

高粱无融合生殖系 2083 自主结实特性及胚胎学研究

平俊爱¹ 张福耀¹ 崔贵梅² 程庆军¹ 杜志宏¹ 张义贤^{3*}

(¹ 山西省农业科学院高粱研究所, 山西榆次 030600; ² 山西省农业科学院生物技术中心, 山西太原 030006; ³ 山西大学生命科学技术学院, 山西太原 030006)

摘要 以 2083 为试材, SSA-1 为无融合生殖系对照, 三尺三为有性系对照, 采用去雄鉴定其自主结实率; 杂交后代测验, 鉴定其无融合生殖频率; 以及与胚胎学鉴定方法相结合, 对高粱兼性无融合生殖系 2083 进行了研究。结果表明, 2083 在与其他品种杂交形成真杂种的同时, 也能自主结实, 具有兼性无融合生殖的性质; 其自主结实率为 10.48%, 比对照系 SSA-1 提高 58.8%; 无融合生殖频率为 72.85%。其自交或杂交籽粒特征均表现为 3 种类型, 正常粒、中间粒和小粒, 但 3 种籽粒均能正常发芽。2083 胚的发生机制主要为卵细胞先自行分裂, 形成球胚, 但也有卵细胞和极核同步发育的现象存在。2083 的胚和胚乳的发育大部分是在开花后 1.5 d 开始, 有少量植株在开花前就已开始, 与开花不同步。这些表现说明 2083 为一高频率兼性无融合生殖系, 同时阐明了 2083 胚的发生机制。2083 高频率兼性无融合生殖系的选育成功, 不仅为高粱无融合生殖研究提供了种质资源, 也为今后高粱杂种优势固定提供了启示, 并可为其他作物借鉴。

关键词 高粱; 无融合生殖系; 自主结实

中图分类号: S514

A Study on the Properties of Autonomous Seed Setting and Embryology in Sorghum Apomictic Line 2083

PING Jun Ai¹, ZHANG Fu Yao¹, CUI Gui-Mei², CHENG Qing-Jun¹, DU Zhi-Hong¹, ZHANG Yi-Xian³

(¹ Sorghum Institute, Shanxi Academy of Agricultural Science, Yuci 030600, Shanxi; ² Biology and Technology Center, Shanxi Academy of Agricultural Science, Taiyuan 030006, Shanxi; ³ College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi, China)

Abstract A sorghum apomictic line 2083 was used to study the properties of facultative apomixis by the evaluation of the autonomous seed setting after hand emasculation, frequency characterization of apomixes with progeny test, and the identification in embryology. The research results indicated that 2083 could set seeds autonomously after emasculation and have the property of facultative apomixis, while it could produce true hybrids with other cultivars. The rate of autonomous seed setting in 2083 was 10.48%, 58.8% higher than that of the apomictic control SSA-1, and its frequency of apomixis was 72.85%. The three types of seeds, normal, median and small sizes, produced by selfing or being pollinated with pollen from other sorghum cultivars could germinate normally. The embryo genesis mechanism in 2083 was that the egg cell divided firstly, forming a globe-like embryo, but there was a phenomenon of synchronous development for egg cell and polar nuclei also. The development of embryo and endosperm in 2083 began mostly 1.5 days after flowering, but for few plants before flowering. All of those results showed that 2083 was an apomictic line with high frequency and enriched the germplasm for the research in sorghum apomixes.

Key words *Sorghum bicolor*(L.); Apomictic line; Autonomous seed set

禾本科植物是用于无融合生殖研究最普遍的材料之一, 但在农作物中很少发现无融合生殖现象。1968 年 Rao 和 Narayana^[1]首次报道了高粱品系 R473 具有无融合生殖特性。1970 年 Hanna 等^[2]报道了高粱品系 PGY, 一个多雌蕊品系的无孢子生殖。

Schertz 等^[2,3]还发现 WS(白粒高粱)、试验 3 号白粒突变、SD(南达科他突变)、DH(双单倍体)系中具有多胚囊现象。Murty(1981)的研究^[4,5]还指出, 高粱 R473 的无融合生殖频率为 33.76%。我国高粱无融合生殖研究起步较晚, 但近年来取得了较大进展。

*基金项目: 国家 863 计划项目(2001AA241232)和山西省科技攻关项目(941001)资助。

作者简介: 平俊爱(1968-), 女, 硕士, 主要从事高粱遗传育种及高粱无融合生殖研究工作。

Received(收稿日期): 2002-09-10, Accepted(接受日期): 2003-08-18.

