.00 ± 2.58	77.00 ± 6.19	93.00 ± 3.00	99.00 ± 1.00
Mt. Carmel	7	40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	52.00 ± 2.83	87.00 ± 3.00	94.00 ± 3.83	92.00 ± 1.63	93.00 ± 1.00	93.00 ± 1.00
Sede Boque	10	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.00 ± 1.63	5.00 ± 1.00	7.00 ± 2.52	3.00 ± 1.00
Yatir	10	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.00 ± 1.91	6.00 ± 2.00	11.00 ± 2.52	4.00 ± 1.63	12.00 ± 1.63
Mt. Carmel	10	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	51.00 ± 4.73	77.00 ± 4.43	71.00 ± 5.97	83.00 ± 3.42	83.00 ± 4.12
Sede Boque	10	25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	7.00 ± 2.52	1.00 ± 1.00	31.00 ± 4.43	77.00 ± 5.51
Yatir	10	25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	20.00 ± 6.73	23.00 ± 1.91	46.00 ± 4.16	89.00 ± 2.52	92.00 ± 1.63
Mt. Carmel	10	25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	77.00 ± 6.61	76.00 ± 4.00	93.00 ± 3.00	95.00 ± 1.91	93.00 ± 1.00
Sede Boque	10	40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	37.00 ± 7.55	41.00 ± 5.74	46.00 ± 2.00	91.00 ± 3.79	98.00 ± 2.00
Yatir	10	40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	35.00 ± 3.42	56.00 ± 6.93	85.00 ± 2.52	86.00 ± 4.76	95.00 ± 3.00	100.0 ± 0.00

续表1(Continued)

群体 Population	培养天数 Days of culture	贮藏温度(°C) Storage temperature	贮藏时间 Days of storage							
			0	14	28	42	56	70	84	98
Mt. Carmel	10	40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	86.00 ± 2.58	87.00 ± 3.00	94.00 ± 3.83	92.00 ± 1.63	93.00 ± 1.00	93.00 ± 1.00
Sede Boque	14	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	10.00 ± 2.58	11.00 ± 2.52	12.00 ± 4.32	11.00 ± 3.00	37.00 ± 4.43
Yatir	14	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	12.00 ± 2.31	9.00 ± 2.52	64.00 ± 3.27	37.00 ± 2.52	35.00 ± 1.91
Mt. Carmel	14	5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	73.00 ± 2.52	82.00 ± 4.16	86.00 ± 4.76	95.00 ± 1.00	88.00 ± 4.90
Sede Boque	14	25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.00 ± 1.15	31.00 ± 3.42	57.00 ± 1.91	96.00 ± 0.00	91.00 ± 1.00
Yatir	14	25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	21.00 ± 5.26	28.00 ± 2.31	86.00 ± 2.00	90.00 ± 2.00	93.00 ± 1.91
Mt. Carmel	14	25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	82.00 ± 4.76	80.00 ± 4.00	93.00 ± 3.00	96.00 ± 1.63	93.00 ± 1.00
Sede Boque	14	40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	10.00 ± 4.76	64.00 ± 8.64	59.00 ± 5.00	85.00 ± 3.00	91.00 ± 3.79	98.00 ± 2.00
Yatir	14	40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	55.00 ± 4.12	66.00 ± 5.29	87.00 ± 1.91	94.00 ± 2.00	95.00 ± 3.00	100.0 ± 0.00
Mt. Carmel	14	40	0.00 ± 0.00	11.00 ± 1.91	90.00 ± 2.00	87.00 ± 3.00	94.00 ± 3.83	94.00 ± 2.00	93.00 ± 1.00	93.00 ± 1.00

表2 不同因素对种子萌发率的方差分析

Table 2 ANOVA analysis for caryopses germination

因变量及相互作用 Main factors and their interactions	Df	MS	F	P
[1] 群体 Population	2	86592	3413.13	0.000000
[2] 贮藏温度 Storage temperature	2	127965	5043.88	0.000000
[3] 贮藏时间 Storage days	7	103394	4075.37	0.000000
[4] 培养时间 Culture days	3	33796	1332.12	0.000000
1 * 2	4	1931	76.11	0.000000
1 * 3	14	5848	230.49	0.000000
2 * 3	14	10234	403.39	0.000000
1 * 4	6	1099	43.33	0.000000
2 * 4	6	210	8.28	0.000000
3 * 4	21	2572	101.36	0.000000
1 * 2 * 3	28	2787	109.85	0.000000
1 * 2 * 4	12	1528	60.24	0.000000
1 * 3 * 4	42	414	16.30	0.000000
2 * 3 * 4	42	634	24.98	0.000000
1 * 2 * 3 * 4	84	789	31.11	0.000000

