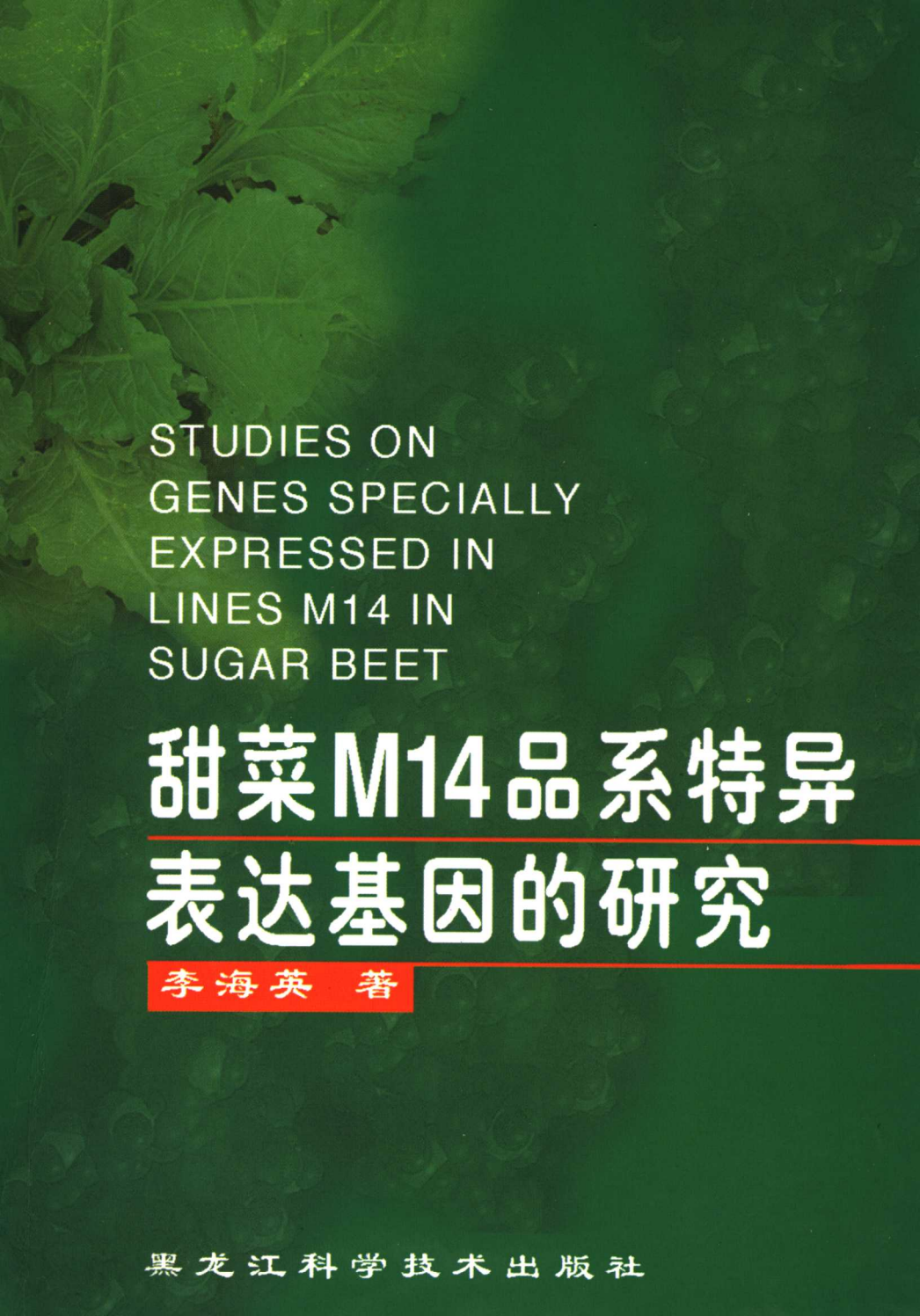




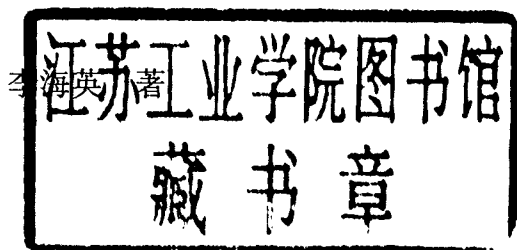
STUDIES ON
GENES SPECIALLY
EXPRESSED IN
LINES M14 IN
SUGAR BEET

甜菜M14品系特异 表达基因的研究

李海英 著

黑龙江科学技术出版社

甜菜 M14 品系特异表达基因的研究
STUDIES ON GENES SPECIALLY EXPRESSED
IN LINES M14 IN SUGAR BEET



黑龙江科学技术出版社
中国·哈尔滨

图书在版编目 (CIP) 数据

甜菜 M14 品系特异表达基因的研究/李海英著. —哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2006.10
ISBN 978-7-5388-5212-7

I. 甜... II. 李... III. 甜菜—基因—研究
IV. S566.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 122797 号

责任编辑 常瀛莲
封面设计 洪 冰
版式设计 汪 涟

甜菜 M14 品系特异表达基因的研究
STUDIES ON GENES SPECIALLY EXPRESSED
IN LINES M14 IN SUGAR BEET
李海英 著

出 版 黑龙江科学技术出版社
(150001 哈尔滨市南岗区建设街 41 号)
电话 (0451) 53642106 电传 53642143 (发行部)

印 刷 黑龙江龙新印刷有限公司

发 行 黑龙江科学技术出版社

开 本 850×1168 1/32

印 张 6.875

字 数 200 000

版 次 2007 年 1 月第 1 版·2007 年 1 月第 1 次印刷