1991年,张福耀等^[6]报道了高粱 296B 具无融合生殖特性,1992年,山西省农业科学院高粱研究所对 100 份高粱品系和杂种进行多胚苗的筛选,发现高粱也存在不定胚现象,晋中 90-1 多胚苗率为 2%,V4/741324 的多胚苗率可达 6% (张福耀等,未发表)。牛天堂、张福耀等(1994)^[7]选育出的无融合生殖系 SSA-1 具无孢子生殖和二倍体孢子生殖类型,并在 Murty 提出的无融合杂种 (Vybrid) 概念基础上,设想了利用兼性无融合生殖系固定杂种优势的模式。应用 Powers 的合成理论,育成的无融合生殖系 SSA-1,其无融合生殖频率达 50%。高粱无融合生殖虽然国内外已有不少研究,然而目前尚未发现专性无融合生殖材料。无融合生殖用于作物育种,理想的材料应为专性无融合生殖或近专性无融合生殖,从现在高粱的无融合生殖频率看,最好的兼性无融合生殖系 SSA-1 也只有 50%。这无疑给无融合生殖育种带来了难度,所以无融合生殖研究仍应以提高频率为主,把选育专性或近专性无融合生殖系作为重点。本研究以高粱新选兼性无融合生殖系 2083 为试材,以三尺三为有性系对照,以 SSA-1 为无融合生殖系对照,采用去雄鉴定,杂交后代测验和胚胎学鉴定方法,对 2083 自主结实特性及胚的发生机制进行了研究。本文不仅为高粱无融合生殖研究提供了种质资源信息,而且为今后高粱杂种优势的固定提供了启示,也可供其他作物借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

供试高粱兼性无融合生殖系为 SSA-1、2083,有性系为三尺三,杂交测验试材为苏丹草 722、糖高粱,均由山西省农业科学院高粱研究所张福耀研究员所主持的课题组提供;胚胎学实验在山西省农业科学院生物技术中心完成。

1.2 主要试剂

1.2.1 固定材料试剂 FAA 固定液。

1.2.2 整染材料试剂 染色剂:苏木精;脱水剂:酒精;透明剂:二甲苯;粘片剂:蛋白甘油;包埋剂:石蜡;封藏剂:加拿大树胶。

1.3 主要仪器

生物快速制片仪、展片台、切片机、光学显微镜、照相机、放大机、磨刀机。

1.4 实验方法

1.4.1 去雄鉴定法 参照 Murty U R 等杂交鉴定方法^[5],花期每份材料选 4 株发育正常植株进行去雄套袋隔离不授粉处理。即在开花前 2 d,将已开颖花去除,用镊子细心剥开颖壳,将尚未散粉的 3 个花药及时摘除,每株去雄 2 码(分枝),每码 50 粒,1 码自交,1 码授粉处理(供杂交后代测验用)。其余小花全部用剪子剪掉。开花时检查去雄情况,发现有留存花药的全部作废,保证去雄鉴定结果的真实可靠。成熟期调查去雄结实粒数,鉴定其自主结实率。

$$\text{自主结实率} = \frac{\text{结实粒数}}{\text{去雄小花总数}} \times 100\%$$

1.4.2 杂交后代测验法 采用 Murty U R 等使用的后代测验 (Progeny Test) 法^[5],选用标记性状明显且差异较大的有性生殖系与上述 1.4.1 中 2083 去雄套袋的另一码杂交,获得 F_0 种子,以高株(糖高粱)、草型(苏丹草 722)为主要标记性状,种植 F_1 ,统计母本株数占总株数的百分比,进行无融合生殖频率的估算。

$$\text{无融合生殖频率} = \frac{F_1 \text{ 中母本株数}}{F_1 \text{ 总株数}} \times 100\%$$

1.4.3 胚胎学鉴定方法 材料于 2000 年夏取于山西榆次高粱所试验地。开花前 2 d 去雄并套袋隔离,开花后 1~2 d,每隔 4 h 取材 1 次;2 d 后每隔 0.5 d 取 1 次,至第 5 天。然后用 FAA 固定液固定,埃氏苏木精整染,酒精系列脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。切片厚 8~10 μm ,显微镜观察并照相。

