



禾本科三倍体：形成、鉴定与利用

严旭^{1,2}, 左艳春¹, 王红林¹, 李杨^{2,3}, 李影正², 寇晶¹, 周晓康¹
唐祈林^{2*}, 杜周和^{1*}

¹四川省农业科学院蚕业研究所/牧业研究中心, 南充 637000; ²四川农业大学玉米研究所, 温江 611130

³绵阳师范学院城乡建设与规划学院, 绵阳 621000

摘要 禾本科三倍体的形成途径包括 $2n$ 配子融合、倍性间杂交、多精受精和胚乳培养。其中, $2n$ 配子融合和倍性间杂交分别为自然界和人工合成三倍体的主要途径。该文介绍了形态学观测、染色体分析、流式细胞术和分子标记等倍性鉴定方法在禾本科三倍体中的应用及其优缺点。目前,三倍体在禾谷类作物中无直接应用价值,但可作为通往多倍体、非整倍体和转移异源基因的遗传桥梁。多年生禾本科三倍体(特别是异源三倍体)在饲草或能源作物中已得到广泛应用,在该类型禾本科作物中均可直接尝试三倍体育种。多倍体的三倍体育种和无融合生殖三倍体育种可作为未来禾本科三倍体的研究方向。三倍性胚乳培养可以一步合成三倍体,多精受精可以实现遗传上3个不同基因组的一步融合,在三倍体研究中应予以重视。鉴于 $2n$ 配子融合、多精受精的稀有特性和倍性间杂交、胚乳培养频繁的染色体变异,高通量三倍体鉴定技术的发展将是三倍体研究实现突破的关键。

关键词 三倍体, $2n$ 配子, 倍性间杂交, 胚乳培养, 多精受精, 育种利用

严旭, 左艳春, 王红林, 李杨, 李影正, 寇晶, 周晓康, 唐祈林, 杜周和 (2021). 禾本科三倍体: 形成、鉴定与利用. 植物学报 56, 372–387.

在二倍体物种的体细胞中, 1套完整的非同源染色体称1个染色体组。三倍体是含有3套染色体组的细胞或个体。同源三倍体(*autotriploid*)的3套染色体组源自同一物种, 如三倍体西瓜(*Citrullus lanatus*, $2n=3x=33$)。异源三倍体(*allotriploid*)的3套染色体组源自2个或3个物种, 如三倍体杨树(*Populus tomentosa* × *P. bolleana*) × *P. tomentosa*, $2n=3x=57$)。三倍体可赋予花卉、水果和林木等器官巨大、无籽(或少籽)、生长迅速及生物量高等优良特性(党江波等, 2018)。三倍体的少籽特性使其在禾谷类作物中无直接应用价值,但在以利用营养体为目标的禾本科植物中不受限制。目前,有关禾本科三倍体的研究不胜枚举,但缺乏系统总结。本文聚焦禾本科三倍体的形成与鉴定,并通过一系列案例说明禾本科三倍体的育种价值和应用前景,以期合成、筛选和利用禾本科三倍体提供借鉴。

1 三倍体的形成

1.1 $2n$ 配子融合

禾本科通过花粉管伸长将雄配子体内的2个精细胞运送至胚囊; 1个精细胞与卵细胞融合形成合子,合子是下一孢子体世代的祖细胞,发育成胚(胚为植物幼态)(图1A); 1个精细胞与中央细胞融合形成初生胚乳细胞,发育成胚乳(胚乳为胚的发育及种子萌发提供营养,随后退化并消失)(图1B)。二倍体正常减数分裂产生单倍性的雌、雄配子通过 $n+n$ 型生殖方式形成二倍体合子,维持后代基因组的二倍性(图1A, C)。二倍体异常减数分裂产生的 $2n$ 配子(与体细胞染色体数目相同)与单倍性配子(n)通过 $2n+n$ 型生殖方式形成三倍体合子(图1E)。

目前,通过观测小孢子发生在植物中已发现5种 $2n$ 配子形成机制(Loginova and Silkova, 2017)(图

收稿日期: 2020-10-09; 接受日期: 2021-01-21

基金项目: 四川省重点研发项目(No.2019YFN0022)、现代农业学科建设推进工程(No.2021XKJS096)、四川省南充市研发项目(No.19YFZJ0060)和四川省十四五饲草育种攻关(No.2021YFYZ0013)

* 通讯作者。E-mail: tangqilin71@163.com; duzhouhe@126.com

2)。减数分裂II期姐妹染色单体分离形成的FDR (first division restitution)型 $2n$ 配子(图2C)在很大程度上保留了亲本的杂合性, 而减数分裂II期姐妹染色单体不分离形成的SDR (second division restitution)型 $2n$ 配子(图2D)高度纯合。因此, 在转移亲本杂合性方面

FDR型比SDR型更为有利(Younis et al., 2014)。Harlan和De Wet (1975)认为所有植物都以某种频率产生 $2n$ 配子, 但物种间发生频率不同。二倍体水稻(*Oryza sativa*, $2n=2x=24$)多胚苗能自发地产生三倍体(张静等, 2002)。在二倍体看麦娘(*Alopecurus*

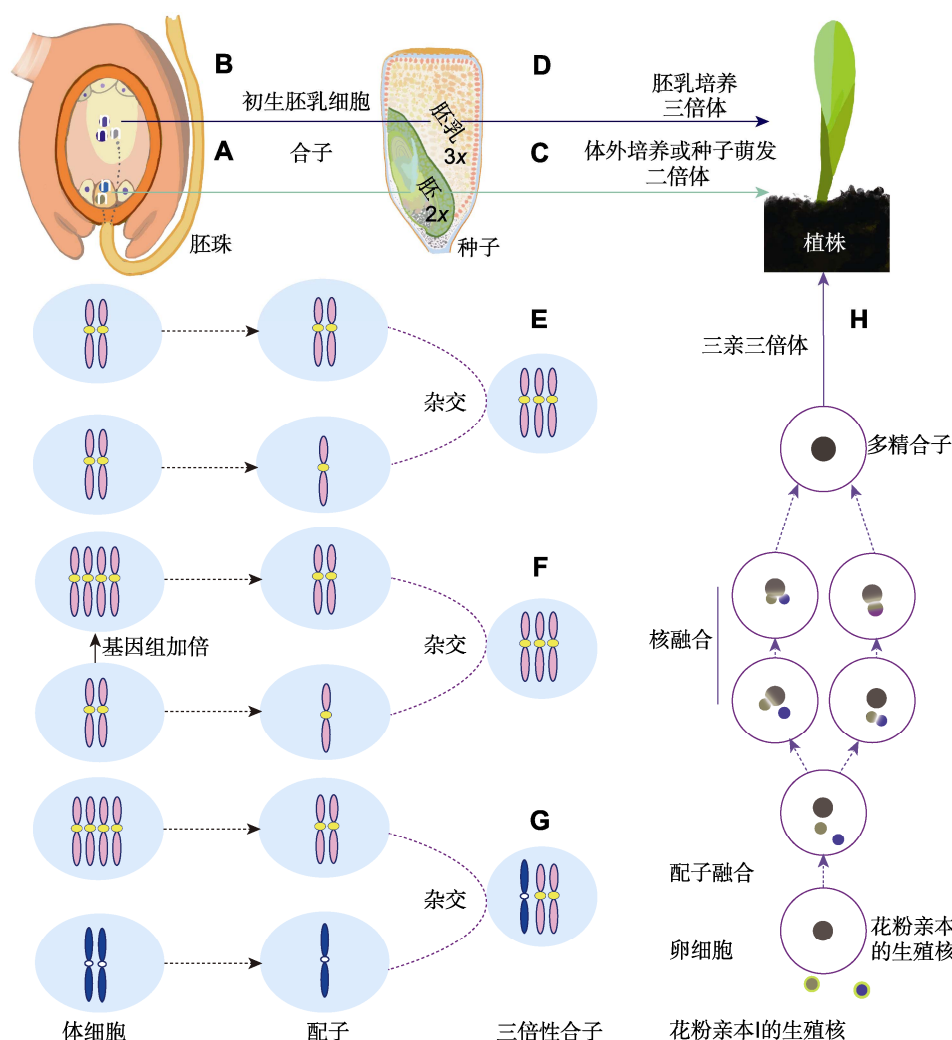


图1 禾本科三倍体的形成途径

(A) 精细胞与卵细胞受精产生二倍性合子后发育成二倍体胚; (B) 精细胞与中央细胞受精产生三倍性初生胚乳细胞后发育成胚乳; (C) 通过离体培养胚或种子萌发发育成二倍体; (D) 通过胚乳组织培养形成三倍体; (E) 通过 $2n+n$ 生殖方式形成三倍体; (F) 通过二倍体加倍后形成的同源四倍体($2n=4x=AAAA$)与二倍体($2n=2x=AA$)杂交合成同源三倍体; (G) 通过四倍体($2n=4x=AAAA$)与二倍体($2n=2x=BB$)杂交合成异源三倍体; (H) 通过多精受精形成三倍体

Figure 1 Pathways to triploidy formation in Poaceae

(A) A sperm fertilizes an egg cell to produce diploid zygote which subsequently grows into diploid embryo; (B) A sperm fertilizes a center cell to produce triploid primary endosperm cell which subsequently grows into endosperm; (C) The embryo develops into diploid plant through *in vitro* culture or seed germination; (D) The endosperm develops into triploid plant via culturing *in vitro*; (E) Triploid formation by a $2n+n$ mating; (F) The autotriploid hybrid produced by crossing tetraploid ($2n=4x=AAAA$) and diploid ($2n=2x=AA$); (G) The allotriploid hybrid produced by crossing tetraploid ($2n=4x=AAAA$) and diploid ($2n=2x=BB$); (H) Formation of triploid by polyspermy

bulbosus, $2n=2x=14$)自然群体中,二倍体、三倍体与四倍体并存(Sieber and Murray, 1979)。在22个二倍体大麦(*Hordeum vulgare*, $2n=2x=14$)品种中,三倍体植株的发生率为0.01%–0.29% (Sandfaer, 1975)。在黄花茅(*Anthoxanthum alpinum*, $2n=2x=10$)中 $2n$ 配子发生率为6.3% (Bretagnolle, 2001)。对十字花科24个物种60个群体的研究表明,尽管 $2n$ 配子先前被认为相对罕见、但普遍发生(通常个体的雄配子 $2n$ 发生率<2%),并且在特定个体中较高,这些极少数产生高频率 $2n$ 配子的个体可能在多倍体的形成中发挥关键作用(Kreiner et al., 2017)。在同一植物中,雌雄 $2n$ 配子发生率也不一致(Ramsey and Schemske, 1998)。鸭茅(*Dactylis glomerata*, $2n=2x=14$) $2n$ 雌配子发生率为0.49%,而 $2n$ 雄配子发生率为0.98% (Maceira et al., 1992)。鉴于 $2n$ 配子发生率低,在 $2x/2x$ 下通过单向有性多倍化(unilateral sexual polyploidization, $2x+x$)形成三倍体的频率远高于通过双向有性多倍化(bilateral sexual polyploidization, $2x+2x$)形成四倍体的频率。例如,在黄花茅中 $2n$ 配子形成三倍体的发生率为0.2%,但未见四倍体发生(Bretagnolle, 2001)。

