

# 无融合生殖甜菜 M14 的 GISH 和 BAC-FISH 研究

戈 岩<sup>①</sup> 何光存<sup>②</sup> 王志伟<sup>①</sup> 郭德栋<sup>①</sup> 覃 瑞<sup>③</sup> 李荣田<sup>①\*</sup>

① 黑龙江大学生命科学学院, 哈尔滨 150080; ② 武汉大学生命科学院植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072; ③ 中南民族大学生物技术国家民族事务委员会重点实验室, 武汉 430072)

**摘要** 无融合生殖是指不经减数分裂和受精作用而产生胚的一种无性繁殖, 因此是胚的克隆, 母系繁殖. 甜菜单体附加系 M14 是通过二倍体栽培甜菜(*Beta vulgaris*)和四倍体白花甜菜(*B. corolliflora*)种间杂交、进而回交, 选育出的具有无融合生殖特性的甜菜品系. 我们利用 GISH 技术进一步分析了无融合生殖甜菜 M14 中的染色体情况, 在不封阻的情况下, 附加的外源染色体清晰可见, 这说明栽培甜菜与白花甜菜基因组间种属特异序列的差异明显. 利用无融合生殖甜菜 M14 和有性生殖栽培甜菜的花期 mRNA 对白花甜菜第 9 号染色体的 BAC 芯片进行了差异杂交分析, 发现 2 个 BAC 克隆 16-M11, 26-L15 含有 M14 花期特异表达的基因. 选用这 2 个 BAC 克隆作为探针, 对具有无融合生殖甜菜 M14 进行荧光原位杂交, 供试探针均被定位于附加的白花甜菜第 9 号染色体长臂末端, 呈半合子状态. 本研究 BAC 芯片的杂交结果结合两种生殖途径中胚和胚乳发育表达方式的保守性可推断, 甜菜中有性生殖和无融合生殖可能共享某些调节因子的相关路径, 正是白花甜菜第 9 号染色体上的特异基因才使甜菜 M14 中无融合生殖特性得以表达.

**关键词** 甜菜 无融合生殖 BAC 克隆 双色荧光原位杂交 半合子状态

植物无融合生殖是指不经过减数分裂和精卵融合而以种子进行繁殖的一种特殊的繁殖方式<sup>[1]</sup>. 无融合生殖产生的二倍体子代, 其基因型与母本精确相同, 形成了遗传上稳定, 可由种子繁殖的无性系<sup>[2]</sup>. 根据胚胎发生的起源不同, 可将无融合生殖分为 2 类: 孢子体无融合生殖和配子体无融合生殖<sup>[3]</sup>. 孢子体无融合生殖是由珠心或珠被细胞直接发育成胚<sup>[4]</sup>. 配子体无融合生殖可分为无孢子生殖和二倍体孢子生殖. 无孢子生殖是由珠心体细胞发育成胚囊; 二倍体孢子体生殖是大孢子母细胞减数分裂受阻形成胚囊. 在这两种配子体无融合生殖中, 胚囊形成后, 经孤雌生殖发育成胚.

无融合生殖在作物育种中具有很大的应用前景. 植物无融合生殖是通过种子进行的无性生殖, 所以可以固定有利基因型, 改变育种及杂交种子生产程序, 具有重大的经济意义. 有研究表明, 一些谷物的亲缘野生种具有近乎专性的无融合生殖特性. 科研人员试图通过种间杂交将无融合生殖特性引进玉米<sup>[5,6]</sup>、珍珠粟<sup>[7]</sup>等谷物中. 但是, 迄今为止没有无融合生殖的栽培谷物品种在生产中应用.

甜菜属(*Beta genus*)分为 4 个组: 甜菜组(*Beta section*)、白花甜菜组(*Corollinae section*)、矮生甜菜组(*Nana section*)和匍匐甜菜组(*Procumbent section*). 甜菜育种中, 如栽培甜菜(*B. vulgaris*)和饲料甜菜, 经

常被育种学家当成遗传材料使用,而其他野生种甜菜却很少被利用<sup>[8,9]</sup>. Letschert<sup>[8]</sup>曾报道甜菜属野生种中存在无融合生殖能力,并指出它们属于配子体无融合生殖,包括无孢子生殖和二倍体孢子生殖 2 种无融合生殖类型;栽培甜菜与野生种中具有无融合生殖特性的多倍体杂交,可以产生具有无融合生殖的后代类型.但是,将野生种无融合特性导入栽培甜菜以固定杂种优势尚未成功<sup>[9]</sup>.

白花甜菜(*B. corollinae*)是甜菜属中重要的野生遗传资源,具有抗寒、抗逆、无融合生殖等优异特性,很多学者都想通过栽培甜菜与白花甜菜杂交,转移和利用野生种的优异特性.我们以前曾报道过,通过二倍体栽培甜菜和四倍体白花甜菜种间杂交,获得异源三倍体,进一步用栽培甜菜回交,在其后代中筛选出一套完整的带有白花甜菜染色体的单体附加系,共 9 种类型.通过传递率分析,筛选出高频传递的单体附加系 M14 品系.经过标记基因分析、多年的传递率统计、细胞学鉴定、胚胎学及分子生物学鉴定,证实为非型(*Allium odorum* type)二倍体孢子体的配子体无融合生殖材料<sup>[10-12]</sup>.

