

甘肃野生草地早熟禾种质资源无融合生殖鉴定分析

刘 燕,张金青,牛奎举,董文科,马晖玲,李玉珠

(甘肃农业大学 草业学院/草业生态系统教育部重点实验室/甘肃省草业工程实验室/中-美草地畜牧业可持续发展研究中心,甘肃 兰州 730070)

摘要:以甘肃省 8 个地区的野生草地早熟禾和商用品种‘午夜 2 号’为试验材料,通过纸上萌发法统计多胚苗率,利用石蜡切片技术统计无融合生殖率,并探究两者之间的相关性。结果表明:参试草地早熟禾材料的多胚苗率为 0~15.29%,其中最高的是陇南,最低的是甘南,二者差异显著;无融合生殖率最高的是陇南,可达到 71.04%,最低的是甘南,仅为 11.2%,其他种质的无融合生殖率差距比较小,为 32%~58%;相关性分析表明,多胚苗率与无融合生殖率存在显著相关性($R^2=0.96$),该研究结果可为草地早熟禾无融合生殖材料筛选、种植栽培及其遗传育种提供一定的技术参考。

关键词:草地早熟禾;石蜡切片技术;无融合生殖率;多胚苗率

中图分类号:S688.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2020)03-0084-06

DOI: 10.13817/j.cnki.cyycp.2020.03.013

无融合生殖指不经雌雄配子结合而产生胚和种子的生殖方式^[1],与有性生殖、无性生殖并存,并介于两者之间^[2],它与无性生殖的区别在于其发生在性器官中,与有性生殖的不同之处在于不经过性融合过程,其特点是产生的后代是母本基因型的复制^[3]。无融合生殖分为专性和兼性两种,专性无融合生殖是指胚是由一个未经减数分裂的二倍体细胞或经减数分裂的单倍体细胞发育而来,其胚的形成全都是自发进行,无需受精而产生与母本完全相同的后代,理论上只具备无融合生殖能力。但是 Nogler^[4]发现即使是专性无融合生殖体的后代,也可偶尔发现具备有性生殖的后代;兼性无融合生殖指有些植株同时具备有性和无融合生殖能力,后代遗传一部分是纯合的母本型,另一部分则产

生了一个或多个不同性状的类型^[5-7]。

一粒种子同时萌发出两株或两株以上幼苗的现象称为多胚^[8],二倍体无融合生殖主要表现形式之一就是多胚现象^[9]。前人研究结果显示^[10-13],一些被子植物多胚现象与无融合生殖现象具有一定的相关性,无融合生殖具双胚、双苗或多苗等特性,但有些双苗或多苗可能不一定全都是无融合生殖,因此在发掘新的具有无融合生殖倾向的植物时,除了考察种子的多胚外,进一步研究大孢子的发生、胚囊的发育以及胚原始细胞的来源等问题对阐明其无融合生殖方式非常必要^[11]。虽然双苗或多苗不一定是无融合生殖,但由于这种现象与无融合生殖密切相关,且易鉴别,故可作为线索,以便从大量栽培品种中筛选无融合生殖的突变体^[14]。

草地早熟禾(*Poa pratensis*)属禾本科、早熟禾属多年生草本植物^[15],是草原与草甸植被的重要组成部分^[16],被广泛应用于各种不同类型的草坪建植中^[17]。国外较早就开始对草地早熟禾无融合生殖进行研究,早在 1933 年, Muntzing^[18]就已经报道了草地早熟禾中存在无融合生殖的现象,并发现早熟禾生殖体系是兼性无融合生殖。无孢子生殖是草地早熟禾最普遍的一种无融合生殖方式^[2],由于无融合生殖没有父本的

收稿日期:2019-07-02; **修回日期:**2019-12-17

基金项目:国家自然科学基金项目“甘肃野生草地早熟禾无融合生殖胚发生的分子遗传机理研究”(31760699)

作者简介:刘燕(1992-),女,山东临沂人,在读硕士生。

E-mail:568486354@qq.com

马晖玲为通讯作者。

E-mail:mahl@gsau.edu.cn

参与,其后代是母本遗传物质完整克隆,这给作物的育种以及种子的生产带来极大的想象空间和巨大的潜在价值,其在作物育种和种子生产上的优势显而易见^[19]。其生态型极丰富,自交率很高,能固定杂种优势,用于作物育种可缩短时间,降低成本,而这些因素的交互作用导致早熟禾之间的遗传关系错综复杂,是植物育种中的研究热点^[11]。草地早熟禾具有的多胚和萌发多苗特性,100年来仍是研究无融合生殖的模式植物^[20]。

