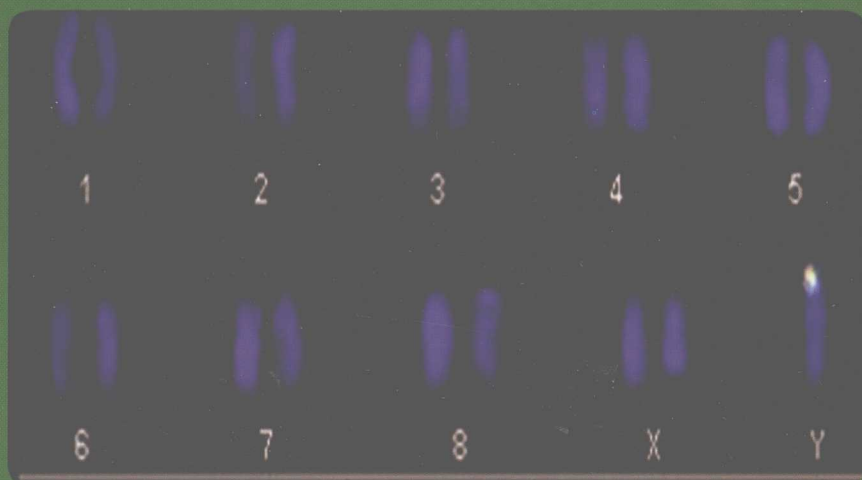


THE CHROMOSOME TRANSMISSION  
FREQUENCY OF THE MONOSOMIC  
ALIEN ADDITION LINE MAAL9 OF  
*Beta corolliflora* IN SUGAR  
BEET AND ITS MECHANISM

# 甜菜 MAAL9 品系 传递特性及其机制

李荣田 著



黑龙江科学技术出版社

# 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制

## THE CHROMOSOME TRANSMISSION FREQUENCY OF THE MONOSOMIC ALIEN ADDITION LINE MAAL9 OF *Beta corolliflora* IN SUGAR BEET AND ITS MECHANISM

李荣田 著

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 MAAL9 品系传递特性及其机制/李荣田著. —哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2007.10  
ISBN 978-7-5388-5560-9

I. 甜... II. 李... III. 甜菜-生物学-研究  
IV. S566.301

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 154141 号

---

责任编辑 常瀛莲  
封面设计 刘 洋

甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制

THE CHROMOSOME TRANSMISSION FREQUENCY OF THE  
MONOSOMIC ALIEN ADDITION LINE MAAL9 OF *Beta corolliflora* IN SUGAR BEET AND ITS MECHANISM

李荣田 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 4.25

字 数 150 000

版 次 2007 年 10 月第 1 版·2007 年 10 月第 1 次印刷

印 数 1-1 000

书 号 ISBN 978-7-5388-5560-9/S·661

定 价 20.00 元

## 前 言

利用植物远缘杂交,可以向栽培作物中引进近缘野生植物有利基因,拓宽作物育种基因资源,有利于培育高产、优质、抗逆、适合生产要求的农作物品种。

黑龙江大学郭德栋先生通过二倍体栽培甜菜 (*Beta vulgaris*. VV,  $2n=18$ ) 与四倍体野生白花甜菜 (*B. corolliflora* Zoss. CCCC,  $2n=4\times=36$ ) 进行种间杂交,并与栽培甜菜连续回交,创造了一套甜菜单体附加系 ( $2n=18+1$ , VV+1C)。其中,栽培甜菜染色体组附加了白花甜菜第九号染色体形成的甜菜单体附加系 MAAL9,具有世代间稳定的高频传递特性。甜菜 MAAL9 品系高频传递的机制有两种可能:一种是因为附加的染色体为杀配子染色体,另一种是由于无融合生殖机制在起作用。如果甜菜 MAAL9 品系高频传递特性是杀配子染色体在起作用,那么这将是甜菜属首次发现杀配子染色体,是具有重要利用价值的甜菜属各物种的生物诱变剂,将对甜菜的遗传研究、品种资源创新和近缘种属有利基因的利用等产生积极的影响。如果甜菜 MAAL9 品系具有无融合生殖特性,那么对于克隆无融合生殖相关基因、保存优异的基因型、固定杂种优势、改变育种程序等具有重要意义。为了确认甜菜 MAAL9 品系传递特性并进而研究其高频传递机制,首先分析了自 1998~2007 年 10 个世代开放、自由授粉的甜菜 MAAL9 品系传递率变化情况,调查了自 2003~2007 年 5 个世代开放、自由授粉的甜菜 MAAL9 品系不同株系及花序系统传递率情况,研究了原初创造的甜菜 MAAL9 品系和经过 10 个世代田间种植的甜菜 MAAL9 品系不同株系传递率差异。然后,用绿色叶柄甜菜 MAAL9 品系作为母本,具有显性标记性状的红色叶柄栽培甜菜 ( $2n=18$ , VV) 作为父本进行杂交,