我们利用基因组原位杂交(genomic in-situ hybridization, GISH)技术分析了 M14 甜菜中染色体的情况,同时以无融合生殖关键时期特异表达 mRNA 筛选到 2 个 M14 的 BAC 克隆,与 M14 中期染色体进行原位杂交,确定 2 个 BAC 克隆是 M14 甜菜所附加的白花甜菜第 9 号染色体上特异的 BAC 克隆.结果表明,白花甜菜第 9 号染色体单条染色体足以使无融合生殖性状在单体附加系植株 M14 中表达.

## 1 材料与方法

### 1.1 供试植物材料

栽培甜菜、白花甜菜和甜菜单体附加系 M14 均采自黑龙江大学温室.

### 1.2 mRNA 的制备

根据 RNeasy plant mini kit 试剂盒提供的方法,从栽培甜菜和 M14 中提取总 RNA(Qiagen Valencia, CA),然后按照说明书,用 Dynabeads mRNA 纯化试剂盒纯化(Dynal Biotech Hamburg, Germany).

### 1.3 基因芯片分析

基因芯片的构建过程是:碱裂解法提取 BAC

DNA,片段化后经环氧修饰,由 micro Grid II Robotics 机器人(Genetic Robotics)将 BAC 克隆点到预处理的玻片上,用白花甜菜特异的重复序列<sup>[13]</sup>对其进行质量检测.

按照 Fluorescent Direct label kit 说明书,将栽培甜菜和 M14 的 mRNA 反转录成 cDNA 并分别标记上 Cy5, Cy3 (agilent technologies),与 BAC 芯片 42℃ 过夜杂交,在含 0.1% SDS 的 0.1×SSC 中 42℃ 漂洗,信号经 Genepix 4000A 系统检测.

### 1.4 染色体制备

取植株中间新生叶的分生组织(大约距基部 5~10 μm),用 8-羟基喹啉处理 1~2 h,置于卡诺固定液(乙醇:乙酸=3:1)固定 24 h.有丝分裂染色体的制备参考 Desel 等人<sup>[14]</sup>的方法.主要步骤是,将心叶置于新配制的酶缓冲液(4 mmol 柠檬酸/6 mmol 柠檬酸钠, pH 4.8)洗 15 min 后,在含 2% 纤维素酶和 20% 果胶酶的酶解液中酶解 3 h,悬浮液用酶解缓冲液洗 3 次,再用新鲜的卡诺固定液洗 2 次,离心(800×g, 3 min).最后所得沉淀用 100 μL 卡诺固定液悬浮,取适量悬浮液(10~15 μL),以 5 cm 的高度滴到干净的载玻片上.

### 1.5 DNA 探针及探针标记

CTAB 法制备白花甜菜基因组 DNA.参照说明书,用缺口平移法标记上 Digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics, Germany).

用碱裂解法抽提 BAC 克隆质粒,提纯的质粒 DNA 用缺口平移法标记上 Digoxigenin-11-dUTP 或 Biotin-11-dUTP.标记 Biotin-11-dUTP 时,50 μL 反应液,15℃ 下标记 1.5~2 h 后加 5 μL 0.2 mol/L EDTA (pH 8.0)终止反应. Sephanase CL-6B (Sigma) 纯化.用加链亲和辣根过氧化物酶(BRL, Life Technologies)的点印法检测标记.

### 1.6 原位杂交及检测

FISH 参考 Schmidt 和 Desel 等人<sup>[14,15]</sup>提供的程序稍做修改.染色体制片提前用 RNA 酶、蛋白酶及多聚甲醛处理后,在片子上加 30 μL 预变性的杂交液,杂交液含 100~150 μg 标记的探针 DNA, 50% 去离子甲酰胺, 8% 硫酸葡聚糖, 2×SSC, 250 ng/μL 鲑鱼精 DNA, 1 μg cot1 DNA (100~500 bp), cot1 DNA 参见 Yan 等人<sup>[16]</sup>的程序制备. 37℃ 杂交过夜.杂交信号的

荧光检测: 42℃ 2×SSC 漂洗 5 min, 依次加入 10 μg/mL FITC-Aridin(Sigma), 5 μg/mL Anti-Avidin (Sigma), 10 μg/mL FITC-Avidin 37℃ 各 30 min; 100 μg/μL DAPI 复染. Olympos BX51 型显微镜观察并拍照.

## 2 实验结果

### 2.1 甜菜无融合生殖材料 M14 的选育

图 1 显示了无融合生殖特性由白花甜菜传递给栽培甜菜的情况. 利用我们自己培育的非整倍体的初级三体 PT6(VV+1, 2n=19) 为母本, 与四倍体白花甜菜(CCCC, 2n=36) 为父本进行杂交, 获得真实杂种 VC88-1(VVCC, 2n=36), 利用栽培甜菜进行回交, 产生具无融合特性的异源三倍体, 再继续回交. 通过多年的远缘杂交实验, 在其后代中筛选到一套完整的带有白花甜菜染色体的单体附加系(monosomic addition lines VV+1C), 其中附加白花甜菜第 9 号染色体的 M14 植株具有高频传递特性, 经过 4 代传递分析, 具有近 100% 的高频传递率, 经过标记基因分析、多年的传递率统计、细胞学鉴定、胚胎学及分子生物学鉴定, 证明 M14 为非型二倍体孢子体生殖材料<sup>[10-12]</sup>.