本文对甘肃野生草地早熟禾种质资源无融合生殖方式进行鉴定分析,以期筛选草地早熟禾无融合生殖材料提供更为简捷的方法。

1 材料和方法

1.1 试验材料

8份野生草地早熟禾材料,分别采集于甘肃清水、陇西、肃南、甘南、定西、秦州、兰州、陇南等地;商用品种‘午夜2号’。

1.2 试验设计与方法

1.2.1 多胚苗率的统计 将各种质分别取2 000~2 200粒的种子(70%酒精浸泡1 min,NaClO溶液浸泡15 min,用灭菌水冲洗6~8次,自然风干后备用)。采用纸床萌发法,直径为9 cm的培养皿,铺设2层中速滤纸作为发芽床。每皿50粒种子,每种质40皿。光照培养箱变温条件下纸上萌发法测定种子的发芽率,光子量照度:400 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$;温度:光照(25 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 、16 h,黑暗(20 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 、8 h;相对湿度:60%~70%。按规定日期统计出苗率及单苗和多苗所占比率。

发芽率(%)=(发芽总数/供试种子数) \times 100%

单苗率(%)=(单苗总数/发芽总数) \times 100%

多苗率(%)=(多苗总数/发芽总数) \times 100%

1.2.2 无融合生殖的鉴定与统计 将各种质种子经过人工清选、自然干燥后,于2017年4月20日单株定植在甘肃农业大学草坪草种质资源圃内,后期精心灌溉、施肥,并定期多次间苗,保证草地早熟禾单株生长。

2018年4月18日草地早熟禾抽穗后,采集不同时期(抽穗期至乳熟期)的小穗,采样时长45 d,共采集20次。采集的新鲜小穗立刻固定于70%乙醇浓度的FAA混合固定液中。用注射器真空抽气,保证小穗沉淀于瓶底。

石蜡切片参考田晨霞^[21]试验方法,稍作改进。试验时将材料的每朵小花分离以保证子房独立,因材料的子房非常小,多次试验发现带有稃片不影响切片效果,所以在做石蜡切片时保留稃片。采用多浓度酒精梯度摇动脱水,二甲苯逐级过渡透明,熔点为52~54 $^{\circ}\text{C}$ 的石蜡浸蜡,经包埋、修块、切片、展片、烤片,然后进行脱蜡、复水、伊红和埃利希氏(Ehrlich's)苏木精双重染色后,中性树胶封片,自然风干制成永久切片,正倒置一体显微镜观察子房结构,鉴定其生殖方式,统计无融合生殖率。

无融合生殖鉴定条件:1.珠心细胞明显增大,细胞核明显且细胞质浓;2.胚囊数目多于1个;3.1个胚囊时看成熟胚囊的核数,四核月见草型为无融合生殖。

无融合生殖率(%)=(无融合生殖数/观察数) \times 100%

有性生殖率(%)=(有性生殖数/观察数) \times 100%

1.3 图片处理

Revolve RVL-100-G正倒置一体显微镜观察并拍照。

1.4 统计与分析

采用SPSS 19.0进行数据统计和分析,用Excel 2013作图。

2 结果与分析

2.1 甘肃野生草地早熟禾多胚苗率

2.1.1 甘肃野生草地早熟禾发芽率 野生草地早熟禾种质材料的发芽率要远低于商用品种‘午夜2号’,其中最低的是定西,发芽率仅为14.6%,与其他种质差异显著($P < 0.05$);最高的为陇南,发芽率为79.8%,除了与‘午夜2号’差异不显著外,与其他均差异显著($P < 0.05$);其余甘南、肃南、秦州、清水、兰州、陇西的发芽率分别为66%、54.4%、76.8%、51%、65.6%、67.8%,与‘午夜2号’差异显著($P < 0.05$)(图1)。