实践中, $2n$ 配子可通过环境调控、化学诱导、种间杂种和减数分裂突变体获得。 $2n$ 配子发生主要受遗传控制,但暴露于低温或高温、热冲击和高辐射下可诱导或刺激 $2n$ 配子形成(Younis et al., 2014)。例如,蔷薇属(*Rosa*)植物花芽暴露于36°C高温下可提高 $2n$ 雄配子发生率(Pécricx et al., 2011)。在禾本科中采用环境调控诱导 $2n$ 配子发生尚未见报道。 N_2O 在诱导鸭茅(Van Santen et al., 1991)、玉米(*Zea mays*, $2n=2x=20$) (Kato and Birchler, 2006)、小麦(*Triticum aestivum*, $2n=6x=42$)及大麦(Dvorak et al., 1973)的 $2n$ 配子上取得成功。向玉米雄穗喷洒氟乐灵可诱导 $2n$ 花粉并获得同源三倍体(Kato, 1999)。种间或属间杂种是产生 $2n$ 配子的重要途径,其频率高于祖先物种(Ramsey and Schemske, 1998)。Mason等(2011)分析了3种芸薹属(*Brassica*)物种及其 F_1 杂种的 $2n$ 雄配子发生率,发现5个甘蓝型油菜(*B. napus*, $2n=4x=38$)品系的发生率(0%–0.11%,平均值为0.03%)较低,而甘蓝型油菜的11种 F_1 杂种的发生率(0.17%–3.29%,平均值为1.55%)较高。可见,种间杂种较亲本基因组 $2n$ 配子发生率提高。Zeng等(2020)发现在兰花

(*Cymbidium* ssp.)传统品种中 $2n$ 雄配子发生率为0.15%–1.0%,而种间杂种为2.5%–4.03%;同时作者认为可能由于无性繁殖植物存在可替代的繁殖途径, $2n$ 配子的形成频率相对更高。减数分裂活跃基因的突变可能导致纺锤体形成异常或胞质分裂受阻而形成 $2n$ 配子,如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, $2n=2x=10$)中的*cyca1;2/tam* (SDR型)、*osd1* (SDR型)和*Atps1* (FDR型)突变体(Brownfield and Köhler, 2011)。

1.2 倍性间杂交

人工合成三倍体常由 $4x/2x$ 或 $2x/4x$ 产生(Thomas and Chaturvedi, 2008) (图1F, G)。例如,通过秋水仙碱加倍假俭草(*Eremochloa ophiuroides*, $2n=2x=18$)种子形成的 $4x$ 与 $2x$ 杂交获得同源三倍体(Schwartz et al., 2013)。鸭茅 $2x/4x$ 获得同源三倍体(钟声, 2006)。水稻与小粒野生稻(*O. minuta*, $2n=4x=48$)杂交获得异源三倍体(张智奇等, 1994)。精细胞正常发育的二倍体常作为父本,而四倍体(特别是人工合成四倍体)通常育性降低作母本。例如,水稻 $4x/2x$ 杂交结实率(0.42%–1.64%)高于其反交组合(0.20%–0.85%),倍性间杂交同源三倍体成活率(0.07%)极低,杂交后借助胚拯救可提升三倍体植株的成活率(0.78%) (黄群策和孙敬三, 1999)。在谷子(*Setaria italica*, $2n=2x=18$) $4x/2x$ 的2100个杂交后代中得到5株三倍体(发生率为0.24%),反交未能获得三倍体(王润奇等, 1994)。特别地,当前生产中应用的禾本科三倍体几乎全部源自倍性间杂交(表1)。此外,高粱(*Sorghum bicolor*, $2n=2x=20$)单倍体自交产生的三倍体可能源于减数分裂I期和II期中胞质不分裂产生 $2x$ 配子与减数分裂I期不分裂、减数分裂II期正常分裂的 x 配子结合(Erichsen and Ross, 1963);四倍体种间杂交 F_1 代中1个基因组丢失也可形成三倍体(于卓等, 2004)。

1.3 多精受精

卵细胞融合2个精细胞($n+n+n$)形成三倍体合子(图1H),称多精受精(polyspermy)。多精受精发生困难。为了阻止多精融合的风险,动物通过多精障碍(polyspermy block)确保合子的二倍性:(1)单精合子在精卵质膜融合阶段通过卵膜周围电位立即触发的正向移位或通过 Ca^{2+} 依赖性皮质颗粒的胞吐作用在受精卵周围形成1个受精膜以阻止多余的精细胞入

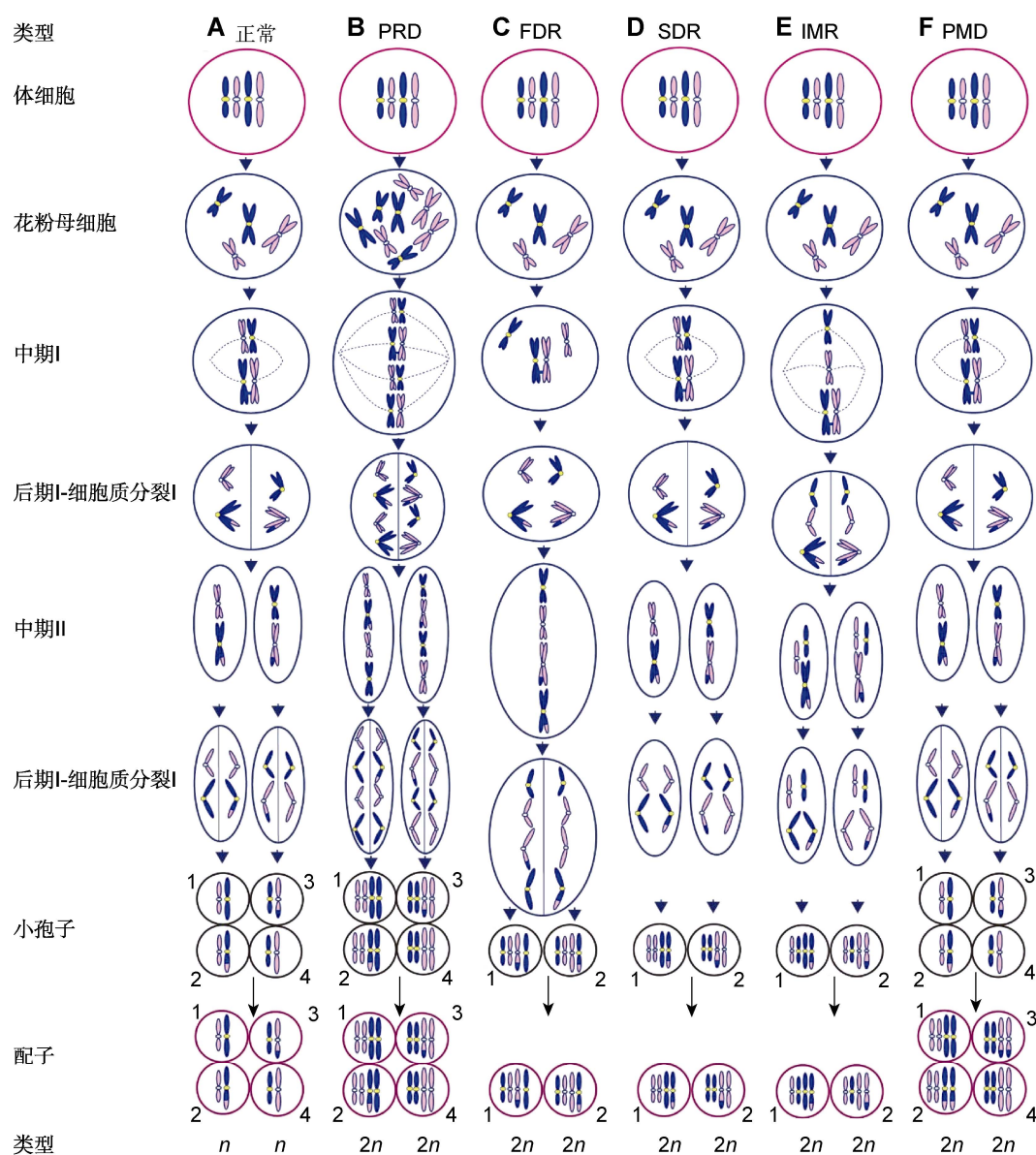


图2 $2n$ 配子的形成机制

(A) 与体细胞相比正常配子的染色体数目减半; (B) 通过胞质融合或多核体形成的四倍体花粉母细胞产生PRD型 $2n$ 配子, 如鸭茅 (Falistocco et al., 1995); (C) 在减数分裂I期同源染色体无配对和分裂形成的FDR型 $2n$ 配子将保留除重组片段外的所有亲本基因, 如雀稗 (Filho et al., 2014) 和多年生黑麦草 (Chen et al., 1997); (D) 在减数分裂II期因分裂缺失形成的SDR型 $2n$ 配子将保留除重组片段外比正常配子多1套染色体副本的 $2n$ 配子, 如多年生黑麦草 (Chen et al., 1997); (E) 在减数分裂I期部分染色体以姐妹染色单体分离, 其余以二价体分离, 随后在减数分裂II期分裂缺失形成IMR型 $2n$ 配子, 如百合 (Lim et al., 2001); (F) 减数分裂正常而进入配子体发育阶段时基因组加倍形成PMD型 $2n$ 配子, 如马铃薯 (Bastiaanssen et al., 1998)