印 数 1—1 000

书 号 ISBN 978-7-5388-5212-7/S·647

定 价 20.00 元

前 言

黑龙江大学生命科学学院郭德栋教授通过二倍体栽培甜菜与白花甜菜杂交、进一步回交而获得的单体附加系 M14, 其染色体组成中除了含有 18 条栽培甜菜染色体外, 还附加有野生白花甜菜第 9 号染色体, 该附加染色体通过母本的传递率为 96.5%; 单体附加系传递率如此高的原因是因为 M14 中有无融合生殖基因的存在。经过与具有标记基因的材料杂交, 多年染色体传递率统计, 细胞学、胚胎学及分子生物学鉴定, 证明该品系同时具有有性生殖与二倍体孢子生殖特性, 其中二倍体孢子生殖发生频率为 96.5%, 有性生殖频率为 3.5%, 为兼性无融合生殖材料。通过专家鉴定, 认为带有白花甜菜第 9 号染色体的栽培甜菜单体附加系, 即甜菜无融合生殖 M14 品系, 是克隆无融合生殖基因极其难得的材料。

本书共分六章, 第一章首先介绍了植物无融合生殖的研究现状及甜菜无融合生殖 M14 品系的创造过程, 同时介绍了对 M14 品系的细胞胚胎学研究进展及克隆无融合生殖基因的研究进展。第二章介绍了采用 mRNA 差异展示技术对甜菜无融合生殖 M14 品系和正常有性生殖的二倍体栽培甜菜减数分裂时期的基因表达差异分析的实验过程, 获得了 5 个阳性差异表达片段, 并应用 NCBI 的 BLASTx 软件对这 5 个阳性差异表达片段进行了同源序列、相似序列检索, 为进一步克隆无融合生殖基因提供了候选 cDNA 片段。第三章介绍了利用抑制消减杂交技术获得甜菜无融合生殖 M14 品系特异表达的 EST 片段的实验过程, 实验最终得到 28 个 EST 片段。第四章介绍了甜菜无融合生殖 M14 品系在花期特异表达基因 cDNA 文库的构建及筛选的实验过程, 并以抑制消减杂交方法所获得的 M14 特异表达的 EST 片段为探针进行