2.1.2 甘肃野生早熟禾单胚苗的发生频率 各野生草地早熟禾材料的单胚苗率是84.71%~100%,最高的是甘南,与其他材料差异均显著($P < 0.05$);其次分别为‘午夜2号’、清水、肃南、秦州、兰州、定西、陇西、陇南,对应的单胚苗率分别92.24%、91.76%、90.44%、88.28%、87.8%、87.67%、87.61%、84.71%,单胚苗率最低的陇南与兰州、定西差异不显著,与另外6份材料差异显著($P < 0.05$)(图2)。

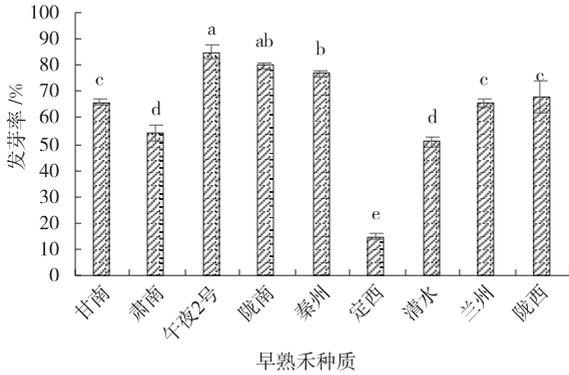


图 1 甘肃草地早熟禾种质材料的发芽率

Fig. 1 Statistics of the germination rates of tested Kentucky bluegrass germplasms

注:不同字母表示不同品种间的差异显著($P < 0.05$),

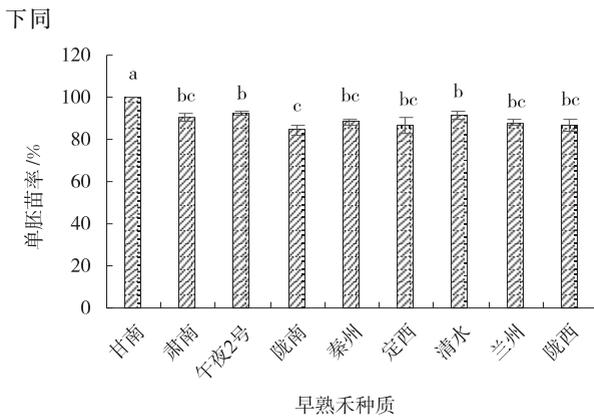


图 2 甘肃草地早熟禾种质材料的单胚苗率

Fig. 2 Statistics of the single-embryo rates of tested

Kentucky bluegrass germplasms

2.1.3 甘肃野生早熟禾多胚苗的发生频率 野生草地早熟禾种质材料的多胚苗率分别是 12.33% (定西)、11.72% (秦州)、10.98% (兰州)、9.56% (肃南)、8.24% (清水)、7.76% (‘午夜 2 号’)、7.3% (巴润)、11.5% (陇西), 其中最低的是甘南, 多胚苗率为 0, 差异与其他种质显著 ($P < 0.05$), 最高的为陇南, 多胚苗率为 15.29%, 与‘午夜 2 号’、清水、甘南差异显著 ($P < 0.05$), 与其他的材料差异不显著 (图 3)。

2.2 无融合生殖的鉴定与统计

2.2.1 无融合生殖胚胎的鉴定 野生草地早熟禾的无融合生殖类型绝大多数是无孢子生殖, 胚囊由特化的珠心细胞发育而来, 珠心组织中 1 个或 1 个以上体细胞发育成比周围的珠心细胞体积大、细胞核明显、细胞质浓的细胞, 这些膨大的珠心细胞一般纵向或平行排列于珠心, 并开始有丝分裂, A-1 和 A-3, 特化的珠心细胞明显增大, 细胞核明显, 细胞质浓; A-2 随着珠

孔端的 3 个大孢子相继退化, 合点端的 1 个大孢子发育成功能大孢子, 为有性生殖发育。B-1 和 B-3 分别为双胚囊和三胚囊, 数目多余 1 个, 即为无融合生殖; B-2 退化的胚囊沿纵轴方向开始延长, 功能大孢子母细胞体积逐渐增大, 发育为功能大孢子, 即单核胚囊, 为典型的有性生殖发育。有性生殖成熟胚囊形成了七细胞八核: 1 个卵细胞、2 助细胞、3 个反足细胞、2 个极核 (C-2), 而无融合生殖则形成成熟的四核月见草型胚囊 (C-1 和 C-3) (图 4)。