Figure 2 Mechanisms of $2n$ gamete formation

(A) Chromosome numbers of normal gametes are halved compared with somatic cells; (B) PRD (pre-meiotic doubling) gametes are obtained as a result of the tetraploid pollen mother cells formed by cytomixis or syncytium, e.g., *Dactylis glomerata* (Falistocco et al., 1995); (C) In the FDR (first division restitution) type, pairing and division of homoeologous chromosomes do not occur during meiosis I, and the FDR $2n$ gametes maintain all of their parental genes except cross-over fragments, e.g., *Paspalum jesuiticum* (Filho et al., 2014) and *Lolium perenne* (Chen et al., 1997); (D) SDR (second division restitution) gametes with two copies of non-recombinant chromosomes are the result of the second division omission or cytokinesis abnormalities after normal

anaphase II, e.g., *L. perenne* (Chen et al., 1997); **(E)** IMR (indeterminate meiotic restitution) gametes were discovered in *Lilium longiflorum* × Asiatic hybrid (Lim et al., 2001), in which some chromosomes are separated as univalents during meiosis I whereas the others are separated as bivalents, and subsequently the second division omission occurs during meiosis II; **(F)** PMD (post-meiotic doubling) gametes occurs due to the genome doubling of haploid spores during microgametogenesis, e.g., *Solanum tuberosum* (Bastiaanssen et al., 1998)

表1 禾本科三倍体品种

Table 1 Triploidy cultivars in Poaceae

母本	父本	品种名	用途	参考文献
狗牙根(<i>Cynodon dactylon</i>) 2n=4x=36	非洲狗牙根(<i>C. transvaalensis</i>) 2n=2x=18	Tifway、TifwayII、Midiron、TifEagle、Tifgreen、Tifdwarf、MS-Supreme、MS-Express、TifSport和Champion (2n=3x=27)	草坪草	Kamps et al., 2011
荻(<i>Miscanthus sacchariflorus</i>) 2n=4x=76	芒(<i>M. sinensis</i>) 2n=2x=38	Illinois和Freedom (2n=3x=57)	能源作物	Perera et al., 2015
玉米(<i>Zea mays</i>) 2n=2x=20	四倍体大刍草(<i>Z. perennis</i>) 2n=4x=40	玉草1号(2n=3x=30)	饲用作物	任勇等, 2007
指状摩擦禾(<i>Tripsacum dactyloides</i>) 2n=2x=36	指状摩擦禾(<i>T. dactyloides</i>) 2n=4x=72	Verl (2n=3x=54)	饲用作物	Springer et al., 2006
薏苡(<i>Coix lacryma-jobi</i>) 2n=2x=20	水生薏苡(<i>C. aquatica</i>) 2n=4x=40	丰牧88 (2n=3x=30)	饲用作物	孙福艾, 2017
象草(<i>Pennisetum purpureum</i>) 2n=4x=28	美洲狼尾草(<i>P. americana</i>) 2n=2x=14	热研4号(2n=3x=21)	饲用作物	刘国道等, 2012
美洲狼尾草(<i>P. americana</i>) 2n=2x=14	象草(<i>P. purpureum</i>) 2n=4x=28	闽牧6号和华南1号(2n=3x=21)	饲用作物	陈平等, 2004; 陈钟钊等, 2012

卵; (2) 生理多精(physiological polyspermy)在多精卵子中仅选择性融合1个精核, 剩余的精核退化或消失; (3) 多精合子致死或早期胚胎致死, 在动物中源自多个精子的额外中心体可产生多个微管组织中心(microtubule-organizing centers, MOCs), MOCs将引发异常的核分裂和细胞分裂, 导致合子或胚胎早期致死(Nakel et al., 2017)。被子植物拟南芥则通过FERONIA受体激酶确保合子的二倍性, 防止多余花粉管到达胚囊; 胚珠通过助细胞中的丝状器分泌诱导蛋白AtLURE1s吸引花粉管进入胚珠, 当1个花粉管穿过胚珠孔端的其中1个助细胞时, 丝状器上FERONIA受体激酶表达, 并与丝状器中去甲酯化果胶结合进而诱导产生NO; NO对AtLURE1s进行亚硝基化修饰后抑制AtLURE1s的分泌并造成其失活, 抑制其与受体的相互作用, 使其对后来花粉管的吸引能力急剧下降, 从而避免多管现象(polytubey), 最终阻止多精受精(Duan et al., 2020)。由于植物细胞缺乏中心体, 并且不将它们用作核分裂过程中染色体分离的纺锤体; 一旦多余花粉管到达胚珠, 在被子植物中形成的多精合子可能不会死亡。多精受精的鉴定困难,

利用传统的根尖压片技术无法区分三倍体由何种途径(n+n+n或2n+n)产生。因此, 有关兰花(Hagerup, 1947)、玉米(Rhoades, 1936)、高粱(Erichsen and Ross, 1963)和小麦(Suarez et al., 1992)的多精受精现象一直停留在理论推测, 缺乏直接的生物学证据。

近几年, 研究证实多精受精三倍体在水稻(*Oryza sativa*)和拟南芥中可以发生。Toda等(2016)及Toda和Okamoto (2016)使用处在泛素启动子控制下表达组蛋白H2B-GFP的精细胞作为观测对象, 利用水稻体外受精体系, 连续2次电融合, 成功合成了水稻多精合子; 2种多精受精途径(2个精核先后与卵核融合、2个精核融合后再与卵核融合)均被观测到(图1H); 多精合子的双极纺锤体行为正常, 当分化为原胚后经组织培养形成三倍体植株。Nakel等(2017)构建了高通量多精受精检测工具HIPOD, 该工具由mGAL4-VP16/pUAS25构成。花粉亲本1包含RPS5a启动子控制下的异源转录因子mGAL4-VP16, 但不含除草剂抗性的bar基因; 花粉亲本2仅包含bar基因, 无转录激活子, bar基因处于沉默状态。由单一花粉亲本产生的幼苗对除草剂敏感并在除草剂处理后死亡, 仅由花

粉亲本1和2共存产生的2种构建体的植株才能避免除草剂的危害。拟南芥胚珠中偶尔会存在2个花粉管进入的现象, 这为多精受精创造了可能(Beale et al., 2012)。通过1个卵细胞与2个精细胞完成多精受精, 只需一步即可形成含有3个亲本的异源三倍体(Nakel et al., 2017)。多精合子发生的概率极低, 在拟南芥中发生率为0.012% (Nakel et al., 2017), 这导致多精受精鉴定和利用困难。从演化和育种的角度看, 植物多精受精诱导多倍体的意义在于3个遗传上不同基因组的一步融合。

1.4 胚乳培养

在二倍体禾本科植物中, 2个极核($n+n$)与精细胞(n)融合形成三倍性初级胚乳细胞(primary endosperm cell) (图1B), 随后发育为三倍体胚乳。若胚乳细胞具全能性, 可直接通过组织培养获得三倍体(图1D)。据报道, Lampe和Mills于1933年将玉米未成熟胚乳置于含有马铃薯和玉米提取物的培养基中, 观测到胚周围有少量胚乳细胞增殖(Thomas and Chaturvedi, 2008)。随后, 在玉米(La Rue, 1949)、多年生黑麦草(*Lolium perenne*) (Norstog, 1956)和多花黑麦草(*L. multiflorum*, $2n=2x=14$) (Norstog et al., 1969)未成熟胚乳的离体培养中, 获得了可连续增殖的愈伤组织。Johri和Bhojwani (1965)将檀香科植物*Exocarpus cupressiformis*由成熟胚乳直接分化出三倍体茎芽。Nakano等(1975)从水稻未成熟胚乳中分化出植株, 证实了水稻胚乳细胞的全能性。之后, 在水稻中又重现了这一结果(Bajaj et al., 1980)。截至目前, 大麦(孙敬三和朱至清, 1981)、小麦(赵世绪等, 1984)、黑麦(*Secale cereale*, $2n=2x=14$) (赵世绪等, 1984)、小麦-黑麦杂种(王敬驹等, 1982)、高粱(田立忠和徐爱菊, 2000)和毛竹(*Phyllostachys edulis*, $2n=4x=48$) (袁金玲等, 2015)等禾本科植物均通过胚乳培养分化出植株。

胚乳发育阶段是胚乳培养的关键因素, 常用授粉后天数(days after pollination, DAP)来表征。通常以未成熟胚乳作外植体, 如多年生黑麦草在9–10 DAP (Norstog, 1956)、玉米在8–11 DAP (Straus and La Rue, 1954; Tamaoki and Ullstrup, 1958)、水稻在4–7 DAP (Nakano et al., 1975)、小麦在10 DAP (赵世绪等, 1984)以及大麦在8 DAP (Sehgal, 1974); 小麦-

黑麦杂交胚乳的愈伤组织在14 DAP时诱导频率最佳, 在7 DAP时次之, 而在21 DAP时已不能诱导出愈伤组织(王敬驹等, 1982)。以毛竹30–40 DAP的成熟胚乳作为外植体获得成功(袁金玲等, 2015)。一般情况下, 成熟胚乳启动细胞分裂在于初始时与胚的联动, 而未成熟胚乳启动细胞分裂与胚是否存在无关(Hoshino et al., 2011)。需要特别指出的是, 添加赤霉素等外源激素可以代替胚, 而小麦和黑麦的胚乳在无胚和赤霉素的条件下也可产生愈伤组织并分化成苗(赵世绪等, 1984)。培养基、生长调节剂和环境因素对于胚乳三倍体的形成也起着重要作用。例如, 培养基中添加8%的蔗糖有利于小麦-黑麦杂交胚乳的愈伤组织诱导(王敬驹等, 1982)。添加氮源对于未成熟胚乳的增殖至关重要(Hoshino et al., 2011)。在小麦和黑麦胚乳培养时, 添加激动素和2,4-D可提高愈伤组织诱导频率(赵世绪等, 1984)。玉米胚乳在暗处培养效果更佳(Straus and La Rue, 1954), 而在黑麦中光照对胚乳的增殖无影响(Norstog et al., 1969)。胚乳培养以组织培养为技术基础, 并未成为主流的三倍体合成方式。

二倍体由 $2x/4x$ (或 $4x/2x$)途径(图1F)获得三倍体需要跨越多重障碍。(1) 二倍体加倍为四倍体;(2) 四倍体能生殖生长且雌、雄配子至少一种部分可育;(3) 四倍体与二倍体花期相遇且杂交结实;(4) 三倍体种子萌芽、幼苗幸存。故此途径通常成功率低且周期较长。通过对已有胚乳培养成功案例的回顾, 经胚乳培养在特定物种可以获得三倍体, 并可缩短三倍体合成周期。因此, 当 $2x/4x$ (或 $4x/2x$)途径合成三倍体无效时, 胚乳培养提供了一种可供尝试的新方法。