2 实验结果

2.1 去雄鉴定结果

2.1.1 兼性无融合生殖系的自主结实特性

1998 - 2000 年,在山西榆次、海南黄流对 SSA-1、2083 两个兼性无融合生殖系进行去雄杂交鉴定,以有性系三尺三为对照,结果见表 1。从表 1 中可以看出,SSA-1 和 2083 无论在山西榆次还是海南黄流,去雄套袋隔离均能自主结实,而有性系三尺三的自主结实均为 0。说明这两个材料的自主结实遗传性较稳定,在不同气候、地理条件下均可利用其无融合生殖性状。但不同地点、不同年份自主结实率有较大差异。1998 年夏季,在高粱大孢子母细胞形成期(7 月下旬至 8 月初)气温较高,最高日温达 29.5,2083 的自主结实率达 23.3%,而 2000 年夏季,还是在山

西榆次,气温偏低,白天温度仅 24.1,其自主结实率减低 1 倍多,仅 11.0%,海南冬季鉴定也有同样趋势,说明高温可提高它们的自主结实频率。这一结果与 Murty U R 等对高粱无融合生殖系 R473 的研究结果一致^[8],证明温度对无融合生殖基因的表达有较大影响。

从表中还可以看出,高粱兼性无融合生殖系 2083 的平均自主结实率为 10.48%,而无融合生殖对照系 SSA-1 为 6.6%,2083 比 SSA-1 自主结实率提高了 58.8%。说明 2083 是继 SSA-1 之后新选出的一个高频率兼性无融合生殖系。

2.1.2 自交、杂交结实籽粒特征 通过对 2083 结实的观察发现,无论是自交还是杂交的种子,都有正常粒、中间粒和小粒 3 种类型(见表 2),从表 2 可以看出,3 种籽粒的比例接近 1:1:1。发芽试验表明,3 种类型的籽粒均可正常发芽,但移苗后成活率极低。究竟什么原因导致 3 种籽粒类型的出现,仍需进一步深入研究。

2.2 杂交后代测验结果

2.2.1 2083 无融合生殖的特点 2000 年夏(榆次)用苏丹草和糖高粱作父本与 2083 杂交,2000 年

冬在海南种植 F₁ 代,在 2083 的 3 个不同株系的杂交组合中,出现假杂种——母本株。2083 杂交时出现假杂种,说明它在同其他品种杂交时,既可有性生殖(形成真杂种),又可无融合生殖(不受精形成种子,保留母本性状),具有典型的兼性无融合生殖的特点。

2.2.2 2083 的无融合生殖频率 2000 年夏,对供试材料 2083 与苏丹草、糖高粱杂交,获得 F₁ 代种子,2000 年冬在海南种植 F₁,表 3 列出其母本株占总株数的百分比,表明 2083 的无融合生殖频率达 72.85%,远高于国外无融合生殖系 R473 33.76% 的无融合生殖频率(Murty 等 1979 年在印度海德拉巴,夏季田间鉴定结果)^[8];也高于国内无融合生殖系 SSA-1 25.5%~52.5% 的无融合生殖频率(张福耀等 1992 年在海南黄流冬季田间鉴定结果)^[9]。F₁ 代中母本株数的频率(2083 为 72.85%)远高于自主结实频率(2083 为 10.48%)的事实表明,兼性无融合生殖系除自主无融合生殖外,还有诱导无融合生殖存在,这与张福耀等人在 1992-1993 年对 SSA-1 无融合生殖系的研究结果一致^[9]。

表 1 兼性无融合生殖系及有性系去雄套袋隔离结实情况

Table 1 Seed setting of the emasculation apomictic lines and sexual lines without pollination