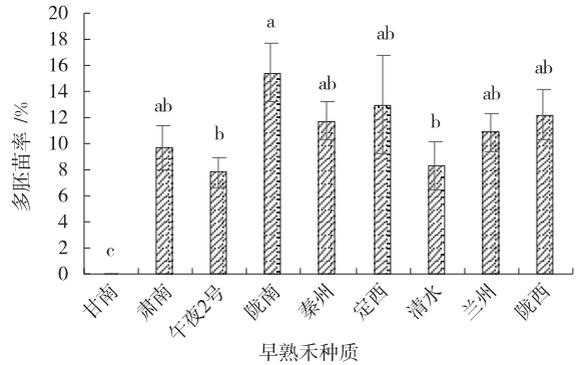


图 3 甘肃草地早熟禾种质材料的多胚苗率

Fig. 3 Statistics of the poly-embryo rates of tested

Kentucky bluegrass germplasms

2.2.2 无融合生殖率的统计 有性生殖率最高的是甘南, 可高达 88.8%, 最低的是陇南, 为 28.96%, 其次是定西, 为 31.42%; 无融合生殖率最高的是陇南, 可达到 71.04%, 其次定西, 无融合生殖率为 68.58%; 而最低的是甘南, 仅为 11.2%, 相对比较低的‘午夜 2 号’的无融合生殖频率为 32.47%, 其他种质的无融合生殖率差距比较小, 在 42%~58% 左右, 它们的无融合生殖率分别为肃南 47.8%、秦州 58.6%、清水 42.02%、兰州 51%、陇西 57.5%。

表 1 甘肃野生草地早熟禾无融合生殖率

Table 1 Statistics of apomictic frequency rates of tested

Kentucky bluegrass germplasms

| 种质 | 观察子房数/个 | 无融合生子房数/个 | 无融合生殖率/% | 有性生殖率/% |
|--------|---------|-----------|----------|---------|
| 甘南 | 926 | 104 | 11.20 | 88.80 |
| 肃南 | 790 | 378 | 47.80 | 52.20 |
| 陇南 | 843 | 599 | 71.04 | 28.96 |
| 秦州 | 782 | 458 | 58.60 | 41.40 |
| 定西 | 720 | 494 | 68.58 | 31.42 |
| 清水 | 875 | 368 | 42.02 | 57.98 |
| 兰州 | 778 | 397 | 51.00 | 49.00 |
| 陇西 | 804 | 462 | 57.50 | 42.50 |
| 午夜 2 号 | 747 | 243 | 32.47 | 67.53 |