2 三倍体的鉴定

2.1 形态学观测

在通过形态鉴定体细胞或配子体倍性的实践中, 花粉粒大小(花粉直径)是常用参数。例如, 燕麦属(*Avena*)花粉粒大小与植株倍性呈极显著正相关($r=0.86$, $P<0.01$) (Katsiotis and Forsberg, 1995)。在大麦(Johansen and Vonbothmer, 1994)、看麦娘属(*Alopecurus*)和沿沟草属(*Catabrosa*) (Sheidai et al., 2009)中也有相似的结果。然而, 多年生黑麦草花粉粒大小不受体细胞倍性的影响(Jansen and Dennijs, 1993)。垂穗草

(*Bouteloua curtipendula*, $2n=2x=20$) 在六倍体以内花粉粒大小及其变异系数随着倍性的增加而增加, 当超过六倍体后2个参数不再随倍性变化(Kapadia and Gould, 1964)。在4个大麦属(*Hordeum*)物种中, 已露出小花外的花粉粒, 其花粉直径大于未露出小花的花粉粒; 花粉粒大小随着倍性水平的增加而增加($2x$ 、 $4x$ 和 $6x$) (Johansen and Von Bothmer, 1994)。因此, 通过花粉鉴定植株倍性应当注意物种间差异并统一花粉发育时期。无芒雀麦(*Bromus inermis*, $x=7$)的花粉粒大小在各倍性($4x$ 、 $6x$ 和 $8x$)之间存在重叠, 通过气孔长度鉴定倍性优于气孔频率与花粉粒大小(Tan and Dunn, 1973)。与通过花粉粒性状鉴定倍性相似, 通过气孔性状鉴定倍性的效果也因物种而异。

近年来, 基于库尔特原理的体积粒度分析(volume-based particle size analysis)可以完成花粉粒个体的三维测量, 根据三维体积计算花粉直径; 相比于花粉粒的二维测量, 将直径和横截面积作为花粉粒大小的参数能更准确地鉴定倍性(De Storme et al., 2013)。花粉鉴定需要以植株开花为前提, 鉴定周期长、工作量大, 且易受环境影响。此外, 多数特征(如生育期延迟、育性降低)也并非三倍体独有, 在其它高倍性多倍体中也同样存在。根据形态特征鉴定植株倍性, 其结果可靠性低。因此, 形态学特征通常只作为三倍体的附属特征而非鉴定标准, 确定倍性时需结合其它方法。

2.2 染色体分析

染色体分析以染色体制备为基础, 包括对减数分裂染色体和有丝分裂染色体的制备。有丝分裂染色体的制备须取材于具有有丝分裂活性的分生组织(如根尖、茎尖和愈伤组织), 对已分化的非分裂细胞无效。禾本科植物通常采用根尖(代表LIII层)进行染色体制备, 因此并不能同时反映3个组织学层(LI、LII和LIII)的倍性。随后依次经历根尖预处理(使细胞分裂停滞在中期, 促使染色体缩短变粗、分散)、固定(杀死细胞、变性蛋白, 从而保持染色体的固有形态)、解离(用酸解法或酶解法软化或去除细胞壁, 以便制片)和制片(使细胞和染色体分散)等过程完成染色体制备。按照制片方法的不同, 分为压片法(squashing)、涂片法(spreading)、滴片法(dropping)和蒸片法(SteamDrop)(Kirov et al., 2014)。最后, 通过镜检染色体数目或形

态确认倍性。该方法操作过程繁琐、工作量大, 因此不适用于大规模的倍性鉴定。同时, 对于细胞核较小和染色体较多的植物, 难以获得准确结果。然而, 该法依然是目前鉴定倍性最为可靠的方法, 并作为三倍体鉴定标准。

在染色体制备的基础上, 基于特异基因重复序列的荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)和基于基因组中同源性重复序列的基因组原位杂交技术(genomic *in situ* hybridization, GISH)进一步提高了鉴定的分辨率。例如, 野大麦(*H. brevisubutum*, $2n=4x=28$, $H_1H_1H_2H_2$)与加拿大披碱草(*Elymus canadensis*, $2n=4x=28$, SSH_6H_6)杂交, 通过GISH鉴定某 F_1 为一组 H_6 染色体组丢失的异源三倍体($2n=3x=21$, SH_1H_2) (于卓等, 2004)。利用GISH技术成功鉴定了多年生黑麦草-茅茅(*L. perenne-Festuca pratensis*, $2n=3x=14Lp+7Fp$) (King et al., 1999)、玉米-四倍体多年生大刍草(*Z. mays-Z. perennis*, $2n=3x=10Zm+20Zp$) (Iqbal et al., 2018)及水稻-斑点野生稻(*O. sativa-O. punctata*, $2n=3x=12Os+24Op$) (Sun et al., 2017)等异源三倍体的基因组构成。同样地, 该法通常用于特异材料倍性鉴定和亲缘关系分析, 鉴定大批量材料过程更显繁琐。

2.3 流式细胞术

流式细胞术(flow cytometry, FCM)通过G1期细胞核DNA含量间接反映材料倍性。取材为任意组织(禾本科以新鲜幼嫩叶片为最佳), 对植株损伤小, 仅需 1 cm^2 叶片, 故在苗期即可实现倍性鉴定。目标组织和参照组织分别经DNA核解离液解离为单细胞悬浮液, 二者等量混合上机检测为内标法(internal reference method), 单独上机检测为外标法(external reference method)。外标法更简便, 内标法更准确。由于植物细胞中含有大量的次生代谢物, 导致悬浮液制备的难度增加, 应根据不同种类选择核提取液。例如, 鸭茅为Otto (许蕾等, 2019), 狗牙根(*Cynodon dactylon*)和高羊茅(*F. elata*)为Hepes, 二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)用Tris· $MgCl_2$ (汪艳等, 2015)。将荧光染料(如碘化丙啶(propidium iodide))加入细胞悬浮液后可均匀地插入到DNA双链中, 其嵌入量与DNA含量成正比, 通过流式细胞仪检测荧光强度来表征DNA含量。FCM可在数秒内对上万个植

物细胞进行DNA含量测定, 从而实现倍性的高通量检测。利用染色体计数与FCM对30份芒属(*Miscanthus*)植物的鉴定表明, 以染色体压片为参考, FCM完成了对二倍体芒(*Miscanthus sinensis*, $2n=2x=38$)的准确鉴定(刘秀明等, 2014)。但对于更高倍性的鉴定FCM可能存在误判。例如, Pagliarini等(2012)以染色体分析为标准评判了FCM鉴定臂形草(*Brachiaria brizantha*, $x=9$)倍性的准确性, 某些四倍体材料被误判为五倍体或六倍体, 而某些六倍体材料被误判为五倍体。

FCM检测花粉倍性为 $2n$ 配子的评估提供了高通量的选择。然而, FCM难以获得高质量核荧光直方图且不能将真实的 $2n$ 核(singlet)与 $n+n$ 黏合细胞(doublet)区分(Kron and Husband, 2015)。 $2n$ 配子的发生为稀有事件, 因此区分 $2n$ 核与黏合细胞十分必要。Kron等(2015)开发并验证了使用脉冲分析(pulse analysis)对花粉核数据进行双重校正, 以便使用花粉FCM获得 $2n$ 配子核的准确测量值。当在 $2n$ 配子(2C DNA含量)区域中, 细胞核荧光高度和/或宽度度量显示双峰态(可指示singlets和doublets), 再结合在 n 配子中荧光参数的单峰分布, 可以区分 $2n$ 核和黏合细胞。这些检测条件在十字花科中得到满足, 但禾本科不满足上述条件, 仍需进一步改进或开发新的方法。

2.4 分子标记

分子标记技术通过在单个位点寻找不同的等位基因区分三倍体和二倍体。若 $2n$ 配子亲本与 n 配子亲本在某个位点的基因型分别为Aa和aa, 后代出现2个等位基因, 需结合植株表型、染色体分析或FCM完成三倍体的准确鉴定。若该位点 $2n$ 配子亲本的等位基因杂合且与 n 配子亲本的等位基因不同, 在后代中该检测位点有3个等位基因时, 可直接鉴定该后代为三倍体; 当出现源自双亲的2个等位基因时只能表示二者杂交成功, 必须再结合植株表型、染色体分析或FCM确定该后代是否为三倍体。Chen等(1997)利用RFLP鉴定了多年生黑麦草中 $2n$ 雄配子的发生。Lamote等(2002)利用AFLP确定了多年生黑麦草可产生 $2n$ 雌配子。Mutlu等(2020)利用SRAP和SSR对狗牙根倍性间杂交($4x/2x$)后代的双亲真实性进行了鉴定。

由于存在无效等位基因、杂交后DNA序列消除和同源重组等情况, 在利用分子标记检测倍性时必须同

时使用多个分子标记。此方法要求选择1组具有较高等位基因多样性的分子标记, 通过筛选的引物显现后代中等位基因的配置, 故在遗传多样性较低的物种中难以实现。利用分子标记可实现苗期检测, 但实验过程比FCM复杂。如何开发新的分子标记直接或间接地表征倍性以加速三倍体选育进程成为亟待解决的问题。近年来, 随着测序成本降低和技术进步, 利用二代测序数据推测三倍体已有文献报道。例如, 通过扩增子测序鉴定鱼类三倍体(Delomas, 2019)。

3 三倍体的利用

3.1 直接利用

胚、胚乳和源自母本的果皮与种皮共同构成禾本科植物的果实——颖果, 约占世界粮食产量的60% (Keller and Feuillet, 2000)。三倍体中3套染色体组致使染色体联会异常(单价体和三价体的形成), 形成的雄配子育性降低或丧失; 雌配子育性降低幅度不及雄配子, 称之为半不育。例如, 玉米(MM)与四倍体多年生大刍草合成的一株具有花粉育性的异源三倍体($3x$, MPP), MPP/MM、MM/MPP和MPP/PPPP杂交结实率分别为7.84%、0.56%和0.52%, 三倍体的育性降低, 且其雌配子育性较雄配子高(吕桂华等, 2015)。鸭茅三倍体的结实率仅为0.12% (钟声, 2006)。通过四倍体多花黑麦草/二倍体羊茅合成的三倍体具有花粉育性, 而反交合成的三倍体花粉不育(Naganowska et al., 2001)。可见, 目前三倍体在以子实为收获目标的禾谷类作物上无直接利用价值。