年份 试验地点 Year and place	材料 Cultivar	去雄套袋隔离 Emasculation and bagged		结实率 Percentage of seed setting (%)	大孢子母细胞形成期温度 Temperature at the initial stage of megaspore cell formation	
		小花数(个) No. of floret	结实数(个) No. of seed		白天 Day ()	夜间 Night ()
1998 年夏 山西榆次 Summer, 1998 Yuci, Shanxi	SSA-1	250	40	16	21.0 - 29.5	15.0 - 21.5
	2083	250	58	23.3		
	三尺三 Sanchisan	250	0	0		
1999 年夏 山西榆次 Summer, 1999 Yuci, Shanxi	SSA-1	200	21	10.4	18.5 - 24.3	11.0 - 16.4
	2083	200	25	12.5		
	三尺三 Sanchisan	200	0	0		
1999 年冬 海南黄流 Winter, 1999 Huangliu, Hainan	SSA-1	500	4	0.8	18.0 - 24.0	10.5 - 16.0
	2083	500	12	2.4		
	三尺三 Sanchisan	500	0	0		
2000 年夏 山西榆次 Summer, 2000 Yuci Shanxi	SSA-1	500	15	3	17.0 - 24.1	9.0 - 15.3
	2083	650	72	11		
	三尺三 Sanchisan	500	0	0		
2000 年冬 海南三亚 Winter, 2000 Sanya, Hainan	SSA-1	250	7	2.8	20.0 - 29.1	11.5 - 18.0
	2083	250	8	3.2		
	三尺三 Sanchisan	250	0	0		

注:SSA-1 平均结实率 = 6.6%, 2083 平均结实率 = 10.48%, 三尺三平均结实率 = 0%。

Notes: The average percentage of seed setting of SSA-1, 2083 and Sanchisan are 6.6%, 10.48% and 0% respectively.

表 2 2083 不同株系自交、杂交结实籽粒特征

Table 2 The character of seed setting with selfing and cross

株系 Plant line	自交 Selfing			杂交 Cross				
	总和 Total	正常粒数 Normal No. of plant	中间粒数 Middle No. of plant	小粒数 Small No. of plant	总和 Total	正常粒数 Normal No. of plant	中间粒数 Middle No. of plant	小粒数 Small No. of plant
4094	81	31	34	16	92	37	16	39
4095	54	9	13	32	50	10	18	22
4096	40	16	10	14	34	18	11	5
合计 Total	175	56	57	62	176	65	45	66

表 3 2083 杂交后代 F₁ 调查结果Table 3 The result of F₁ plants of 2083 with artificial pollination

年份 Year	地点 Place	组合 Combination	组合数 No. of combination	总株数 Total No of plant	F ₁ 表现型 F ₁ phenotype		无融合频率 Frequency of apomixis (%)
					母本型 No. of maternal plant	杂种型 No. of hybrid plant	
2000	海南三亚 Sanya, Hainan	2083 ×糖高粱	1	35	23	12	65.7
		2083 ×Sugar sorghum					
2000	海南三亚 Sanya, Hainan	2083 ×苏丹草	1	5	4	1	80
		2083 ×Sudan grass					
平均频率 Average frequency							72.85

2.3 胚胎学鉴定结果

2000 年夏,我们对 2083 进行制片,观察结果如下:

2.3.1 2083 子房结构及胚珠形态 2083 的子房数、胚珠与一般高粱相似。

2.3.2 无融合生殖胚囊的发育 无融合生殖胚囊与有性胚囊一样,同样是单核胚囊进行 3 次有丝分裂,形成 8 核 7 细胞的成熟胚囊(图版 -1,2),一般为单胚囊,只是在极少数胚珠中观察到双胚囊(图版 -3)。

2.3.3 无融合生殖胚的发育 高粱兼性无融合生殖系 2083 的成熟胚囊形成后,其有性胚囊在未授粉的情况下,处于静止状态,不再发育,而无融合生殖成熟胚囊形成以后,胚的发育镜检结果如下:

(1) 卵细胞经一定时间休眠后,即可自发分裂,形成无融合生殖原胚,而极核未融合处于静止状态(图版 -4)。

(2) 卵细胞和二极核处于同步发育状态,卵细胞开始分裂,二极核形成胚乳游离核状态(图版 -5)。

(3) 无融合生殖系 2083 的成熟胚囊在形成球胚时,球胚有柄或无柄(图版 -6,7)。

(4) 卵细胞自发分裂形成球胚,无胚乳,无反足

细胞(图版 -8)。

(5) 在所做的 600 张切片中,有 57 张切片已经形成胚和胚乳(图版 -6,7),频率约为 9%,这与 2000 年田间鉴定结果基本一致。

(6) 通过对所有取材的不同时期进行观察,发现在开花后 4 h 至 1 d 之间,有少量植株已开始自主发育,形成球胚和胚乳,说明无融合生殖胚的自主发育有一部分是在开花之前卵细胞就已经分裂形成原胚,二极核也开始发育形成胚乳。这是高粱无融合生殖自主发育的一种方式,无融合生殖胚、胚乳的形成与开花不同步,不受开花的限制。而大部分是在开花后 1.5 d 之后,无融合生殖特性才开始表达,到 4.5 d 左右达到最高。

2.3.4 胚乳的发育 胚乳由二极核融合后受精或不受精发育而来。在未授粉的材料切片中,发现有部分胚珠中的极核呈退化状态(图版 -8),只形成球胚,无胚乳。在观察中只发现有胚乳游离核时期存在(图版 -5)或已形成胚乳(图版 -6,7),而极核如何融合发育成胚乳,还未找到确凿的证据。

3 讨论

3.1 关于高粱无融合生殖研究国内外已有不少报

道。本研究是在总结前人经验的基础上,采用田间去雄鉴定、后代测验及胚胎学鉴定相结合,对新选高粱无融合生殖系 2083 的自主发育特性及无融合生殖胚的发生机制进行了研究,结果表明,2083 自主结实率为 10.48%,比对照 SSA-1 提高 58.8%,其无融合生殖频率为 72.85%;2083 在与其他品种杂交形成真杂种的同时,也能自主结实,具有兼性无融合生殖的性质。胚胎学观察证明,该材料的卵细胞已自主发育形成胚。说明 2083 为一个高频率兼性无融合生殖系。本文首次对 2083 的无融合生殖特性进行了报道。

3.2 关于高粱无融合生殖系自交、杂交结实籽粒特征,目前国内外未见报道,从我们的研究结果看,无论正常粒、中间粒还是小粒,胚的活力基本正常。2083 在自然授粉条件下,籽粒均匀一致,而去雄隔离或杂交后结实出现大小粒现象,是无融合生殖自主发育后胚乳发育不健全,还是由于去雄过程中的机械损伤尚无定论。我们目前正对小粒与无融合生殖的相关性作进一步研究,如小粒与无融合生殖相关,该性状在育种中将成为新的标记性状。

3.3 关于高粱无融合生殖胚乳的发育过程,目前还没有找到胚胎学证据,本研究也只是发现了一些二极核形成胚乳游离核或胚乳的切片,而两极核在未授粉的情况下,如何融合形成胚乳,还需进一步观察研究。