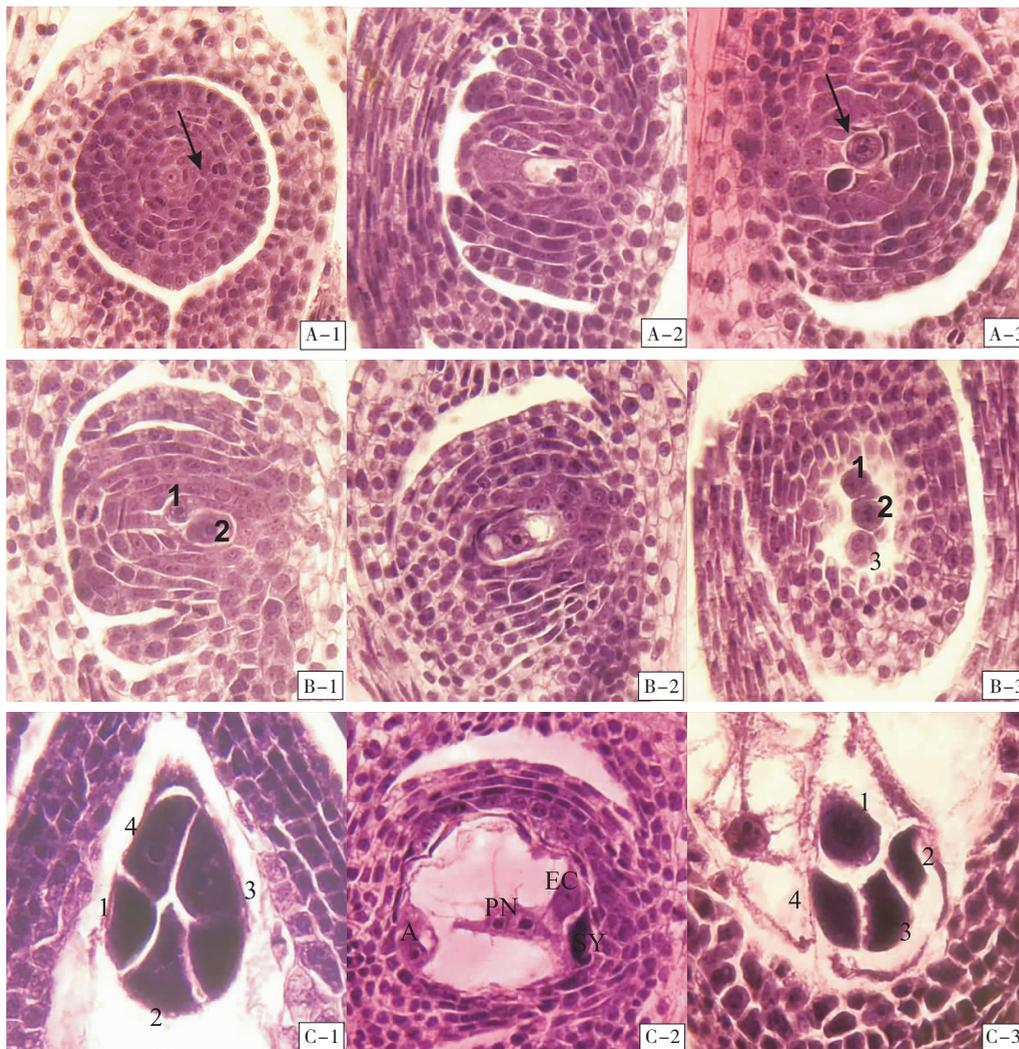


图 4 草地早熟禾有性生殖与无融合生殖对比图

Fig. 4 Comparison of sexual reproduction and apomixis of tested Kentucky bluegrass germplasms

注:图中↑:特化的珠心细胞;A-1:特化的珠心细胞(无融合生殖)A-2:退化珠心细胞(有性生殖)A-3:特化珠心细胞(无融合生殖);B-1:1,2 双胚囊(无融合生殖)B-2:单胚囊退化(有性生殖)B-3:1,2,3 三胚囊(无融合生殖);C-1 及 C-3:成熟胚囊形成四核月见草型,1,2,3,4 四核月见草型(无融合生殖)C-2:成熟胚囊形成七细胞八核:EC 卵细胞、SY 助细胞、A 反足细胞、PN 极核(有性生殖)

2.3 甘肃野生草地早熟禾无融合生殖率与多胚苗率相关性分析

无融合生殖率和多胚苗率的相关系数为 0.962,呈极显著相关性($P < 0.01$),说明可以运用多胚苗粗略的筛选无融合生殖率高的种质(表 5)。

3 讨论

多胚苗发生频率在某些程度上受环境因素的影响^[22]。黎垣庆等^[23]对水稻(*Oryza sativa*)多胚苗材料进行遗传学研究表明,双胚苗发生频率的高低受某些修饰因子的影响;郭学兴等^[24]对水稻 C1001B 进行

表 5 甘肃野生草地早熟禾无融合生殖率与多胚苗率相关性分析

Table 5 Correlation analysis between apomictic frequency and poly-embryo rate of tested Kentucky bluegrass germplasms

| | | 多胚苗率 | 无融合生殖率 |
|------|-------------|------|---------|
| 多胚苗率 | Pearson 相关性 | 1 | 0.962** |
| | 显著性(双侧) | | 0.01 |
| | N | 9 | 9 |

注: **在 0.01 水平(双侧)上显著相关

研究发现多胚苗特性易受温光等环境因素的影响,在遗传上受微效多基因控制;母锡金等^[12]对草地早熟禾

的多胚现象进行研究,得出其颖果产生双胚和三胚是很常见的。本研究发现,不同地区的野生草地早熟禾材料多胚苗率不同,多胚苗率最高的是陇南,可达到15.8%,而甘南没有多胚苗,全是单胚生长。这与赵桂琴^[25]等对甘南材料的多胚苗研究结果一致。可能由于植物种子自身含有的营养成分有限,育苗过程中会造成单苗和多苗在个体上有较大的差异^[26]。