三倍体通过保留用于生产种子的光合作用能量来促进营养生长, 通常具有更强的营养生长优势(Hoshino et al., 2011)。因此, 禾本科三倍体育种在草坪草、能源草和牧草上收获颇丰(表1; 图3A)。与二倍体相比, 三倍体的少花或无花特性有利于草坪管理和提升草坪观赏价值。在无融合生殖早熟禾(*Poa pratensis*)中, 筛选出源于 $2n$ 配子的抗病三倍体草坪草种质(Pepin and Funk, 1971)。三倍体比二倍体海滨雀稗(*Seashore paspalum*, $2n=2x=20$)的叶色更深(Schwartz et al., 2013)。通过四倍体普通狗牙根($2n=4x=36$)与二倍体非洲狗牙根(*C. transvaalensis*, $2n=2x=18$)杂交育成了Tifway、TifEagle和Tifgreen等知名三倍体狗牙根品种($2n=3x=27$), 成为三倍体草

坪草育种的杰出典范。三倍体奇岗(*M. × miscanthus*, $2n=3x=57$)具有多年生、 C_4 高光效、低氮需求、较耐低温和高生物量等特性,是最重要的第二代能源植物,现已成为能源模式植物(潘志军等, 2017)。三倍体鸭茅苗期生长速度快于双亲(钟声, 2006)。三倍体热研4号王草第3年丰产期干物质产量比母本象草(*Pennisetum purpureum*)增产32.8% (刘国道等, 2012)。玉草1号由二倍体玉米与四倍体多年生大刍草杂交而成,分蘖力强、生物量高且具再生性(任勇等, 2007)。当前生产中利用的禾本科三倍体能源草和牧草(表1)大多具有如下特性: (1) 利用异源三倍体的亚种间杂种优势; (2) 多年生高大禾草; (3) 易于无性繁殖。因此, *F. apennina* ($2n=4x=28$)与 *F. pratensis* ($2n=2x=14$)合成的三倍体显示出生物量杂种优势,但因杂交结实率低,须提高结实率或采取无性扩繁技术,否则难以应用(Boller and Kopeck, 2020)。高粱

属和斑茅(*Eriarthus arundinaceus*)等高大禾草目前尚无三倍体品种,可尝试三倍体育种。

3.2 桥梁作用

对于有直接利用价值的三倍体,可通过组培、诱变和转基因等技术进一步改良(图3B)。MS-Supreme源于Tifgreen的自然突变,与Tifgreen相比其叶片和茎节节间缩小、变短(Krans et al., 1999)。在Tifgreen的自然突变中还选育出Tifdwarf和FloraDwarf等矮生品种; TifwayII、TifSport和TifEagle则由相应三倍体亲本经 γ 辐射诱变而成(Kamps et al., 2011)。利用体细胞无性系变异育种技术在TifEagle的愈伤组织中长时间连续继代培养能有效诱导体细胞变异(如矮化突变体); 以 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 为选择压筛选出耐盐细胞系(Lu et al., 2007)。以美洲狼尾草(*Pennisetum americana*)/四倍体象草合成的三倍体 F_1 种子为诱变材料,经 γ 辐

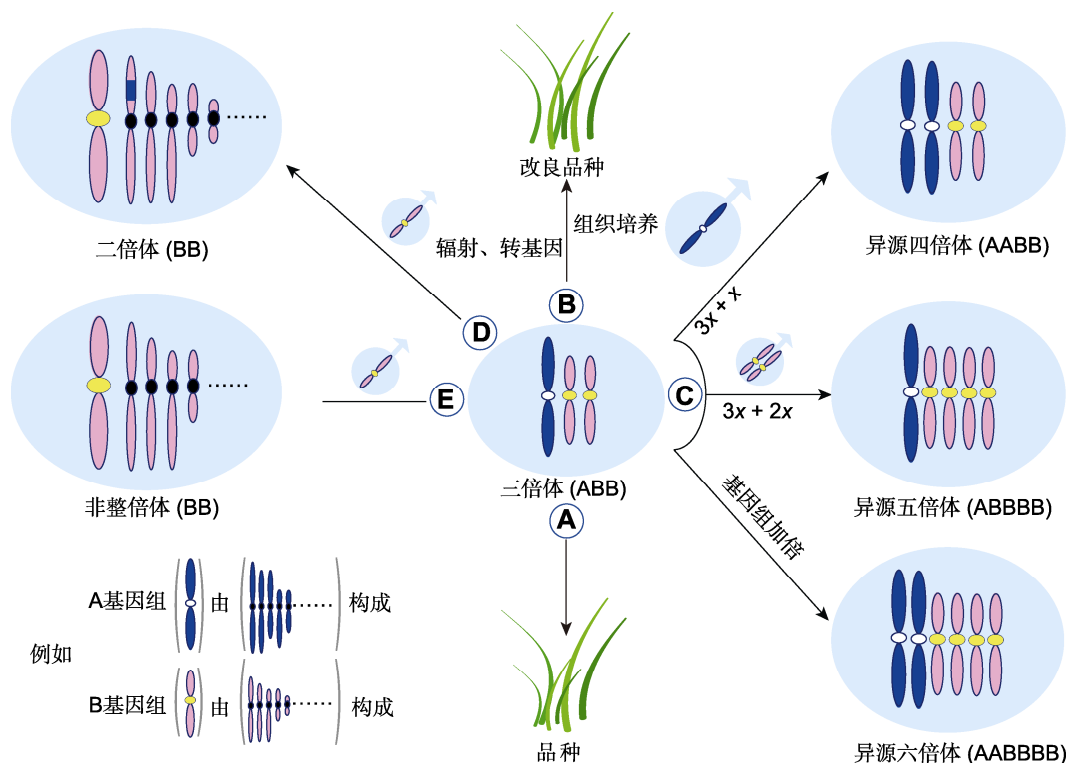


图3 禾本科三倍体的利用

(A) 三倍体作为品种直接利用; (B) 通过辐射、转基因或组织培养等技术改良三倍体品种; (C) 作为通往更高倍性的“三倍体桥”; (D) 转移异源基因; (E) 通过 $3x/2x$ 合成非整倍体

Figure 3 Application of triploid in Poaceae

(A) The direct use of triploid cultivar; (B) The improvement of triploid cultivar through techniques such as radiation, genetic modification, or tissue culture; (C) Use of “triploids bridge” for production of polyploids; (D) Alien genes transfer; (E) Development of aneuploidy by $3x/2x$ mating

射获得优异变异株闽牧6号(陈钟佃等, 2012)。华南1号杂交狼尾草由三倍体杂交狼尾草芽变而来(陈平等, 2004)。三倍体也可以直接作为亲本利用。在偏序钝叶草(*Stenotaphrum secundatum*, $2n=2x=18$)的 $3x/2x$ 杂交后代中经胚拯救选育出抗灰斑病(由稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)引起)和耐旱草坪草新品种(Chandra et al., 2015)。奇岗天然后代群体中16个数量性状出现了丰富的变异(变异系数为14.41%–151.85%), 在后代中筛选出3份材料, 其生物量优于奇岗(潘志军等, 2017)。通过三倍体狼尾草与摩特矮象草杂交选育出中国南方地区广泛种植的三倍体多年生牧草桂牧1号(罗宗志等, 2016)。宁牧26-2狼尾草也是由三倍体后代衍生而来(顾洪如等, 1992)。三倍体转基因品系可通过2种策略获得。(1) 直接以三倍体为受体, 导入目的基因构建转基因品系, 如三倍体狗牙根Tifeagle (Hu et al., 2005)。(2) 对于愈伤组织形成与再分化率低的三倍体, 首先需要寻找愈伤组织再分化优良的二倍体或四倍体作为转基因桥梁, 然后通过基因枪或农杆菌转化等方法导入目的基因, 最后通过倍性间杂交构建转基因三倍体, 如芒($2n=2x=38$) (Wang et al., 2011)。近年来, 基因编辑技术的发展为定向改良三倍体提供了新的育种方案。

三倍体可作为通往其它倍性水平的桥梁, 即三倍体桥(triploid-bridge) (图3C)。在鸭茅三倍体后代中发现了四倍体、五倍体以及混倍体植株(钟声, 2006)。三倍体摩擦禾可产生 $2n$ 雌配子, 通过 $3x/2x$ 合成了四倍体(Kindiger and Dewald, 1994)。以三倍体杂交狼尾草(美洲狼尾草/象草, $2n=3x=21$)的幼穗离体培养获得的胚性愈伤组织为材料, 通过秋水仙碱诱导获得六倍体(钟小仙等, 2014)。利用秋水仙碱处理象草($2n=4x=28$)/珍珠粟(*P. glaucum*, $2n=2x=14$)杂交三倍体幼苗, 体细胞加倍后形成异源六倍体(Campos et al., 2009)。用类似的方法获得*M. × miscanthus*六倍体(Yu et al., 2009; Ghimire et al., 2016)。水稻(AA)和高秆野生稻(*O. alta*, CCDD)杂交形成异源三倍体, 加倍后形成三基异源六倍体(AACCCDD) (祝剑峰等, 2008)。

三倍体可促进物种间的基因交流(图3D)。例如, 水稻(AA)与4个澳洲野生稻(*O. australiensis*, $2n=2x=24$, EE)杂交经胚拯救获得 F_1 , 但 F_1 雄性不育, 其作母本未获得种子; 然而, 以四倍体水稻作母本、澳

洲野生稻作父本获得三倍体(AAE), 随后用水稻作父本授粉该三倍体, 通过与三倍体回交在其后代中发现了抗褐飞虱和白叶枯病的水稻种质(Multani et al., 1994)。合成的三倍体杂交狼尾草与四倍体相比, 基因组的相对损失更少, 更有潜力作为遗传桥梁(Nunes et al., 2013)。特别地, 利用三倍体世代还可提高亲本基因组的稀释效率(党江波等, 2018)。