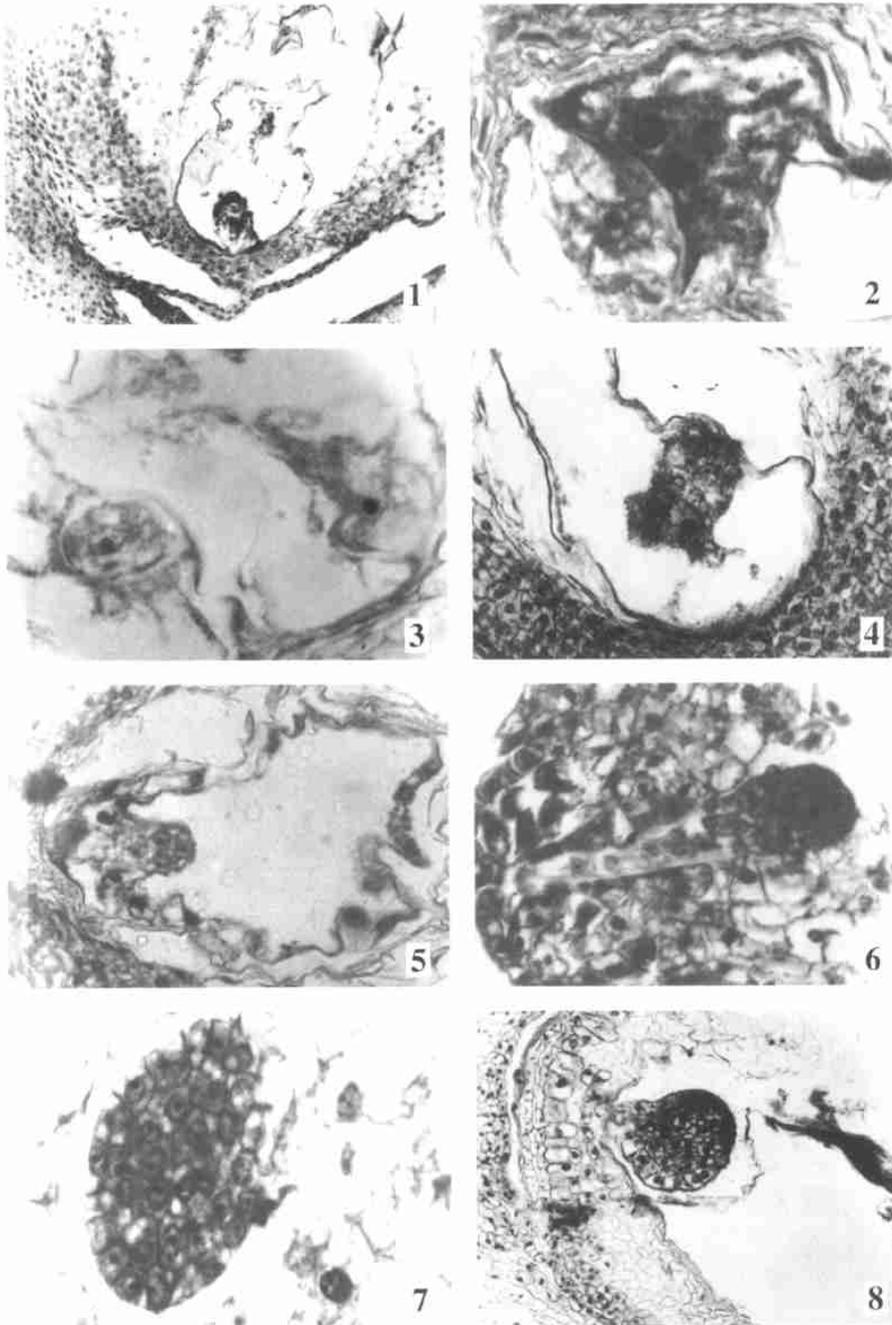
3.4 根据牛天堂等(1991)^[10]提出的兼性 × 兼性(无融合生殖系)的育种体系,选育无融合杂种必须在两个兼性无融合体之间进行。无融合杂种的选育应包括两个方面,一是无融合生殖系的遗传改良;二是无融合杂种的组配,既要体现杂种优势,又要完成杂合性的固定,所用材料应含有不同亲缘的兼性无融合生殖系。2083 的选育,为高粱无融合生殖研究提供了新的种质资源,也可能为最终实现高粱杂种优势的稳定利用打下基础。

3.5 无融合生殖是一个令人感兴趣的新研究领域,成败的关键在于能否获得可利用的无融合基因。从理论上推测,包括高粱在内的许多栽培作物都可能存在无融合生殖类型。然而,迄今仅在水稻、马铃薯、珍珠粟和棉花等少数几种作物中发现过无融合生殖现象。其原因在于,一方面作物的无融合育种一直很少有人涉及,另一方面大多数现行的育种方法易使人们忽略可能是无融合的材料。比如在不育系中出现少量结实现象,则认为是混杂,在杂交后代