只有特定起源的多胚材料在其杂种优势的固定上才具有较大的价值,因而在筛选和评价多胚材料时有必要弄清其胚胎学特征,这对于农作物无融合生殖的研究有着重大的现实意义^[27]。蔡雪^[11]等发现无融合生殖植物具有的多胚现象特征可作为无融合生殖特性的形态学指标。本试验通过对各草地早熟禾的子房进行石蜡切片观察统计无融合生殖率得出,无融合生殖率最高的为陇南,为71.04%,无融合生殖率最低的甘南,仅为11.2%,其他种质的无融合生殖率差距比较小,范围为42%~58%。赵桂琴等^[25]对3个野生早熟禾和3个引进栽培品种统计了无融合生殖率,得出引进栽培品种的无融合生殖率在48%~65%,野生种质发生频率在5%~23%;田晨霞^[21]对5个野生草地早熟禾的子房进行统计发现无融合生殖率在37.6%~50.2%,本研究得出的试验结果也与之一致,不同种质的无融合生殖率存在一定的差异,宁万军等^[28]也发现不同核桃(*Juglans regia*)品种的无融合生殖率存在较大差异。

本研究对草地早熟禾的无融合生殖率和多胚苗率两者之间的相关性分析,发现无融合生殖率与多胚苗率在0.01水平呈现显著相关,各早熟禾种质的无融合生殖率和多胚苗率的比例大约为4~5.5:1,田晨霞^[21]在研究过程中得出草地早熟禾的无融合率与多胚率的比例基本上为3:1,呈一定的相关性。而赵桂琴等^[25]得出草地早熟禾两者比例基本上为10:1,所占比例基本是一致的。本研究的两者相关性与之前研究结果相吻合。刘向东等^[10]对水稻用激素喷施去雄后的多胚苗进行研究,证实多胚现象与无融合生殖之间存在着高度相关。冯辉等^[29]发现韭菜(*Allium. tuberosum* Rottl. ex Spreng)原品系多胚苗率与其无融合生殖后代多胚苗率呈极显著正相关,说明多胚苗发生与无融合生殖有关,可以将多胚苗作为挖掘韭菜无融合生殖材料的标记性状。

4 结论

1) 试验选用草地早熟禾材料的多胚苗率为0~15.29%,其中最高的是陇南,为15.29%,最低的是甘南,没有多胚生长;

2) 无融合生殖率最高的是陇南,为71.04%,定西与之不相上下,无融合生殖率为68.58%,无融合生殖率最低的甘南,仅为11.2%,其他种质的无融合生殖率差距比较小,为42%~58%;

3) 无融合生殖率与多胚苗率存在显著正相关性,各早熟禾种质的无融合生殖率和多胚苗率的比例大约为4~5.5:1。

参考文献:

- [1] 李平,陈放,周桂梅. 无融合生殖在植物育种中的应用及细胞胚胎学研究方法[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1992,9(2):29-32.
- [2] 殷朝珍,王兆龙,葛才林. 草地早熟禾无融合生殖及其育种利用研究进展[J]. 草原与草坪,2006(1):18-23.
- [3] 蔡得田,马平福,关和新,等. 高频率无融合生殖水稻的研究[J]. 华中农业大学学报,1991,10(3):223-227.
- [4] Nogler G A. Gametophytic apomixis[M] // Johri B M. Embryology of angiosperms. Springer: Berlin Heidelberg, 1984.
- [5] 胡龙兴,王兆龙. 植物无融合生殖相关基因研究进展[J]. 遗传,2008,30(2):155-163.
- [6] 马莉贞,谢永丽. 禾本科牧草无融合生殖的研究进展[J]. 青海草业,2001,10(3):27-30.
- [7] 王巨媛,毛秀杰,翟胜. 植物无融合生殖种质资源筛选策略的研究进展[J]. 吉林蔬菜,2005(5):34-36.
- [8] 黄群策,孙敬三. 被子植物多胚苗的研究进展[J]. 植物学报,1998,15(2):1-7.
- [9] 王绪信,邵启明,晏月明,等. 水稻多胚苗筛选法研究[J]. 西南大学学报(自然科学版),1990,12(5):444-445.
- [10] 刘向东,陈启锋,林光霖,等. 激素处理对水稻多胚苗率的影响[C] // 全国青年作物栽培作物生理学术会文集,1993.
- [11] 蔡雪,母锡金,朱至清,等. 几种具无融合生殖特性的植物多胚和多苗现象的观察[J]. 植物学报,1997,39(7):590-595.
- [12] 母锡金,王伏雄,梁铁兵. 草地早熟禾的多胚现象[J]. 植物学报,1994(s1):68.
- [13] 冯辉,翟玉莹. 韭菜多胚苗及其与无融合生殖关系的研究[J]. 园艺学报,2007,34(1):225-226.