3.3 非整倍体

三倍体也是通往非整倍体的常用桥梁(图3E)。对三倍体谷子授以二倍体花粉, 在杂交后代中获得全套三体(王润奇等, 1994)。在异源三倍体水稻(AAE)/水稻的杂交后代中, BC_1 染色体数目变幅为28–31, BC_2 染色体数目变幅为24–28, 在 BC_2F_2 中获得8个附加系($2n=20Os+1Oa$) (Multani et al., 1994)。在高粱(Hanna and Schertz, 1971)、粳稻(*O. sativa* subsp. *geng*) (Iwata and Omura, 1975)和籼稻(*O. sativa* subsp. *xian*) (程祝宽等, 1996)等重要禾本科作物中均有通过 $3x/2x$ 构建的全套初级三体。胚乳组织常表现出有丝分裂不规则, 导致染色体桥和落后染色体进而形成非整倍体(Thomas and Chaturvedi, 2008), 如黑麦草胚乳(Norstog et al., 1969)。多花黑麦草 $4x/2x$ 合成的三倍体与二倍体黑麦草杂交, 后代非整倍体占比为70.89% (56/79); 当以三倍体作父本时, 后代整倍体占比高达87.69% (741/845); 差异源于三倍体作父本时整倍体花粉有选择优势而非整倍体花粉失活(Thomas et al., 1988)。随着分子标记和测序技术的发展, 利用非整倍体进行基因定位和构建连锁图谱已无优势。在拟南芥非整倍体自交后代中的整倍体个体, 某些性状的表现与非整倍体母本保持一致(Henry et al., 2010)。Gao等(2016)证实了非整倍化在新生多倍体的基因组演化中具有重要作用, 非整倍体小麦的DNA甲基化水平和模式可以稳定地被整倍体后代继承, 这表明非整倍体可以为育种创造表观遗传变异。

4 结论与展望

目前已知禾本科约有700属, 近10 000种(据中国植物志记载), 包括禾谷类作物(玉米、水稻和小麦等)、饲用作物(黑麦草、鸭茅、高粱和狼尾草等)、能源植物(芒、芦竹(*Arundo donax*)和柳枝稷(*Panicum virgatum*)等)和观赏类植物(草坪草和芒等)等具有世界

意义的禾草。除禾谷类作物外,其余禾草类型的三倍体育种均有成功范例。以营养体为利用目标的禾本科作物,均可直接尝试选育三倍体类型,这也是当前合成三倍体最有价值的育种应用。以籽粒为利用目标的禾谷类作物,三倍体可作为遗传桥梁。不育三倍体是转基因的理想载体,可减少或消除非乡土作物在当地的种子和基因扩散,有效预防非乡土植物的生物入侵。因此,三倍体禾本科植物在未来的营养体农业、生态保护和转基因作物中将持续发挥重要作用。在禾本科三倍体的合成与育种利用中,若干问题值得探究。

4.1 多倍体的三倍体育种

由低倍性二倍体到三倍体的成功是否可以在多倍体到三倍体重现?例如,在柳枝稷($2n=4x=36$) (Costich et al., 2010)和芦苇(*Phragmites communis*, $2n=4x=48$, $2n=8x=96$) (张茜等, 2020)中四倍体和八倍体占据主导地位。若经花药培养(或孤雌生殖)获得二倍体,继而与四倍体杂交获得三倍体,人工合成三倍体是否比四倍体、八倍体更具应用价值?

4.2 无融合生殖三倍体育种

以从水稻双胚苗中筛选获得的特异同源三倍体SAR-3作母本与二倍体杂交,在 F_1 中得到一定比例的二倍体,其中一定比例的植株可能通过无融合生殖保持性状的稳定(张静等, 2002)。Wang等(2019)利用CRISPR-Cas9在粳粳杂交稻中同时敲除*PAIR1*、*REC8*、*OSD1*和*MTL*四个内源基因,获得可无融合生殖的克隆 F_1 种子(发生率为0.19%–0.41%),固定了杂种优势,但克隆种子结实率(6.2%)比野生型(81.9%)大幅降低。此前已有报道,具有无融合生殖特性的三倍体摩擦禾其种子结实率为53%–71% (Dewald et al., 1992),三倍体摩擦禾品种Verl的种子结实率和产量分别为68%和178 kg·hm⁻² (Springer et al., 2006)。因此,研究禾谷类作物三倍体无融合生殖育种以克服在二倍体中有性生殖和无融合生殖共存的弊端,尝试利用禾本科三倍体优异的营养体基础生产克隆种子具有理论价值和实际意义。

4.3 多精受精与胚乳培养

若3个亲本的基因型分别为AA (母本)、BB和CC,通过多精受精可合成同源三倍体(AAA)、二亲三倍体

(AAB、ABB、AAC和ACC)和三亲三倍体(ABC);通过胚乳培养可获得同源三倍体(AAA)和二亲三倍体(AAB和AAC)。倍性间杂交由于多倍体减数分裂异常,构建上述亚基因组完整的三倍体非常困难。此领域尚存诸多问题值得探究。例如,对于某些远缘杂交困难的物种,通过构建类似于水稻的体外受精系统(Toda et al., 2016),利用多精受精依次融合近缘物种和远缘物种的基因组,能否实现遗传距离较远基因组的渐进融合?与组织培养类似,胚乳培养所需的胚乳发育状态、光、温度、pH值、激素种类和浓度在各物种间往往不同,一种一策增加了胚乳培养难度。甚至在同一物种不同基因型间胚乳培养的条件也可能大相径庭,寻找超级基因提升胚乳培养的成功率是否可行?胚乳培养是否具有母本效应或剂量效应(AAB vs BBA)?先前聚焦胚乳愈伤组织的再生,对胚乳衍生植株的田间表现关注较少,胚乳培养可否培育出生产中直接可用的三倍体?

4.4 三倍体的高通量检测

鉴于 $2n$ 配子的稀有特性,在 $2n$ 配子形成三倍体途径中高频 $2n$ 配子超级种质的筛选、遗传群体中与 $2n$ 配子诱导有关基因的鉴定与分离、遗传与环境互作对 $2n$ 配子产生的相对贡献等均需要进行大量的倍性鉴定。对极其稀有精多精受精事件的检测和利用,更需要简便、快速的鉴定方法。在倍性间杂交事件中多倍体产生的不确定倍性配子以及在胚乳培养中胚乳组织经常表现出高度的染色体变异特性,使得形成的三倍体真实性存疑。因此,人工构建基因工程工具、寻找对基因组剂量敏感的形态学标记和FCM等高通量检测方法的进步将是三倍体研究能否实现突破的关键。

致谢 感谢上海杨艺园林集团有限公司镇莉霞绘制图片。

参考文献

- 陈平, 吴秀峰, 席嘉宾, 梁红 (2004). 华南1号杂交狼尾草选育初报. 仲恺农业技术学院学报 17, 56–59.
- 陈钟佃, 黄勤楼, 黄秀声, 冯德庆, 钟珍梅 (2012). “闽牧6号”狼尾草的选育及田间种植技术. 家畜生态学报 33, 53–55.
- 程祝宽, 李欣, 于恒秀, 顾铭洪 (1996). 一套新的籼稻初级三

- 体的选育和细胞学鉴定. 遗传学报 **23**, 363–371.
- 党江波, 宋琴, 李彩, 郭启高, 梁国鲁 (2018). 园艺植物中三倍体的应用现状及育种前景分析. 园艺学报 **45**, 1813–1830.
- 顾洪如, 杨运生, 白淑娟, 陈礼伟 (1992). 牧草新品种“宁牧26-2”狼尾草. 江苏农业科学 (4), 61–63.
- 黄群策, 孙敬三 (1999). 通过异倍性水稻间杂交获得同源三倍体植株. 植物学报 **41**, 741–746.
- 刘国道, 白昌军, 王东劲, 易克贤, 韦家少, 何华玄, 周家锁 (2002). 热研4号王草选育. 草地学报 **10**, 92–96.
- 刘秀明, 崔腾腾, 葛春霞, 陈翠霞 (2014). 我国野生芒资源的细胞学研究. 草业科学 **31**, 627–631.
- 罗宗志, 林洁荣, 罗虹建, 林志魁, 陈碧成 (2016). 杂交狼尾草和桂牧1号杂交象草的核型分析. 贵州农业科学 **44**, 8–12.
- 吕桂华, 唐祈林, 郭国锦, 陈坚剑, 荣廷昭 (2015). 玉米(*Zea mays*)×四倍体多年生玉米(*Zea perennis*)可育三倍体形态学和细胞遗传学研究. 植物遗传资源学报 **16**, 1152–1156.
- 潘志军, 易自力, 杨塞, 肖亮 (2017). 三倍体芒草自然杂交后代数量性状遗传多样性研究. 植物遗传资源学报 **18**, 984–990.
- 任勇, 陈柔屹, 唐祈林, 荣廷昭 (2007). 新型饲草玉米生长动态及收割期的研究. 作物学报 **33**, 1360–1365.
- 孙福艾 (2017). 一份薏苡多倍体材料的创制、鉴定及饲用价值初步评价. 硕士论文. 雅安: 四川农业大学. pp. 1–54.
- 孙敬三, 朱至清 (1981). 大麦胚乳植株的诱导及其倍性. 植物学报 **23**, 262–265.
- 田立忠, 徐爱菊 (2000). 高粱(*Sorghum bicolor* (L.) Moench)未成熟胚乳培养的研究. 辽宁师范大学学报(自然科学版) **23**, 395–402.
- 王敬驹, 陆文梁, 匡柏健 (1982). 小黑麦杂种胚乳的离体培养研究. 植物学报 **24**, 420–425.
- 王润奇, 高俊华, 王志兴, 王志民 (1994). 谷子三体系系的建立. 植物学报 **36**, 690–695.
- 汪艳, 肖媛, 刘伟, 李婷婷, 胡锐, 乔志仙 (2015). 流式细胞仪检测高等植物细胞核DNA含量的方法. 植物科学学报 **33**, 126–131.
- 许蕾, 陈佩琳, 冯光燕, 钟旻依, 景婷婷, 黄琳凯, 张新全 (2019). 利用流式细胞仪鉴定鸭茅倍性. 草业学报 **28**, 74–84.
- 于卓, 云锦凤, 马有志, 辛志勇 (2004). 加拿大披碱草×野大麦三倍体杂种染色体的分子原位杂交鉴定. 遗传学报 **31**, 735–739.
- 袁金玲, 顾小平, 岳晋军, 吴晓丽 (2015). 一种毛竹胚乳培养的方法. 中国专利, ZL 201510566151.8. 2015-09-08.
- 张静, 吴先军, 汪旭东, 周开达, 彭海 (2002). 特异同源三倍体水稻材料SAR-3细胞学研究. 作物学报 **28**, 704–708.
- 张茜, 袁天航, 王安安, 周华健, 袁敏, 李利, 白素兰, 崔素霞 (2020). 北京地区芦苇资源状态及其多样性. 植物学报 **55**, 693–704.
- 张智奇, 钟维瑾, 唐克轩, 周音, 祝明福 (1994). 异源三倍体水稻原生质体培养及植株再生. 作物学报 **20**, 578–581.
- 赵世绪, 刘瑞凝, 敖光明, 陈一心 (1984). 小麦、黑麦未成熟胚乳植株的诱导. 北京农业大学学报 **10**, 129–132.
- 钟声 (2006). 鸭茅不同倍性杂交及后代发育特性的初步研究. 西南农业学报 **19**, 1034–1038.
- 钟小仙, 刘智微, 刘伟国, 崔莉莉, 吴娟子, 张建丽 (2014). 六倍体杂交狼尾草体细胞突变体特异性分析. 草业学报 **23**, 107–113.
- 祝剑峰, 刘幼琪, 王爱云, 宋兆建, 陈冬玲, 蔡得田 (2008). 异源六倍体水稻AACCCDD和三倍体水稻ACD生殖特性的细胞胚胎学研究. 植物遗传资源学报 **9**, 350–357.
- Bajaj YPS, Saini SS, Bidani M (1980). Production of triploid plants from the immature and mature endosperm cultures of rice. *Theor Appl Genet* **58**, 17–18.
- Bastiaanssen HJM, Van Den Berg PMMM, Lindhout P, Jacobsen E, Ramanna MS (1998). Postmeiotic restitution in 2n-egg formation of diploid potato. *Heredity* **81**, 20–27.
- Beale KM, Leydon AR, Johnson MA (2012). Gamete fusion is required to block multiple pollen tubes from entering an *Arabidopsis* ovule. *Curr Biol* **22**, 1090–1094.
- Boller B, Kopeck D (2020). Triploid forage grass hybrids *Festuca apennina* × *F. pratensis* display extraordinary heterosis for yield characteristics. *Euphytica* **216**, 143.
- Bretagnolle FO (2001). Pollen production and spontaneous polyploidization in diploid populations of *Anthoxanthum alpinum*. *Biol J Linn Soc* **72**, 241–247.
- Brownfield L, Köhler C (2011). Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. *J Exp Bot* **62**, 1659–1668.
- Campos JMS, Davide LC, Salgado CC, Santos FC, Costa PN, Silva PS, Alves CCS, Viccini LF, Pereira AV (2009). *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. *Plant Breed* **128**, 101–104.
- Chandra A, Genovesi AD, Wherley BG, Metz SP, Reinert JA, Wu YZ, Skulkaew P, Engelke MC, Hargey D, Nel-