筛选, 获得了 2 个 M14 品系在花期特异表达基因 cDNA 片段的全长。第五章介绍了利用 RACE 技术获得甜菜无融合生殖 M14 品系特异表达基因的 cDNA 全长的实验过程, 共获得 3 个特异表达的基因, 分别命名为 M14-341, M14-263, M14-219, 其中基因 M14-341 与 MADS 框和 K 盒具有较高的同源性, MADS 框包括花器官发育中一些功能基因; 基因 M14-263 与玉米、水稻、茄属、辣椒、豌豆和拟南芥等植物中的 small GTP-binding protein (小 GTP 结合蛋白), 都有超过 80% 的相似性; 基因 M14-219 与马铃薯、豌豆、水稻、拟南芥等植物中编码异戊酰辅酶 A 脱氢酶 (IVD) 的基因相似性都超过了 80%。第六章介绍了通过 RAPD 和 AFLP 两种分子标记技术寻找 M14 所特有的 DNA 片段作为分子标记的实验过程, 所得到的分子标记为研究无融合生殖的分子机理、遗传特性和克隆无融合生殖基因奠定了基础。

本书的实验材料为具有无融合生殖特性的甜菜 M14 品系, 由黑龙江大学生命科学学院郭德栋教授提供。此材料已经得到了国家专利保护, 为我国特有的植物材料资源, 是克隆无融合生殖基因的宝贵材料。部分实验内容由于冰、马春泉、张绍军、高传军、曹立成、朱明、张莹、胡敏等同学完成, 在此对这些同学的劳动付出表示感谢; 本书的实验设计得到了黑龙江大学生命科学学院郭德栋教授、李荣田教授、唐艳副教授、刘丽萍实验师的指导, 在此表示感谢; 在本书的编辑过程当中, 崔颖、刘宇两位同学提供了很多帮助, 在此表示诚挚的谢意。

希望本书的出版可以为今后的同类研究提供一些借鉴和帮助。同时由于笔者经验不足、时间有限, 本书的内容和方法还存在一些不足之处, 敬请各位专家批评指正。

李海英

2007 年 1 月于黑龙江大学

目 录

第一章 植物无融合生殖概述.....	(1)
一、植物无融合生殖的发现.....	(1)
二、植物无融合生殖的分类.....	(1)
三、植物无融合生殖的研究进展.....	(2)
四、甜菜无融合生殖 M14 品系研究进展	(7)
第二章 利用 mRNA 差异显示技术获得甜菜 M14 品系特 异表达的 EST 片段	(11)
一、前言	(11)
二、实验材料	(21)
三、实验方法	(24)
四、实验结果	(35)
五、结论	(44)
第三章 利用 SSH 技术获得甜菜 M14 品系特异表达的 EST 片段	(46)
一、前言	(46)
二、材料和方法	(57)
三、实验结果	(67)
四、讨论	(80)
第四章 甜菜 M14 品系花期特异表达基因 cDNA 文库的 构建及筛选	(83)
一、前言	(83)
二、材料和方法	(96)
三、结果与分析	(98)
四、讨论.....	(104)

第五章	利用 RACE 技术获得甜菜 M14 品系特异表达基因的 cDNA 全长	(105)
一、前言		(105)
二、实验材料		(116)
三、实验方法		(118)
四、实验结果		(134)
五、讨论		(148)
第六章	甜菜 M14 品系 RAPD 及 AFLP 分子标记的筛选	(154)
一、前言		(154)
二、材料和方法		(161)
三、实验结果		(169)
四、讨论		(197)
参考文献		(202)

第一章 植物无融合生殖概述

无融合生殖 (apomixis) 是指不经过精卵融合而以种子进行繁殖的一种特殊的无性生殖方式。由于没有精卵融合而产生的子代, 其基因型与母本精确相同, 使子代继承了亲代固有的遗传特性, 形成遗传上稳定的、可由种子繁殖的无性系。无融合生殖可以固定有利的基因型, 改变育种程序及种子生产过程, 具有重大的经济意义。如果无融合生殖被应用于重要的经济作物, 将会带来继 20 世纪 60 年代“绿色革命”之后的又一次农业革命——无性生殖革命。