- [14] 莫饶,郑成木,朱稳,等. 咖啡多胚现象与多胚苗形态发育的研究[J]. 植物学通报,2004,21(2):189-194.
- [15] 张锁科. 草地早熟禾发生分蘖时内源激素调控研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2014.
- [16] Anton A M, Connor H E. Floral biology and reproduction in *Poa* (Poeae:Gramineae)[J]. Australian Journal of Botany,1995,43(6):577-599.
- [17] 贺佳圆. 9个野生早熟禾种质材料抗寒性研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2012.
- [18] 母锡金,蔡雪,孙德兰,等. 被子植物的无融合生殖和它的应用前景[J]. 作物学报,2001,27(5):590-599.
- [19] 刘亚栋,孙永泉. 核桃无融合生殖研究进展[J]. 山东商业职业技术学院学报,2010,10(5):109-112.
- [20] Yudakova O I, Shakina T N. Specific features of early embryo genesis in apomictic *Poa pratensis* L[J]. Ontogenez,2007,38(1):5-11.
- [21] 田晨霞. 草地早熟禾胚胎发育特征的研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2014.
- [22] 黄群策,向茂成,梁芳. 在不同世代中 APIV 水稻的多胚苗频率研究[J]. 湘潭师范学院学报(社会科学版),1999,20(6):89-94.
- [23] 黎垣庆,袁隆平. 水稻(*Oryza sativa* L.) 双胚苗遗传学的研究[J]. 作物学报,1990,16(2):176-182.
- [24] 郭学兴,刘刚,曾秀英,等. C1001B 双胚苗形态解剖学研究[J]. 杂交水稻,1991(5):42-44.
- [25] 赵桂琴,曹致中. 草地早熟禾无融合生殖的细胞学鉴定[J]. 草业学报,1997,6(4):64-70.
- [26] 谭飞,胡红玲,胡庭兴,等. 不同施肥水平对桢楠多胚苗生长及光合生理的影响[J]. 西北植物学报,2016,36(6):1172-1181.
- [27] 黄群策. 被子植物无融合生殖研究的进展[J]. 湘潭师范学院学报(社会科学版),1997,18(3):60-64.
- [28] 宁万军,廖康,王国安,等. 新新 2 和温 185 核桃授粉坐果规律与无融合生殖研究[J]. 果树学报,2014,31(2):245-249.
- [29] 冯辉,翟玉莹. 韭菜多胚苗及其与无融合生殖关系的研究[J]. 园艺学报,2007,34(1):225-226.

Identification of apomictic characteristics of wild Kentucky bluegrass germplasm resources in Gansu

LIU Yan,ZHANG Jin-qing,MA Hui-ling,NIU Kui-ju,DONG Wen-ke

(College of Pratacultural Science,Gansu Agricultural University/Key Laboratory of Grassland Ecosystem,Ministry of Education/Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province/Sino-U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability,Lanzhou 730070,China)

Abstract: Eight wild Kentucky bluegrass populations from different areas in Gansu and one commercial cultivar ‘Midnight II’ were used to study their apomictic frequency and poly-embryo rate by using Paraffin sectioning technique and paper germination method. The results indicated that the poly-embryo rate ranged from 0% to 15.29%, the highest was from Longnan and the lowest was from Gannan. The highest apomictic occurrence frequency was from Longnan (71.04%), and the lowest was from Gannan (11.2%), and the rest ranged from 32% to 58%. Correlation analysis showed that there was a significant correlation between apomictic frequency and poly-embryo rate ($R^2=0.96$), breeding of Kentucky bluegrass.

Key words: Kentucky bluegrass; paraffin sectioning technique; apomictic frequency; poly-embryo rate