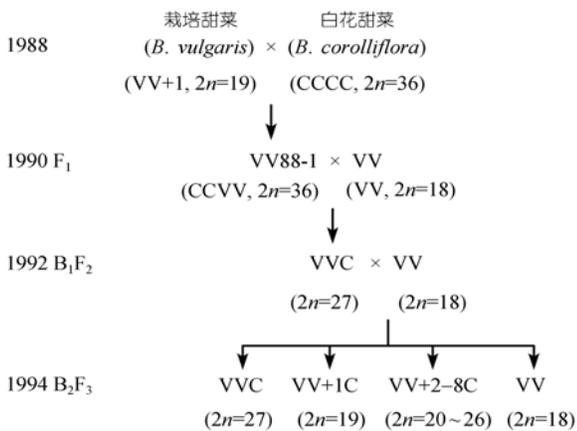


图 1 甜菜单体附加系获得过程示意图

### 2.2 无融合生殖材料 M14 的 GISH 分析

地高辛标记的野生白花甜菜基因组 DNA 做探针, 在没有栽培甜菜基因组 DNA 做封阻的条件下, 与无融合生殖甜菜 M14 的中期染色体进行原位杂交. 结果如图 2 所示, 绿色的 FITC 荧光和蓝色的 DAPI 荧光对比复合后, 凡是与地高辛标记探针杂交的染色体显示绿色荧光, 而未与探针杂交的染色体经 DAPI 对比染色应显示蓝色. M14 中 19 条染色体, 有 18 条

出现蓝色信号, 只有 1 条染色体出现绿色荧光信号. 可以推断, 呈蓝色荧光信号的染色体来源于栽培甜菜, 呈绿色荧光信号的 1 条染色体则来源于白花甜菜. GISH 结果清楚显示, 通过远缘杂交野生白花甜菜的 1 条染色体已导入栽培甜菜中, 它的出现使得单体附加系 M14 表现出无融合生殖的特性.

通过 GISH 信号分析, M14 中 18 条栽培甜菜染色体和 1 条白花甜菜染色体可以直接进行比较. 与标记的白花甜菜基因组 DNA 杂交后, 来源于白花甜菜 1 条染色体呈很强的绿色荧光信号, 且信号的强度较均一(图 2), 说明这条染色体上散在分布着白花甜菜基因组的特异序列, 主要是一些重复序列, 这与 Gao 等人<sup>[13]</sup>的结论相一致, 他们分离到的重复序列散在分布整个白花甜菜基因组中.

在没有栽培甜菜基因组 DNA 封阻的情况下, 并无大量的信号交叉, 附加的白花甜菜染色体杂交后清晰可见(图 2(b), 绿色荧光), 这暗示着白花甜菜与栽培甜菜基因组中含有许多各自种属特异性的 DNA, 这是基因组杂交阳性信号得以显现的基础. 我们的结果也间接证明了白花甜菜与栽培甜菜种间差异性较大.

除 1 条染色体被“喷涂”上绿色, 其他染色体上也出现微弱的杂交信号, 其中 1 对染色体的端部出现明显绿色信号. 这种交叉杂交信号说明栽培甜菜与白花甜菜种间存在同源序列, 端部分布较多.

### 2.3 利用 BAC 芯片筛选携带花期差异表达基因的 BAC 克隆

花期是无融合生殖表达的关键时期. 分别用 CY3 和 CY5 标记无融合生殖甜菜 M14 和栽培甜菜花期的 mRNA, 与白花甜菜第 9 号染色体 BAC 克隆芯片杂交. 激发光下, 与标记 CY3 的 M14 的 mRNA 杂交的 BAC 位点显绿色, 而与标记 CY5 的栽培甜菜的 mRNA 杂交的 BAC 位点显红色, 二者均能杂交的显黄色. 如图 3 所示, 大多数 BAC 位点呈现不同程度的黄色信号, 含有此时期两物种共表达基因. 极个别位点呈现红色, 可能含有栽培甜菜在该时期的差异表达基因. 其中 BAC 26-L15 和 BAC 16-M11 在重复实验中均呈现绿色(图 3, 箭头), 且该点用激发光扫描无红色信号, 可能为 M14 特异表达区段, BAC 克隆 26-L15 和 16-M11 携带有无融合生殖花期差异表达基因.