表现一致或母性遗传时,就把它当作自交后代淘汰。因此,作者认为,获得无融合基因,除在现有品种中寻找,还可通过诱变处理、异属远缘杂交等方法。目前山西省农业科学院高粱研究所已通过诱变处理(N^+ 离子束注入)获得一无融合生殖系,田间初步鉴定,也表现自主结实。牧草的成功为高粱无融合生殖育种展示了光明的前景,目前我们已经获得了高粱兼性无融合生殖系 SSA-1 (获得山西省科技进步一等奖)。高粱无融合生殖一旦实用成功,将使高粱杂种优势利用发展到一个崭新的阶段,不但可以省去目前在生产上利用三系繁殖、制种所带来的人力、物力、财力的浪费,而且将可能利用种间、属间以至更远缘的强大的杂种优势,把杂交高粱的生产力提高到一个前所未有的水平,产生巨大的经济效益,同时还可能促进常规育种的革命。

References

- [1] Rao N G P, Narayana L L. Apomixis in grain sorghum. *India J Genetics and Plant Breeding*, 1968, **28**:121 - 127
- [2] Hanna W W, Schertz K F, Bashaw E C. Apospory in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Science*, 1970, **170**:338 - 339
- [3] Tang C Y, Schertz K F, Bashaw E C. Apomixis in sorghum lines and their F_1 progenies. *Bot Gaz*, 1980, **141**:294 - 299
- [4] Bashaw E C, Hanna W W. Apomictic reproduction. In: Chapman G P (ed), *Reproductive Versatility in the Grasses*. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 100 - 130
- [5] Hanna W W, Bashaw E C. Apomixis: Its identification and use in plant breeding. *Crop Science*, 1987, **27**(6):1136 - 1139
- [6] Zhang F-Y (张福耀), Li S-M (李三棉), Meng C-G (孟春刚). The study of 296B on sorghum heterosis fix. *Shanxi Agricultural Sciences* (山西农业科学), 1991, **19**(8):3 - 5 (in Chinese)
- [7] Niu T-T (牛天堂), Zhang F-Y (张福耀), Wu S-B (吴树彪), Han X-M (韩雪梅), Wei Y-M (韦耀明), Shang Y-J (尚勇进), Meng C-G (孟春刚), Yan X-M (阎喜梅), Wang J-X (王景雪), Zheng J-B (郑晋波). The breeding of the sorghum apomixis line SSA-1 and 296B. *Crops* (作物杂志), 1994, (1):5 - 6 (in Chinese)
- [8] Murty U R, Rao N G P, Kirti P B. The problems of apomixis and its prospects in the eighties. In: *Sorghum in the Eighties*, India: ICRISAT, 1982. 361 - 372
- [9] Zhang F-Y (张福耀), Meng C-G (孟春刚), Yan X-M (阎喜梅), Zheng J-B (郑晋波), Ping J-A (平俊爱), Wang L-X (王立新), Wei Y-M (韦耀明), Niu T-T (牛天堂), Wu S-B (吴树彪). Study of the apomixis property and genetic behavior of the sorghum apomixis line SSA-1. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 1997, **23**(1):89 - 94 (in Chinese)
- [10] Niu T-T (牛天堂), Wei Y-M (韦耀明), Zhang F-Y (张福耀). A preliminary study on sorghum apomixis and heterosis fix. *Acta Agronomica Sinica* (华北农学报), 1991, **6**(3):33 - 37 (in Chinese)



图版 I 2083 无融合生殖成熟胚囊及胚胎发育过程

1. 单胚囊, $\times 125$; 2. 单胚囊, $\times 500$; 3. 双胚囊, 示 2 个卵细胞, $\times 500$; 4. 示卵裂, 2 极核还在, $\times 250$; 5. 卵裂及胚乳游离核, $\times 500$; 6. 示胚(有柄)和胚乳, $\times 250$; 7. 胚(无柄)和胚乳, $\times 500$; 8. 示球胚无胚乳, $\times 500$ 。

Plate I Development of mature embryo sac and embryo in apomictic line 2083

1. Single embryo sac, $\times 125$; 2. Single embryo sac, $\times 500$; 3. Double embryo sac, two egg cell $\times 500$; 4. Cleavage and two polar nuclei is in $\times 250$; 5. Cleavage and endosperm free nucleus $\times 500$; 6. Embryo (with suspensor) and endosperm $\times 250$; 7. Embryo (without suspensor) and endosperm $\times 500$; 8. Globe-like embryo without endosperm $\times 500$.