2.4 种子休眠深度与年平均降雨量的关系

3个以色列二穗短柄草群体起源地的年平均降雨量顺序是: Sede Boqer (91 mm) < Yatir (270 mm) < Mt. Carmel (686 mm), 这正好与种子休眠深度的顺序相反。用在40°C储藏28 d和在25°C和5°C储藏42 d的种子培养14 d的萌发率作为休眠深度指标^[9]与起源地的年平均降雨量作斯皮尔曼秩相关分析,结果表明它们具有极显著负相关关系($r = -0.9527, P = 0.0000$),即二穗短柄草群体起源地降雨量越少,种子的休眠程度越深。

3 讨论

植物种子的休眠习性和后熟作用是广为人知的。在以色列,大量沙漠植物、牧草和禾谷类植物的新鲜种子都要经过一定时间的后熟,才能破除休眠萌发,并且处在高温条件下的种子会更快失去休眠^[10],二穗短柄草也不例外,这体现了它们适应环境的存活策略。因为在以色列,降雨集中在冬季,而且时间很短,尤其是在位于南部的 Sede Boqer 沙漠地区,平均降水量非常少,且年际间存在着很大的差异(30 ~ 168 mm)。紧接雨季之后的是一个漫

长、高温和干燥的夏季,为了避免初夏的降雨,导致种子发芽而在以后漫长的夏季没有机会存活下来,适应性进化发育形成了休眠习性。当在经历了整个夏天的后熟过程后打破休眠,还是没有机会萌发,它们就会进入二次休眠^[10],而且有的植物种子发芽后,遇到长时间干旱致使幼芽和种子干燥,如再遇雨水又可以发出新芽而长成成熟植株^[11]。从我们的研究中(表 1)也显现了二次休眠迹象,当萌发率升到最高并保持一段时间后,就开始下降。这些存活机制是植物与环境长期相互作用、自然选择形成的,正是因为如此,才能确保它们在不可预知的风险中保存自己,繁衍生息。我们的研究表明,源自不同地区的二穗短柄草种子的休眠深度不同,且与群体起源地年平均降雨量呈负相关关系。大量的研究显示,相同植物的种子存在休眠萌发的差异,而这些差异往往取决于种子起源地的一些生态地理因素,如:经度、纬度、海拔、土壤类型及营养、温热条件、水分状况、植被覆盖程度与种类及其干扰强度等,也与种子当年发育成熟的诸多条件有关^[8,10]。二穗短柄草与现代栽培大麦、小麦的祖先即野生二棱大麦、野生二粒小麦一样,广泛分布于以色列不同的生境,二穗短柄草在适应性进化过程中形成的种子休眠与萌发特性,无疑将有助于揭示野生大麦、小麦等的种子生理生态学特征和遗传学机理。

致谢 本研究的种子采集和实验分析得到陈国雄、杨飞、周梅阳、王亚飞、杨书逸和 Shlomo Feingold 等的帮助,特此致谢!

参考文献

[1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae

Sinicae Edita (中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 9(2) [M]. Beijing: Science Press, 2002: 382. (in Chinese)

- [2] Draper J, Mur L A J, Jenkins G, et al. *Brachypodium distachyon*: A new model system for functional genomics in grasses [J]. Plant Physiol, 2001, 127: 1539–1555.
- [3] Catalan P, Shi Y, Armstrong L, et al. Molecular phylogeny of the grass genus *Brachypodium* (L.) Beauv based on RFLP and RAPD analysis [J]. Bot J Linn Soc, 1995, 117: 263–280.
- [4] Kellogg E A. Evolutionary history of the grasses [J]. Plant Physiol, 2001, 125: 1198–1205.
- [5] Christiansen P, Andersen C H, Didion T, et al. A rapid and efficient transformation protocol for the grass *Brachypodium distachyon* [J]. Plant Cell Rep, 2005, 23: 751–758.
- [6] Hasterok R, Draper J, Jenkins G. Laying the cytotoxic foundations of a new model grass, *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv [J]. Chromosome Res, 2004, 12: 397–403.
- [7] Hasterok R, Marasek A, Donnison I S, et al. Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using BAC landing with fluorescent *in situ* hybridization [J]. Genet Soc Amer, 2006, 173: 349–362.
- [8] Baskin C C, Baskin J M. Seeds — Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination [M]. San Diego: Academic Press, 1998: 185.
- [9] Gao W, Clancy J A, Han F, et al. Molecular dissection of a dormancy *QTL* region near the chromosome 7 (5H) L telomere in barley [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 552–559.
- [10] Gutterman Y. Seed Germination in Desert Plants. Adaptations of Desert Organisms [M]. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1993: 253–254.
- [11] Zhang F C, Gutterman Y. The trade-off between breaking of dormancy of caryopses and revival ability of young seedlings of wild barley (*Hordeum spontaneum*) [J]. Can J Plant Sci, 2003, 4: 375–382.