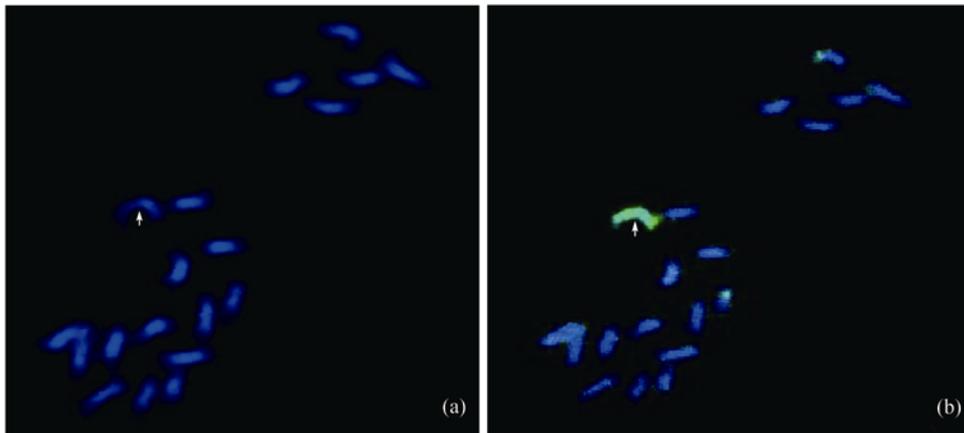


图 2 单体附加系 M14 的 GISH 检测结果

(a) 单体附加系 M14 品系 ( $2n=18+1=19$ ) 的染色体 DAPI 复染结果; (b) 白花甜菜基因组 DNA 与 M14 附加的外源染色体杂交 (箭头), 栽培甜菜染色体上分布着微弱的交叉杂交信号

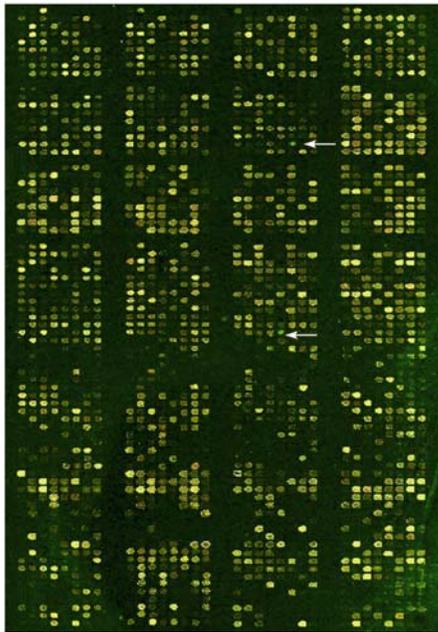


图 3 栽培甜菜及无融合生殖甜菜 M14 花期的 mRNA 探针与白花甜菜第 9 号染色体 BAC 芯片杂交结果  
箭头所指的 2 个绿色信号为 M14 花期特异表达基因所在的 BAC 克隆 26-L15 和 16-M11

#### 2.4 双色 FISH 确定供试 BAC 克隆在 M14 染色体上的位置

根据单色 FISH 的研究结果, BAC 克隆 26-L15 和 16-M11 所位于的无融合植株 M14 的染色体在形态学上极为相似(图 4(a), (b)). 初步认为, 这两个 BAC 克隆可能位于 M14 的同一条染色体上. 为了证实这一结论, 利用双色荧光原位杂交技术, 在 M14 有丝分裂

中期染色体上进行 BAC 克隆的定位. 用地高辛标记 BAC 克隆 26-L15(绿色), 用生物素标记 BAC 克隆 16-M11(红色), 以此为探针在 M14 有丝分裂中期染色体上进行双色荧光原位杂交. 从图 4(c)中可以看出, 红色信号、绿色信号位于一条染色体上, 两个信号在染色体上的位置很近, 且部分融合呈黄色. 比较双色荧光原位杂交信号在染色体上的位置, 与单色荧光原位杂交的结果基本一致. 绿色信号 BAC 克隆 26-L15 出现双信号点(图 4(e)), 红色信号 BAC 克隆 16-M11 也出现双信号点(图 4(d)).

图 4(c)显示, M14 中 BAC 克隆 26-L15 和 16-M11 都被定位于一条染色体的远末端, 其他染色体上无杂交信号, 而且在 BAC 克隆的 FISH 中检测到姊妹染色单体同时出现信号的双点(图 4(c)~(e)). M14 间期核只出现 1 个融合的信号点(图 4(g)). 即使没有直接测定, 似乎也可以证明信号出现的染色体不应是栽培甜菜染色体, 因为栽培甜菜属于同源二倍体, 如果信号位于栽培甜菜染色体的话, 应同时有 1 对同源染色体上出现信号.

供试 BAC 克隆的杂交信号仅仅集中在 M14 一条染色体上一个特定位点, 这意味着 BAC 克隆中包含的单拷贝或低拷贝序列在白花甜菜、栽培甜菜分歧进化过程中仍连在一起, 是同线的. 分别标记 2 个 BAC 的 FITC 和 CY3 信号融合时, 会检测到 1 个黄色信号(图 4(c), (g)), 在 M14 高度浓缩的中期染色体上, 杂交信号在一条染色体上没有分离(图 4(c)), 说明 2 个 BAC 间可能存在部分同源序列.