一、植物无融合生殖的发现

植物无融合生殖现象最早是由 John Smith 于 1841 年在雌雄异株的三稜莒属植物 *Alchornea ilifolia* 中发现的。1866 年孟德尔在完成豌豆杂交试验后, 试图利用山柳菊重复其试验结果。然而, 当他完成大量的杂交试验后, 却发现结果与他总结出的经典遗传理论并不吻合, 导致当时很多人对他的理论产生了怀疑, 直到后来才有人发现这一反常现象是由无融合生殖导致的。植物无融合生殖广泛存在于被子植物中, 目前已在 140 个属中发现了无融合生殖的特性。

二、植物无融合生殖的分类

根据生殖发生的完全程度, 植物无融合生殖可分为专性无融合生殖和兼性无融合生殖 2 种。专性无融合生殖只发生无融合生殖, 没有有性生殖。兼性无融合生殖同时发生有性生殖和无融合生殖, 子代会发生性状分离。

根据胚胎发育的起源不同, 可将无融合生殖分为孢子体无融合生殖和配子体无融合生殖两类。孢子体无融合生殖是由珠心或珠被细胞直接发育成胚, 与有性生殖共存, 表现出多胚现象。配子体无融合生殖又可分为无孢子生殖 (apospory) 和二倍体孢子生殖 (diplospory) 两类。无孢子生殖是由珠心体细胞直接发育成成熟胚囊后, 由未减数的卵细胞发育成胚。二倍体孢子生殖是大孢子母细胞减数分裂受阻, 形成未减数胚囊, 然后由未减数胚囊发育形成胚。配子体无融合生殖根据其未减数胚囊形成的不同, 可分为 9 种方式: 韭型 (*Allium odorum* type)、蒲公英型 (*Taraxacum* type)、苦苣菜型 (*Lxeris* type)、艾纳香型 (*Blumea* type)、披碱草型 (*Elymus rectisetus* type)、蝶须型 (*Antennaria* type)、山柳菊型 (*Hieracium* type)、画眉草型 (*Eragrostis* type)、黍型 (*Panicum* type)。

三、植物无融合生殖的研究进展

(一) 无融合生殖的胚胎学研究

对无融合生殖胚胎学的研究, 以前多采用切片技术, 现在逐渐采用整体透明、荧光显微技术, 同时进行超微结构的观察, 以了解无融合生殖的胚胎学机制。Osadtchiy 研究了早熟禾属的林莓系 (*P. oaremorialis*) 和泽地早熟禾 (*P. palustris*) 的大、小孢子形成及发育过程中的超微结构, 认为与有性生殖相比, 无融合生殖无染色体联会, 更无联会复合体; 胞间连丝消失, 胼脂质不存在; 核伸长及核不规则增大。对披碱草属二倍体孢子形成的无融合生殖种滨草 (*E. rectisetus*) 的研究表明, 大孢子在早前期合点端形成液泡, 核扩大、伸长呈哑铃形; 大孢子胞壁上无胼脂质沉淀; 小孢子通过减数分裂形成; 个别品系形成 $2n$ 花粉。近年来, 无融合生殖胚囊形成的异常现象, 例如发育迟缓、胚囊败育等也引起了研究者的兴趣, 认为这些也是无融合生殖的特征。