- son LR, Schwartz BM, Raymer PL, Wu YQ, Martin DL, Milla-Lewis SR, Miller G, Kenworthy KE, Munoz P (2015). Registration of 'DALSA 0605' St. Augustinegrass. *J Plant Regist* **9**, 27–34.
- Chen C, Sleper DA, Chao S, Johal GS, West CP (1997). RFLP detection of $2n$ pollen formation by first and second division restitution in perennial ryegrass. *Crop Sci* **37**, 76–80.
- Costich DE, Friebe B, Sheehan MJ, Casler MD, Buckler ES (2010). Genome-size variation in switchgrass (*Panicum virgatum*): flow cytometry and cytology reveal rampant aneuploidy. *Plant Genome* **3**, 130–141.
- De Storme N, Zamariola L, Mau M, Sharbel TF, Geelen D (2013). Volume-based pollen size analysis: an advanced method to assess somatic and gametophytic ploidy in flowering plants. *Plant Reprod* **26**, 65–81.
- Delomas TA (2019). Differentiating diploid and triploid individuals using single nucleotide polymorphisms genotyped by amplicon sequencing. *Mol Ecol Resour* **19**, 1545–1551.
- Dewald CL, Taliaferro CM, Dunfield PC (1992). Registration of four fertile triploid germplasm lines of eastern gamagrass. *Crop Sci* **32**, 504.
- Duan QH, Liu MCJ, Kita D, Jordan SS, Yeh FLJ, Yvon R, Carpenter H, Federico AN, Garcia-Valencia LE, Eyles SJ, Wang CS, Wu HM, Cheung AY (2020). FERONIA controls pectin- and nitric oxide-mediated male-female interaction. *Nature* **579**, 561–566.
- Dvorak J, Harvey BL, Coulman BE (1973). The use of nitrous oxide for producing eupolyploids and aneuploids in wheat and barley. *Can J Genet Cytol* **15**, 205–214.
- Erichsen AW, Ross JG (1963). A triploid derived from a selfed haploid *Sorghum* plant. *Crop Sci* **3**, 99–100.
- Falisticco E, Tosti N, Falcinelli M (1995). Cytomixis in pollen mother cells of diploid *Dactylis*, one of the origins of $2n$ gametes. *J Hered* **86**, 448–453.
- Filho RAB, Santos ACC, Souza FHD, Valls JFM, Pagliarini MS (2014). Complete asynapsis resulting in $2n$ pollen formation in *Paspalum jesuiticum* Parodi (Poaceae). *Genet Mol Res* **13**, 255–261.
- Gao LH, Diarso M, Zhang A, Zhang HK, Dong YZ, Liu LX, Lv ZL, Liu B (2016). Heritable alteration of DNA methylation induced by whole-chromosome aneuploidy in wheat. *New Phytol* **209**, 364–375.
- Ghimire BK, Seong ES, Nguyen TX, Yoo JH, Yu CY, Kim SH, Chung I (2016). Assessment of morphological and phytochemical attributes in triploid and hexaploid plants of the bioenergy crop *Miscanthus* \times *giganteus*. *Ind Crop Prod* **89**, 231–243.
- Hagerup O (1947). The spontaneous formation of haploid, polyploid, and aneuploid embryos in some orchids. *Biol Meddel Kongol Danske Vidensk Selsk* **20**, 1–22.
- Hanna WW, Schertz KF (1971). Trisome identification in *Sorghum bicolor* (L.) Moench by observing progeny of triploid \times translocation stocks. *Can J Genet Cytol* **13**, 105–109.
- Harlan JR, DeWet JMJ (1975). On Ö. Winge and a prayer: the origins of polyploidy. *Bot Rev* **41**, 361–390.
- Henry IM, Dilkes BP, Miller ES, Burkart-Waco D, Comai L (2010). Phenotypic consequences of aneuploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **186**, 1231–1245.
- Hoshino Y, Miyashita T, Thomas TD (2011). *In vitro* culture of endosperm and its application in plant breeding: approaches to polyploidy breeding. *Sci Hortic* **130**, 1–8.
- Hu FR, Zhang L, Wang XY, Ding J, Wu DX (2005). Agrobacterium-mediated transformed transgenic triploid bermudagrass (*Cynodon dactylon* \times *C. transvaalensis*) plants are highly resistant to the glufosinate herbicide liberty. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **83**, 13–19.
- Iqbal MZ, Cheng MJ, Zhao YL, Wen XD, Zhang P, Zhang L, Ali A, Rong TZ, Tang QL (2018). Mysterious meiotic behavior of autopolyploid and allopolyploid maize. *Comp Cytogenet* **12**, 247–265.
- Iwata N, Omura T (1975). Studies on the trisomics in rice plants (*Oryza sativa* L.): III. Relation between trisomics and genetic linkage groups. *Jpn J Breed* **25**, 363–368.
- Jansen RC, Den Nijs APM (1993). A statistical mixture model for estimating the proportion of unreduced pollen grains in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) via the size of pollen grains. *Euphytica* **70**, 205–215.
- Johansen B, Von Bothmer R (1994). Pollen size in *Hordeum* L.: correlation between size, ploidy level, and breeding system. *Sex Plant Reprod* **7**, 259–263.
- Johri BM, Bhojwani SS (1965). Growth responses of mature endosperm in cultures. *Nature* **208**, 1345–1347.
- Kamps TL, Williams NR, Ortega VM, Chamusco KC, Harris-Shultz K, Scully BT, Chase CD (2011). DNA polymorphisms at bermudagrass microsatellite loci and their use in genotype fingerprinting. *Crop Sci* **51**, 1122–1131.
- Kapadia ZJ, Gould FW (1964). Biosystematic studies in the *Bouteloua curtipendula* complex. III. Pollen size as related to chromosome numbers. *Am J Bot* **51**, 166–172.
- Kato A (1999). Induction of bicellular pollen by trifluralin treatment and occurrence of triploids and aneuploids after fertilization in maize. *Genome* **42**, 154–157.