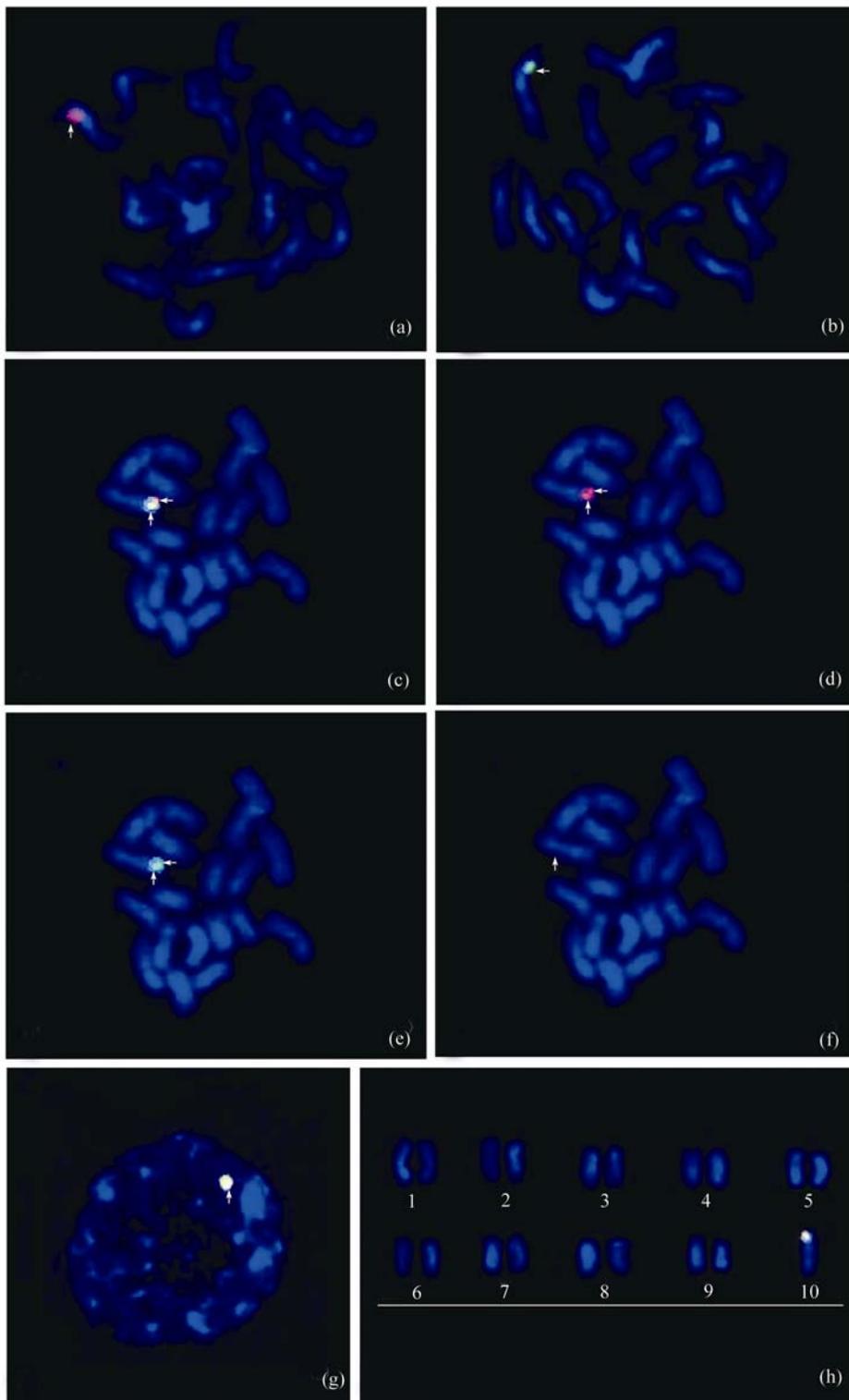


图 4 单体附加系 M14 花期特异表达的 BAC 克隆在 M14 中的 FISH 定位

(a)~(g)为 BAC 克隆 16-M11, 26-L15 在 M14 中的 BAC-FISH 结果, BAC 克隆 26-L15 标记地高辛, 由连有抗体的 FITC 检测(绿色信号), BAC 克隆 16-M11 标记生物素, 由连有抗体的 CY3 检测(红色信号), DAPI 复染(蓝色信号). (a) BAC 克隆 16-M11 在单体附加系 M14 中期染色体上检测到红色信号(箭头所指); (b) BAC 克隆 26-L15 在单体附加系 M14 中期染色体上检测到绿色信号(箭头所指); (c) BAC 克隆 16-M11, 26-L15 与 M14 进行双色 BAC-FISH, 信号融合成黄色; (d) BAC 克隆 16-M11 在 M14 中期染色体上检测到信号为双点; (e) BAC 克隆 26-L15 在 M14 中期染色体上检测到信号为双点; (f) M14 染色体经 DAPI 复染成蓝色; (g) BAC 克隆 16-M11, 26-L15 在 M14 间期核上进行双色 BAC-FISH 检测到 1 个黄色的信号融合点; (h) M14 染色体的核型排列

每个 BAC 克隆中插入的 DNA 片段较长, 从而决定了利用它做探针不仅仅是对单个基因, 而且是对多个基因或标记的物理作图. 因此, 其结果还可以用于检测多个标记的同线性和它们分布区域的保守特点. 在我们的研究中, BAC 克隆 26-L15 和 16-M11 只在第 9 号染色体长臂端部检测到信号, 说明这 2 个供试 BAC 克隆所含的基因或标记在 M14 第 9 号染色体上的分布同线且同区(表 1).

## 2.5 荧光原位杂交信号检出染色体的核型分析

以往的研究显示, 白花甜菜染色体比栽培甜菜染色体长些, 但是白花甜菜最短染色体比栽培甜菜中最长染色体略短一些<sup>[10]</sup>. 用附加系栽培甜菜最长染色体与附加的白花甜菜最短染色体相比较, 构成参考比例. 核型分析结果证明 M14 带有白花甜菜最短染色体, 与栽培甜菜中最长染色体的比值为 0.96<sup>[10]</sup>.