(二) 无融合生殖的遗传学机制

对无融合生殖的遗传研究要比对有性生殖的遗传研究困难。到目前为止, 还未彻底弄清楚它严格的遗传方式。不过根据前人对一系列无融合生殖体与有性生殖个体杂交后代的分析, 可看出, 无融合生殖的基本过程是可遗传的, 通常由少数几对基因控制, 属简单的质量遗传。在大黍 (*Panicum maximum*) 中, 无融合生殖是受 1 个显性基因 *A* 控制, 该基因独立于有性生殖基因而存在, 控制着无融合生殖原始细胞的分化、分裂、胚囊形成等一系列过程。而 Peacock 提出了 2 对连锁的基因控制无融合生殖的观点, 其中 1 对显性基因为 *Eis*, 它起上位作用, 一旦启动, 将促进另外 1 个基因的表达, 导致无融合生殖的发生。在毛茛属 (*Ranunculus*) 和山柳菊属 (*Hieracium*) 中, *A* 基因控制无融合生殖, 保证珠心细胞不进行减数分裂形成胚囊和不经受精形成种子; *a* 基因的作用是促使减数分裂, 形成有性胚囊, 产生正常的种子。并且在多倍体中随着 *a* 基因数目的增多, 无融合生殖的频率下降, 说明无融合生殖是由主效基因和修饰基因共同控制的。而在绿毛茛蓼 (*Cenchrus ciliaris*) 中, 无融合生殖则是由 *A* 基因和 *B* 基因共同控制的, *B* 基因是 *A* 基因的上位基因, 只有基因型为 *A-bb* 的表现无融合生殖。K 型、V 型小麦雄性不育系可以进行无融合生殖, 它们和恢复系、保持系杂交后, 后代中可以产生单倍体。K 型、V 型不育系产生单倍体的原因, 是由于异源细胞质与 1BL/1RS 染色体中 1RS 片段的互作, 造成减数分裂过程中配对松弛的染色体提前分离, 卵细胞提前成熟, 失去受精能力, 从而形成了单倍体胚, 并且诱导单倍体的频率高低, 直接与 1BL/1RS 的易位片段大小相关。从以上的研究可以看出, 控制无融合生殖的基因数目及其显隐性的问题, 在不同植物中表现出不同的情况, 所以有待于进一步研究。

(三) 无融合生殖的分子机理

近年来, 由于 RAPD, AFLP, RFLP 和 mRNA 差异显示等

技术的应用, 已使植物无融合生殖的研究面貌一新, 特别是一系列与无融合生殖有关的特异 DNA 片段的发现, 为深入了解其遗传机制和分子机理增加了大量的新知识。

Leblanc 利用分离群体分组分析法 (Bulked segregator analysis, BSA) 研究玉米 (*Maize*) × 摩擦禾 (*Tripsacum*) 杂种 F₂ 代分离群体, 找到了与二倍体孢子无融合生殖基因相连锁的分子标记; 用 RFLP 标记可识别属间杂交后代的无融合生殖植株, 这个标记可定位到玉米第六染色体长臂末端, 分离后代说明摩擦禾无融合生殖由单基因控制。在此基础上, Kindiger 选用玉米附加系和无融合生殖系为材料, 利用摩擦禾无融合生殖的 PCR/RAPD 标记 OPA-06, OPA-12, OPG-03, OPJ-14, RFLP 标记 UMC62, UMC134, CSV68, VMC238, VMC28 进行了无融合生殖的基因定位。其结果表明, 控制摩擦禾无融合生殖的单基因位于 Tr16 染色体长臂。Ozias 等将珍珠粟 (*Pennisetum glaucum*) 与非洲狼尾草 (*P. Squamulatum*) 杂交得到种间杂种, 然后回交, 再用 RAPD 技术标记无融合生殖的植株, 找到了 1 个与无融合生殖基因紧密连锁的 RAPD 标记。Chen 从大黍的 cDNA 文库中筛选出 1 个在无融合生殖的花序中特异表达的 cDNA 片段 A2-134。序列分析表明, 它编码 1 个由 305 个氨基酸组成、分子量为 34 200 的蛋白质, 这是第一个分离出来的与无融合生殖胚囊形成有关的 cDNA。这些研究结果无疑为定位和克隆植物无融合生殖基因以及利用遗传操作的手段来改变植物的生殖方式奠定了理论基础。

随着分子生物学和基因工程技术的飞速发展, 人们又寄希望于克隆到这一基因, 然后利用转基因技术将其转到其他重要的作物中。然而, 通过对一些研究比较深入的无融合生殖材料的分析发现, 无融合生殖材料多为多倍体, 基因组数目庞大, 杂合性较高, 遗传学机制尚不清楚, 如无融合生殖基因是显性还是隐性, 是单基因控制、两对基因控制还是多基因控制, 是单一位点还是