- Kato A, Birchler JA (2006). Induction of tetraploid derivatives of maize inbred lines by nitrous oxide gas treatment. *J Hered* **97**, 39–44.
- Katsiotis A, Forsberg RA (1995). Pollen grain size in four ploidy levels of genus *Avena*. *Euphytica* **83**, 103–108.
- Keller B, Feuillet C (2000). Colinearity and gene density in grass genomes. *Trends Plant Sci* **5**, 246–251.
- Kindiger B, Dewald C (1994). Genome accumulation in eastern gamagrass, *Tripsacum dactyloides* (L.) L. (Poaceae). *Genetica* **92**, 197–201.
- King IP, Morgan WG, Harper JA, Thomas HM (1999). Introgression mapping in the grasses. II. Meiotic analysis of the *Lolium perenne*/*Festuca pratensis* triploid hybrid. *Heredity* **82**, 107–112.
- Kirov I, Divashuk M, Van Laere K, Soloviev A, Khrustaleva L (2014). An easy "SteamDrop" method for high quality plant chromosome preparation. *Mol Cytogenet* **7**, 21.
- Krans JV, Philley HW, Goatley JM Jr, Maddox VL (1999). Registration of 'MS-Supreme' bermudagrass. *Crop Sci* **39**, 287.
- Kreiner JM, Kron P, Husband BC (2017). Frequency and maintenance of unreduced gametes in natural plant populations: associations with reproductive mode, life history and genome size. *New Phytol* **214**, 879–889.
- Kron P, Husband BC (2015). Distinguishing 2N gamete nuclei from doublets in pollen using flow cytometry and pulse analysis. *Cytometry Part A* **87**, 943–957.
- La Rue CD (1949). Cultures of the endosperm of maize. *Am J Bot* **36**, 798.
- Lamote V, Baert J, Roldán-Ruiz I, De Loose M, Van Bockstaele E (2002). Tracing of 2n egg occurrence in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) using interploidy crosses. *Euphytica* **123**, 159–164.
- Lim KB, Ramanna MS, De Jong JH, Jacobsen E, Van Tuyl JM (2001). Indeterminate meiotic restitution (IMR): a novel type of meiotic nuclear restitution mechanism detected in interspecific lily hybrids by GISH. *Theor Appl Genet* **103**, 219–230.
- Loginova DB, Silkova OG (2017). Mechanisms of unreduced gamete formation in flowering plants. *Russ J Genet* **53**, 741–756.
- Lu SY, Peng XX, Guo ZF, Zhang GY, Wang ZC, Wang CY, Pang CS, Fan Z, Wang JH (2007). *In vitro* selection of salinity tolerant variants from triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* × *C. dactylon*) and their physiological responses to salt and drought stress. *Plant Cell Rep* **26**, 1413–1420.
- Maceira NO, De Haan AA, Lumaret R, Billon M, Delay J (1992). Production of 2n gametes in diploid subspecies of *Dactylis glomerata* L. 1. Occurrence and frequency of 2n pollen. *Ann Bot* **69**, 335–343.
- Mason AS, Nelson MN, Yan GJ, Cowling WA (2011). Production of viable male unreduced gametes in *Brassica* interspecific hybrids is genotype specific and stimulated by cold temperatures. *BMC Plant Biol* **11**, 103.
- Multani DS, Jena KK, Brar DS, De Los Reyes BG, Angeles ER, Khush GS (1994). Development of monosomic alien addition lines and introgression of genes from *Oryza australiensis* Domin. to cultivated rice *O. sativa* L. *Theor Appl Genet* **88**, 102–109.
- Mutlu SS, Mutlu N, Tokgöz S, Çakır M, Selim C (2020). Development of vegetative triploid turf-type bermudagrass [*Cynodon dactylon* × *C. transvaalensis* (*C. × mangennisii* Hurcombe)]. *Genet Resour Crop Evol* **67**, 177–189.
- Naganowska B, Zwierzykowski Z, Zwierzykowska E (2001). Meiosis and fertility of reciprocal triploid hybrids of *Lolium multiflorum* with *Festuca pratensis*. *J Appl Genet* **42**, 247–255.
- Nakano H, Tashiro T, Maeda E (1975). Plant differentiation in callus tissue induced from immature endosperm of *Oryza sativa* L. *Z Pflanzenphysiol* **76**, 444–449.
- Nakel T, Tekleyohans DG, Mao YB, Fuchert G, Vo D, Groß-Hardt R (2017). Triparental plants provide direct evidence for polyspermy induced polyploidy. *Nat Commun* **8**, 1033.
- Norstog K, Wall WE, Howland GP (1969). Cytological characteristics of ten-year-old rye-grass endosperm tissue cultures. *Bot Gaz* **130**, 83–86.
- Norstog KJ (1956). Growth of rye-grass endosperm *in vitro*. *Bot Gaz* **117**, 253–259.
- Nunes JD, Azevedo ALS, Pereira AV, Paula CMP, Campos JMS, Léo FJS, Santos VB (2013). DNA elimination in embryogenic development of *Pennisetum glaucum* × *Pennisetum purpureum* (Poaceae) hybrids. *Genet Mol Res* **12**, 4817–4826.
- Pagliarini MS, Valle CB, Santos EM, Mendes DV, Bernardo ZH, Mendes-Bonato AB, Silva N, Calisto V (2012). Microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Poaceae) as a selection tool for breeding. *Genet Mol Res* **11**, 1309–1318.
- Pécirix Y, Rallo G, Folzer H, Cigna M, Gudin S, Le Bris M (2011). Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp.

- J Exp Bot* **62**, 3587–3597.
- Pepin GW, Funk CR** (1971). Intraspecific hybridization as a method of breeding Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) for turf. *Crop Sci* **11**, 445–448.
- Perera D, Barnes DJ, Baldwin BS, Reichert NA** (2015). Direct and indirect *in vitro* regeneration of *Miscanthus × giganteus* cultivar freedom: effects of explant type and medium on regeneration efficiency. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **51**, 294–302.
- Ramsey J, Schemske DW** (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu Rev Ecol Syst* **29**, 467–501.
- Rhoades MM** (1936). Note on the origin of triploidy in maize. *J Genet* **33**, 355–357.
- Sandfaer J** (1975). The occurrence of spontaneous triploids in different barley varieties. *Hereditas* **80**, 149–153.
- Schwartz BM, Harris-Shultz KR, Contreras RN, Hans CS, Hanna WW, Milla-Lewis SR** (2013). Creation of artificial triploid and tetraploid centipedegrass using colchicine and breeding. *Int Turfgrass Soc Res J* **12**, 327–334.
- Sehgal CB** (1974). Growth of barley and wheat endosperm in cultures. *Curr Sci* **43**, 38–40.
- Sheidai M, Jafari S, Taleban P, Keshavarzi M** (2009). Cytomixis and unreduced pollen grain formation in *Alopecurus* L. and *Catbrosa* Beauv. (Poaceae). *Cytologia* **74**, 31–41.
- Sieber VK, Murray BG** (1979). The cytology of the genus *Alopecurus* (Gramineae). *Bot J Linn Soc* **79**, 343–355.
- Springer TL, Dewald CL, Sims PL, Gillen RL, Louthan VH, Cooper WJ, Taliaferro CM, Maura C, Pfaff S, Wynia RL, Douglas JL, Henry J, Bruckerhoff SB, Grinten M, Salon PR, Houck MJ, Esquivel RG** (2006). Registration of 'Verl' eastern gamagrass. *Crop Sci* **46**, 477.
- Straus J, LaRue CD** (1954). Maize endosperm tissue grown *in vitro* I. Culture requirements. *Am J Bot* **41**, 687–694.
- Suarez EY, Lopez AG, Naranjo CA** (1992). Polyspermy versus unreduced male gametes as the origin of nonaploids (9x) common wheat plants. *Caryologia* **45**, 21–28.
- Sun S, Wu Y, Lin XY, Wang J, Yu JM, Sun Y, Miao YL, Li QP, Sanguinet KA, Liu B** (2017). Hybrid weakness in a rice interspecific hybrid is nitrogen-dependent, and accompanied by changes in gene expression at both total transcript level and parental allele partitioning. *PLoS One* **12**, e0172919.
- Tamaoki T, Ullstrup JA** (1958). Cultivation *in vitro* of excised endosperm and meristem tissues of corn. *Bull Torrey Bot Club* **85**, 260–272.
- Tan GY, Dunn GM** (1973). Relationship of stomatal length and frequency and pollen-grain diameter to ploidy level in *Bromus inermis* Leyss. *Crop Sci* **13**, 332–334.
- Thomas H, Morgan WG, Humphreys MW** (1988). The use of a triploid hybrid for introgression in *Lolium* species. *Theor Appl Genet* **76**, 299–304.
- Thomas TD, Chaturvedi R** (2008). Endosperm culture: a novel method for triploid plant production. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **93**, 1–14.
- Toda E, Ohnishi Y, Okamoto T** (2016). Development of polyspermic rice zygotes. *Plant Physiol* **171**, 206–214.
- Toda E, Okamoto T** (2016). Formation of triploid plants via possible polyspermy. *Plant Signal Behav* **11**, e1218107.
- Van Santen E, Hugessen PM, Casler MD** (1991). Identification and frequency of tetraploid progeny from 2x-4x and 4x-2x crosses in *Dactylis*. *Genome* **34**, 273–278.
- Wang C, Liu Q, Shen Y, Hua YF, Wang JJ, Lin JR, Wu MG, Sun TT, Cheng ZK, Mercier R, Wang KJ** (2019). Clonal seeds from hybrid rice by simultaneous genome engineering of meiosis and fertilization genes. *Nat Biotechnol* **37**, 283–286.
- Wang X, Yamada T, Kong FJ, Abe Y, Hoshino Y, Sato H, Takamizo T, Kanazawa A, Yamada T** (2011). Establishment of an efficient *in vitro* culture and particle bombardment-mediated transformation systems in *Miscanthus sinensis* Anderss, a potential bioenergy crop. *GCB Bioenergy* **3**, 322–332.
- Younis A, Hwang YJ, Lim KB** (2014). Exploitation of induced 2n-gametes for plant breeding. *Plant Cell Rep* **33**, 215–223.
- Yu CY, Kim HS, Rayburn AL, Widholm JM, Juvik JA** (2009). Chromosome doubling of the bioenergy crop, *Miscanthus × giganteus*. *GCB Bioenergy* **1**, 404–412.
- Zeng RZ, Zhu J, Xu SY, Du GH, Guo HR, Chen JJ, Zhang SZ, Xie L** (2020). Unreduced male gamete formation in *Cymbidium* and its use for developing sexual polyploid cultivars. *Front Plant Sci* **11**, 558.

Triploid in Poaceae: Formation, Detection, and Utilization

Xu Yan^{1,2}, Yanchun Zuo¹, Honglin Wang¹, Yang Li^{2,3}, Yingzheng Li², Jing Kou¹, Xiaokang Zhou¹
Qilin Tang^{2*}, Zhouhe Du^{1*}

¹Sericulture Research Institute/Animal Husbandry Research Center, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Nanchong 637000, China; ²Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China; ³School of Urban and Rural Planning and Construction, Mianyang Teachers' College, Mianyang 621000, China

Abstract The formation pathway of triploid in Poaceae includes $2n$ gamete fusion, interploidy cross, polyspermy, and endosperm culture. The fusion of reduced male (n) and unreduced female gamete ($2n$) is the main method for forming natural triploids. Interploidy cross is the main method for synthesizing artificial triploids. The application of ploidy identification methods such as morphological observation, chromosome analysis, flow cytometry and molecular markers in gramineous triploids is introduced, and the advantages and disadvantages of different methods are also discussed. At present, triploid has no direct application value in cereal crops, but it can be used as a genetic bridge to synthesize polyploid and aneuploid, as well as to transfer alien genes from wild species to cultivated species. Gramineous triploids (especially allotriploid) are widely cultivated for forage or biofuel production, suggesting that triploidy breeding may be directly performed in this type of grasses. We discuss the future prospect of research on gramineous triploid, e.g., polyploid- and apomixis-triploid breeding. Particularly, endosperm culture can synthesize triploids in one step, and polyspermy can achieve one-step fusion of three genetically different plant genomes, which should be paid attention to in the triploidy research. Due to rare occurrence of $2n$ gamete fusion and polyspermy, and frequent chromosomal variation in ploidy hybridization and endosperm culture, the development of high-throughput triploid identification technology will become the key for breakthrough in triploidy generation/breeding.

Key words triploid, $2n$ gamete, interploidy cross, endosperm culture, polyspermy, breeding program

Yan X, Zuo YC, Wang HL, Li Y, Li YZ, Kou J, Zhou XK, Tang QL, Du ZH (2021). Triploid in Poaceae: formation, detection, and utilization. *Chin Bull Bot* **56**, 372–387.

* Authors for correspondence. E-mail: tangqilin71@163.com; duzhouhe@126.com

(责任编辑: 白羽红)