通过 GISH 结果, 18 条栽培甜菜染色体和 1 条白花甜菜染色体在 M14 植株中可以直接比较. 附加的 1 条白花甜菜染色体与 18 条栽培甜菜染色体中最长染色体的比值为 0.96 (表 1), 附加的白花甜菜染色体明显比一般栽培甜菜染色体要长一些, 但是略短于最长的栽培甜菜染色体. 进一步对 M14 的染色体做核型分析, 排列(图 4(h)), 发现杂交信号位于该染色体长臂, 臂比  $1.42 \pm 0.15$ . 没有观察到随体, 该染色体属于中央着丝粒染色体. 参照刘丽萍等人<sup>[10]</sup>公布的核型分析结果, 可以确定 BAC 克隆 26-L15 和 16-M11 位于附加的白花甜菜第 9 号染色体的长臂上.

## 3 讨论

前人试图将野生甜菜的无融合生殖特性导入栽培甜菜, 但是都没成功. 我们通过多年的远缘杂交实验, 在其后代筛到一套完整的带有白花染色体的单体附加系(monosomic addition lines, VV+1C), 并选育了高频传递的特异单体附加系 M14. 经胚胎学、细

胞学、分子标记等多方面证明, M14 具有无融合生殖特性<sup>[9,10,12]</sup>. 进而, 我们构建了 M14 大片段插入的 BAC 基因组文库(细菌人工染色体文库), 覆盖整个基因组. 从文库中筛选含有无融合生殖特异基因的 BAC 克隆, 对于研究无融合生殖基因和重复序列, 以及对着丝粒等染色体结构的分析是很有价值的.

前人已经报道, 无融合生殖基因位于重组抑制区内<sup>[17]</sup>. 由于缺少重组, 体现在两物种间不能建立高密度、小距离的遗传图谱. 利用染色体原位杂交技术跟踪远缘杂交后代的遗传特性及对无融合相关基因的物理定位是十分必要的. GISH 的杂交很大程度上有赖于基因组特异的重复序列. 物种进化过程中, 种间差异的变化往往体现在重复序列的改变, 而一般功能基因相对保守. 重复序列的改变主要体现在序列和量的变化<sup>[18]</sup>. 甜菜的染色体相对较小(2~3  $\mu\text{m}$ ), 对于许多重复序列的分析显示, 一些重复序列家族在甜菜属的单一区域内高度扩增, 而另一些则种间保守<sup>[19]</sup>. 这些重复序列家族由占据显著染色体位点的卫星 DNA 构成. 在我们的研究中, 白花甜菜和栽培甜菜的染色体很容易通过 GISH 区分(图 2(b)). 这种对白花甜菜染色体特异性的“喷涂”, 封阻 DNA 是不必要的. GISH 结果显示, 栽培甜菜和野生白花甜菜种间差异性较大, 白花甜菜基因组含有许多种的特异性重复序列, 这与前人结果相一致<sup>[14,20]</sup>.

M14 的基因组原位杂交也在栽培甜菜染色体上检测到微弱的杂交信号(图 2(b)), 这些信号可能来自白花甜菜与栽培甜菜的保守序列, 尤其是 Ty1-copia-like 和 Ty3-gypsy-like 反转录子, 它们广泛存在于植物基因组中<sup>[20-22]</sup>, 有报道说 Ty3-gypsy-like 反转录子成簇聚集在栽培甜菜的着丝粒处<sup>[23]</sup>. 1 对栽培甜菜染色体的末端显示了较明显的绿色杂交信号(图 2(b)), 属于白花甜菜与栽培甜菜交叉杂交信号, 可能是两物种间 18S-5.8S-25S rRNA 染色体上保守位点. 有报道说, 18S-5.8S-25S rRNA 位于 1 对白花染色体的末端<sup>[19]</sup>,

表 1 甜菜单体附加系 M14 信号检出染色体 FISH 分析的核型结果

探针	检出信号的染色体臂	臂比	与栽培甜菜最长染色体比值	染色体类型
BAC 克隆 26-L15, 16-M11	L <sup>a)</sup>	$1.42 \pm 0.15$	$0.96 \pm 0.13$	m
野生白花甜菜基因组 DNA	—	$1.41 \pm 0.17$	$0.97 \pm 0.08$	m

a) 长臂

这与本实验的结果相吻合。

本研究中, 利用野生白花甜菜基因组DNA为探针与甜菜无融合单体附加系M14 品系植株进行FISH, 结果检测到单一染色体具有杂交信号。前人以无融合生殖系绘制的分子图谱已经说明, 单一染色体对无融合特性的表达是必要且充分的<sup>[24]</sup>, 而且发现无融合生殖特性在狼尾草中是由1对等位基因中的1个单独作用的<sup>[17]</sup>。栽培甜菜没有无融合生殖特性, 而白花甜菜第9号染色体导入到栽培甜菜后, 形成的M14植株(VV+1C)却获得了无融合生殖特性, 说明这条单一染色体的出现足以提供无融合生殖特性表达的基因。那么, 控制甜菜无融合生殖特性的相关基因应该位于这条染色体上。由BAC芯片筛选的携带无融合花期差异表达基因的BAC克隆所组成的FISH探针(插入片段在100~150 kb), 得到的也是半合子的观察结果。任何情况, BAC-FISH信号只出现在无融合生殖植株M14所附加的一条白花甜菜第9号染色体上(图4(a)~(c)), 可能有性生殖的栽培甜菜染色体中没有同源区, 故其遗传行为像单价显性位点。附加的白花甜菜第9号染色体无论是形态学鉴定还是FISH鉴定, 其总会与有性生殖植株相分离。