多位点等问题都没有统一的结论。有报道认为,大黍(*Panicum maximum*)、毛茛(*Ranunculus auricomus*)的无孢子生殖为显性单基因遗传;而三倍体一年蓬(*Erigeron annuus*)为2个独立位点进行传递;摩擦禾(*Tripsacum*)和白花蒲公英(*Taraxacum officinale*)的遗传是受多个不连锁位点控制的。无融合生殖性状作为1个孟德尔遗传单位还具有重组抑制的特点,在狼尾草(*Pennisetum squamulatum*)、臂形草(*Brachiaria decumbens*)、鸭茅状摩擦禾(*Tripsacum dactyloides*)和雀稗(*Paspalum simplex*)与玉米或水稻的比较作图中发现,这些紧密连锁的分子标记分布在12~40厘摩(cM)的范围内,也就是说即使是紧密连锁的标记,它距离无融合生殖基因座的实际物理距离仍然很远。正是由于无融合生殖遗传分析的复杂性和无融合生殖位点的重组抑制特性,使得该基因的克隆具有很大难度。

目前,许多科学家已经对多个物种的配子体无融合生殖进行了遗传学分析,普遍认为无融合生殖是多因子构成的复合性状。它可划分为3个主要因子:一是缺少或改变减数分裂以阻止染色体减数(无减数, apomeiosis);二是卵细胞在没有受精的条件下,活化形成胚;三是胚乳自主或假配开始发育。2005年, Fritz Matzk 等报道,草地早熟禾(*Poa pratensis*)中无融合生殖遗传是由 *Ait*, *Apv*, *Mdv*, *Pit*, *Ppv* 5个基因控制。显然,对植物无融合生殖的遗传现在科学界还没有统一认识,但无融合生殖这种复杂的性状是由基因决定的已经得到了广泛认同。

在无融合生殖候选基因的克隆方面,科学家们做了大量的研究工作,发现了一些与胚和胚乳的产生有关的基因,主要有 *FIS* 类基因、*rol B* 基因、*BBM* 基因和 *SERK 1* 基因等。

目前,发现了3个 *FIS* 类基因: *FIS1*, *FIS2* (*MEA*) 和 *FIS3* (*FIE*), 任何一个 *FIS* 类基因突变均可导致拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)在不受精的情况下,胚乳自发产生。*fis* 突变体授粉后,它们的胚均败育,因为在极核没有受精的情况

下,即使胚乳能自发产生,胚仍然不能发育,所以 *FIS* 类基因可协调有性生殖过程中胚和胚乳的发育。自发的胚乳发育是一些植物无融合生殖的特征之一, *FIS* 类基因的突变也导致胚乳自发发育,但这些突变不足以完成无融合生殖种子的发育,因为在受精的情况下, *FIS* 类基因突变体的胚不发育,种子一直是卷缩状,并且体积极小,几乎看不见,这说明无融合生殖的种子发育过程中胚和胚乳的发育受不同基因控制,是多基因控制的性状。

Rol B 基因是发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 中诱导双子叶植物在侵染部位引发毛根症 (hr) 的一类基因,它具有类似生长素的生理效应,可诱导根原基发端和根的伸长,维持顶端优势。Koltunow 等将 *rol B* 基因导入无融合生殖的山柳菊后,发现这些基因引起植物形成异位分生组织,改变胚珠形成,从而高频率产生无融合生殖。

Boutilier 等离体培养油菜 (*Brassica napus*) 未成熟花粉,诱导出体细胞胚,再利用抑制消减杂交技术,发现了 *BBM* (BABYBOOM) 基因。它与转录因子 AP2/ERF 家族有同源性,主要在胚和种子中表达。*BBM* 基因在拟南芥和油菜中的异位表达,可导致体细胞胚的形成。此外, *BBM* 基因的表达还可以使外植体在没有激素的条件下再生,使叶片和花的形态方式改变。说明 *BBM* 基因可以促进细胞分裂和体细胞胚的形态发生变化。

体细胞胚受体激酶 1 (Somatic Embryo Receptor Kinase 1, *SERK 1*) 基因是在拟南芥中发现的与胚产生有关的基因。Tucker 等把该基因导入山柳菊中,在有性生殖和无融合生殖的山柳菊的胚珠和种子中都有表达,说明 *SERK 1* 和胚的产生有关。