野生白花甜菜和栽培甜菜的远缘杂交后代自F<sub>1</sub>代分离成两种生殖方式: 无融合生殖和有性生殖。暗示着这种特性是由杂合子显性基因控制, 结合我们的FISH结果, 进一步证明了前人的结论, 即在甜菜中, 无融合生殖是由单价显性位点控制。我们的研究已证明附加的野生白花甜菜第9号染色体的出现与无融合生殖有关, 似乎附加的野生白花甜菜第9号染色体上存在着无融合生殖特异基因。可以利用FISH技术进一步研究野生白花甜菜中第9号染色体与其同源染色体之间的关系, 并追踪M14减数分裂时期染色体遗传行为, 深入研究无融合生殖基因的遗传机制。

过去, 无融合生殖和有性生殖被看作是两种截然不同的过程。Nogler和Savidan证明, 虽然遗传调节或环境因素都会对无融合生殖的表达产生影响<sup>[1,25]</sup>, 但是无融合是基因控制的。利用无融合植株M14和有性植株栽培甜菜的花期特异表达的mRNA对白花甜菜第9号染色体BAC芯片进行分析。实验结果表明, 大多数BAC克隆均与无融合生殖植株的mRNA和有性植株的mRNA有共杂交的信号, 仅在2个BAC

克隆上检测到无融合生殖表达的差异基因(图3箭头)。这一结果暗示, 甜菜中无融合生殖和有性生殖有很多相似之处, 两种途径中可能共享某些相同表达基因和调节因子。前人在研究山柳菊时也发现, 无融合生殖与有性生殖是相联系的发育路径, 共享某些常规调节程序<sup>[26]</sup>。除了无融合生殖的特异基因, 正是由于某些可调节的有性生殖程序的介入才使得植株无融合生殖特性得以正常表达<sup>[26]</sup>。但是, M14植株的配子体无融合生殖过程中存在与有性生殖完全不同的3个关键步骤, 即大孢子母细胞不经减数分裂直接形成胚囊、卵细胞自行发育产生胚、极核自主发育成胚乳。这些发现说明, 可能正是野生白花甜菜第9号染色体上特异的无融合生殖基因的作用, 才使大孢子母细胞的命运改变, 有性生殖关键步骤短路, 无融合生殖得以表达。

值得注意的是, BAC芯片杂交结果中, 有2个BAC克隆均有绿色杂交信号(图3, 箭头), 应该是甜菜无融合植株M14特异表达基因所在的区段。以它们为探针对M14中期染色体进行FISH, 2个供试BAC被特异定位在M14附加的一条白花甜菜第9号染色体长臂的末端, 在栽培甜菜的染色体上没有检测到杂交信号, 也就是说2个供试BAC克隆在有性植株的染色体中没有同源区, 在M14中表现为半合子, 遗传行为像单价位点。供试BAC克隆的信号位于染色体的末端。前人的研究表明, 重组抑制位点多位于染色体的着丝粒、副着丝粒、末端以及一些异染色质区域, 这些含各种重复序列的染色体区域均表现出重组抑制特征<sup>[27]</sup>。在一些研究较为深入的材料中已经发现, 无融合生殖基因可能位于重组抑制区内<sup>[17]</sup>。

由FISH所提供的物理定位的数据, 为无融合生殖中的重组抑制提供了一些解释。配子体无融合生殖中至少需要2个因子来控制不减数胚囊和由卵细胞进行孤雌生殖的能力。“无融合生殖相关基因是以两个或是更多个紧密连锁的基因为代表的单倍型。”这种说法越来越引起人们的关注, 最近一些证据表明, 二倍体孢子体无融合生殖可能由多个位点的基因控制, 在一些物种中二倍体孢子体生殖与孤雌生殖很明显不配对<sup>[28,29]</sup>。

一条白花甜菜第9号染色体在二倍体栽培甜菜的背景下, 足以使无融合生殖特性得以表达。我们的目

的是分离得到已定位在白花甜菜第 9 号染色体上的无融合生殖基因, 虽然这一目标并不能立即实现, 但是对白花甜菜第 9 号染色体上位点间序列重排的深入研究, 无疑将使我们对于甜菜无融合生殖的进化和遗传机制有一个更深的认识。

**致谢** 感谢中国科学院遗传与发育生物学研究所程祝宽教授, 武汉大学李刚博士, 中国科学院方晓华博士。在实验过程中, 还得到中南民族学院蓝伟贞, 黑龙江大学潘宇、杜洪岩的指导和帮助, 在此表示衷心感谢。

### 参 考 文 献

- Nogler G A. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*: V. Conclusions. *Bot Helv*, 1984, 94: 411—422
- Asker S E, Jerling L. Apomixis in Plants. Boca Raton, Finland: CRC Press, 1992
- Koltunow A M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell*, 1993, 5: 1425—1437[DOI]
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E, et al. Developmental genetics of gametophytic apomixes. *Trends Genet*, 2001, 17: 597—604[DOI]
- Leblanc O D, Grimanelli D, González-de-León D, et al. Detection of the apomictic mode of reproduction in *maize-Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. *Theor Appl Genet*, 1995, 90: 1198—1203[DOI]
- Savidan Y. Transfer of apomixis through wide crosses. *The Flowering Engineering*, 2001, 153—167
- Dujardin M, Hanna W. Developing apomictic pearl millet: characterization of a BC. *Plant J Breed*, 1989, 43: 145—151
- Letschert J P W. *Beta* section: Biogeographical patterns of variation and taxonomy. *Agric Univ. Wageningen Pap.* 1993: 1—93
- 郭德栋, 李盛贤, 贾树彪, 等. 甜菜种间杂交的研究. *黑龙江大学自然科学学报*, 1999, 2: 108—113
- 刘丽萍, 高东杰, 李勇, 等. 栽培甜菜和白花甜菜及其杂交后代染色体组型分析. *中国糖料*, 1996, 3: 1—5
- 高东杰, 康佳红, 刘丽萍, 等. 栽培甜菜带有白花甜菜染色体的单体附加系列. *中国糖料*, 2001, 4: 1—5
- 郭德栋, 刘丽萍, 康传红, 等. 甜菜无融合生殖单体附加系的繁殖传递特性. *黑龙江大学自然科学学报*, 2001, 3: 104—107
- Gao D, Schmidt T, Jung C. Molecular characterization and chromosomal distribution of species-specific repetitive DNA sequences from *B. corolliflora*, a wild relative of sugar beet. *Genome*, 2000, 6: 1073—1080[DOI]
- Desel C, Jung C, Cai D, et al. High resolution mapping of YACs and single-copy gene *Hsl<sup>pro-1</sup>* on *Beta vulgaris* chromosomes by multicolour fluorescence in situ hybridization. *Plant Molecular Biology*, 2001, 45: 113—122[DOI]
- Schmidt T, Schwarzacher T, Heslop-Harrison J S. Physical mapping of rRNA genes by fluorescent in situ hybridization and structural analyses of 5S rRNA genes and intergenetic spacer sequences in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 629—636[DOI]
- Yan H H, Cheng Z K, Liu G Q, et al. Identification of *Oryza sativa* × *Oryza officinalis* F<sub>1</sub> and backcross progenies using genomic *in situ* hybridization. *Acta Genetica Sinica* (in Chinese), 1999, 26: 157—162
- Ozias-Akins P, Roche D, Hanna W W. Tight clustering and hemizygoty of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no alleles form in sexual genotypes. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95: 5127—5132[DOI]
- Dean C, Schmidt R. Plant genomes: a current molecular description. *Annual Review of Plant Molecular Biology*, 1995, 46: 395—418[DOI]
- Desel C, Jansen R, Gue D D, et al. Painting of parental chromatin in *Beta* hybrids by multicolour fluorescent hybridization. *Annals of Botany*, 2002, 89: 171—181[DOI]
- Flavell A J, Smith D B, Kumar A. Extreme heterogeneity of Ty1-*copia* group retrotransposons in plants. *Molecular and General Genetics*, 1992, 231: 233—242
- Hirochiksa H, Hirochika R. Ty1-*copia* group retrotransposon as ubiquitous components of plant genomes. *Japanese Journal of Genetics*, 1993, 68: 35—46[DOI]
- Brandes A, Jung C, Wricke G. Nematode resistance derived from wild beets and its meiotic stability in sugar beet. *Plant Breeding*, 1987, 99: 56—64[DOI]
- Gindullis F, Desel C, Calasso I, et al. The large-scale organization of centromeric DNA in *Beta* species. *Genome Research*, 2001, 11: 253—265[DOI]
- Ozias-Akins P, Lubber E L, Hanna W W, et al. Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular marks. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 632—638[DOI]
- Savidan Y. Transfer of apomixes through wide crosses, In: Savidan Y, Carman J G, Dresselhaus T, eds. *The Flowering of Apomixis From Mechanisms to Genetic Engineering*. Cimmyt: Houston, 2001. 153—167
- Tucker M R, Araujo A C G, Peach N A, et al. Sexual and apomictic reproduction in *Hirracium subgenus pilosella* are closely inherited developmental pathways. *The Plant Cell*, 2003, 15: 1524—1537[DOI]
- Zhang L T, Pickering R, Murray B. Direct measurement of recombination frequency in interspecific hybrids between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum* using genomic *in situ* hybridization. *Heredity*, 1999, 83: 304—309[DOI]
- Inge C Q T, Peter J V D. Crosses between sexual and apomictic dandelions(*Taraxacum*). I. The inheritance of apomixis. *Heredity*, 1999, 83: 707—714[DOI]
- Peter J V D, Inge C Q T, Matthieu F, et al. Falque M. Crosses between sexual and apomictic dandelions(*Taraxacum*). II. The breakdown of apomixis. *Heredity*, 1999, 83: 715—721[DOI]