此外,人们通过筛选 cDNA 文库、mRNA 差异显示和原位杂交技术克隆了一些可能与无融合生殖有关的基因片段,但是,这些片段的功能尚不清楚。到目前为止,在无融合生殖基因克隆方面仍然没有突破性进展。

四、甜菜无融合生殖 M14 品系研究进展

黑龙江大学生命科学学院郭德栋等通过二倍体栽培甜菜 (*Beta vulgaris* L.) 与四倍体野生白花甜菜 (*B. corolliflora* Zoss.) 进行远缘杂交, 获得了异源三倍体, 进一步与栽培甜菜回交, 在其后代中筛选了一套带有白花甜菜染色体的单体附加系 (图 1-1), 共 9 种类型。在 1997 年发现其中带有白花甜菜第 9 号染色体的单体附加系 M14 品系具有 96.5% 以上传递率。经过与具有标记基因的材料杂交, 多年染色体传递率统计, 细胞学、胚胎学及分子生物学鉴定, 证明该品系同时具有有性生殖与二倍体孢子生殖特性, 其中二倍体孢子生殖发生频率为 96.5%, 有性生殖频率为 3.5%, 为兼性无融合生殖体。通过专家鉴定, 认为带有白花甜菜第 9 号染色体的栽培甜菜单体附加系 M14, 即甜菜无融合生殖 M14 品系是克隆无融合生殖基因极其难得的材料。

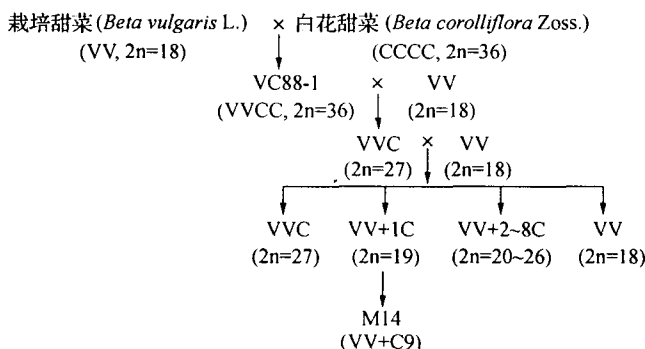


图 1-1 甜菜无融合生殖 M14 品系的获得

方晓华等与美国德克萨斯州农业与机械大学教授张洪斌博士合作, 构建了甜菜 M14 的可直接用于植物转化的二元细菌人工染色体 (Binary Bacterial Artificial Chromosome, BIBAC) 库,

库容 49 920 个克隆, 平均插入片段大小为 127kb, 覆盖甜菜 M14 基因组 7.5 倍, 在理论上具有大于 99% 的概率克隆到 M14 基因组中任何单拷贝的 DNA 序列。

为了绘制白花甜菜 9 号染色体物理图谱框架图, 又以一组白花甜菜基因组特异性散在的重复序列为探针, 进行 M14 BIBAC 文库的筛选, 获得了 2 377 个克隆, 覆盖白花甜菜 9 号染色体 (80Mb) 约 3.4 倍。这些克隆经重新排列组成了白花甜菜 9 号染色体特异性 BIBAC 文库。

申家恒从细胞胚胎学角度对甜菜 M14 品系进行了深入细致的研究。应用脱色苯胺蓝诱导荧光法观察了甜菜 M14 品系正常有性生殖与二倍体孢子生殖时, 大孢子发生期间细胞壁内胼胝质的变化。结果表明, 韭型 (*Allium odorum* type) 胚囊大孢子发生时, 自大孢子母细胞的珠孔端细胞壁内出现胼胝质荧光, 并逐渐扩展到整个细胞壁, 中期 I 至末期 I 细胞壁呈现胼胝质荧光; 二分体时, 珠孔端大孢子细胞壁内胼胝质荧光消失, 二分体之间的横壁以及合点端功能大孢子的侧壁上荧光明显, 二倍体功能大孢子的合点端细胞壁内的胼胝质荧光消失。单核胚囊形成后, 其细胞壁内无胼胝质荧光, 而退化的大孢子细胞壁胼胝质荧光显著。蝶须型 (*Antennaria* type) 胚囊大孢子发生时, 大孢子母细胞、二倍体功能大孢子的细胞壁均无胼胝质荧光。蓼型 (*Polygonum* type) 胚囊大孢子母细胞减数分裂时, 其珠孔端细胞壁出现胼胝质荧光, 并逐渐扩展到整个细胞壁。二分体、三分体、四分体时期, 胼胝质荧光主要存在于大孢子之间的横壁上, 侧壁内胼胝质荧光较弱, 退化的大孢子细胞壁胼胝质荧光明显, 功能大孢子细胞壁上缺少胼胝质荧光。此外, 还讨论了大孢子母细胞减数分裂与细胞壁内沉积胼胝质之间的相关性。

申业对甜菜无融合生殖 M14 品系雌配子体的发生与发育也进行了细致的研究, 利用常规石蜡制片法, 对甜菜 M14 品系雌配子体的发生与发育的研究结果表明, 二倍体孢子生殖雌配体为

韭型 (*Allium odorum* type) 和蝶须型 (*Antennaria* type), 有性生殖雌配子体为蓼型 (*Polygonum* type)。韭型和蝶须型的大孢子母细胞发育成为二倍体雌配子体, 蓼型大孢子母细胞形成单倍体的雌配子体。在二倍体孢子生殖雌配子体发育过程中, 出现发育迟缓, 胚囊败育等情况, 正常发育的雌配子体只有 25%。同时对甜菜无融合生殖单体附加系 M14 品系的小孢子发生、雄配子体发育的研究结果表明: 一是小孢子母细胞减数分裂过程中的胞质分裂为同时型, 四分孢子为四面体形; 二是单核小孢子经 2 次有丝分裂, 产生营养细胞和 2 个精子, 成熟的花粉粒为三细胞型, 单核小孢子第一次有丝分裂后, 80% 的花粉败育, 可育花粉只有 20%; 三是花药壁由 5~6 层结构组成, 表皮, 药室内壁, 2~3 层中层, 绒毡层为分泌型; 四是同一朵花中, 在前期, 雄蕊的发育早于雌蕊的发育, 在后期, 当花粉成熟时, 雌配子体也达到成熟。

申业利用常规研究方法, 对甜菜单体附加系 M14 品系的生殖方式进行细胞学与胚胎学研究。结果表明, 一是甜菜 M14 品系的 4 代细胞学检查, 染色体组分别为 $VV + 1C$ ($2n = 18 + 1$); $VV + 0$ ($2n = 18 + 0$); $VV + 2C$ ($2n = 18 + 2$); $VVV + 0$ ($2n = 27 + 0$); $VVV + 1C$ ($2n = 27 + 1$); $VVV + 2C$ ($2n = 27 + 2$) 等, 其中 $VV + 1C$ ($2n = 18 + 1$) 的植株传递率平均为 96.5%, 具有二倍体孢子无融合生殖特性; 其余各种分离植株的传递率总计为 3.5%, 有性生殖发生率较低; 二是胚胎学研究表明, 二倍体孢子无融合生殖的胚珠中, 珠孔处看不到花粉管, 胚囊没有发生受精作用; 2 个助细胞提前退化, 半数卵细胞的极性与正常卵细胞相反; 卵与次生核不经受精而自发分裂, 卵细胞自发分裂产生无性胚, 次生核自发分裂产生核型胚乳, 而且次生核自发分裂早于卵细胞分裂; 有性生殖胚珠中, 珠孔处可见多条花粉管, 胚囊里见到精卵融合的图像, 表明甜菜 M14 品系是以二倍体孢子无融合生殖为主要繁殖方式, 有性生殖为次要繁殖方式的兼性无

融合生殖体，认为减数分裂时期极有可能是无融合生殖基因的表达时期；另外，有 2 个花的异常发育时期（助细胞提前退化时期、次生核与卵细胞自行分裂时期），也可能是甜菜 M14 品系中无融合生殖基因的表达时期。实验中发现，M14 能够进入减数分裂阶段，但没有进行完整的减数分裂，实质是进行了有丝分裂，这种现象可能是由于 M14 中存在无融合生殖基因所导致。