通过观察杂交  $F_1$  代植株叶柄颜色和染色体组情况,探讨了甜菜 MAAL9 品系高频传递的遗传机制;利用 Southern 杂交技术,研究了甜菜 MAAL9 品系生殖过程中的染色体畸变频率,为其高频传递遗传基础提供佐证。同时,利用 SSR 和 AFLP 等 DNA 分子标记,探查了高频传递甜菜 MAAL9 品系不同植株隔离自交授粉后代株系系统 DNA 分子标记遗传变异特性,进一步提供了其生殖方式的分子遗传证据。通过以上各项内容的研究,得到的主要结论如下:

第一,甜菜 MAAL9 品系具有高频传递特性,而且这种传递特性是遗传的,遗传力比较高。不同年度世代的甜菜 MAAL9 品系株系间单体附加系传递率高低不同,大部分株系高频传递,也有少数株系传递率低于 50%。早期世代的甜菜 MAAL9 品系大多数株系传递率高,种植若干世代后大多数株系传递率都不同程度下降。

第二,绿色叶柄甜菜 MAAL9 品系  $\times$  红色叶柄栽培甜菜杂交组合的  $F_1$  代叶柄颜色和细胞染色体数目观察结果表明,甜菜 MAAL9 品系所有供试的植株,在杂交过程中都接受外来花粉完成受精作用而繁殖种子后代,同时甜菜 MAAL9 品系的传递率仍保持在较高水平。利用 AFLP 分子标记对甜菜 MAAL9 品系进行遗传变异分析,未发现任何一个母本株与子代植株之间的遗传性完全相同, $F_1$  代各  $2n=19$  的植株之间的遗传性也没有完全一致的。根据遗传杂交实验和 DNA 分子标记遗传分析的结果,未发现供试的甜菜 MAAL9 品系通过种子繁殖而产生无性系现象。

第三,利用白花甜菜全基因组特异散在重复序列 1054 为探针,和甜菜 MAAL9 品系中反转产生的栽培甜菜进行斑点杂交和 Southern 印迹杂交。Southern 杂交结果表明,甜菜 MAAL9 品系在形成减数配子过程中染色体发生畸变的概率较大。这暗示白花甜菜第九号染色体可能具有杀配子染色体特性。

第四,通过甜菜 MAAL9 品系 SSR 和 AFLP 两种 DNA 分子

标记遗传变异分析,未发现供试的甜菜材料可以通过种子繁殖产生和母本基因型精确相同的无性系。

将甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制研究的方法、结果、结论和体会等系统撰写成《甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制》一书,希望对从事植物远缘杂交、作物遗传育种学、植物分子生物学等领域研究的工作者有所裨益。

本书所涉及的研究工作承蒙东北林业大学教授杨传平先生和黑龙江大学教授郭德栋先生指导;经费由黑龙江大学博士后科研基金资助;硕士研究生马兰、杜洪岩和唐国强等同学参与了部分实验工作,在此,谨表示衷心的感谢!

李荣田

于黑龙江大学

2007年7月16日

## 目 录

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| 第 1 章 植物单体附加系传递特性及其机制研究概述····· | (1)   |
| 一、植物单体附加系·····                 | (1)   |
| 二、植物单体附加系高频传递机制·····           | (4)   |
| 三、遗传标记及其应用·····                | (9)   |
| 四、本研究工作主要内容简介·····             | (19)  |
| 第 2 章 甜菜 MAAL9 品系传递特性·····     | (22)  |
| 一、前言·····                      | (22)  |
| 二、材料与方法·····                   | (23)  |
| 三、结果与分析·····                   | (29)  |
| 四、讨论·····                      | (40)  |
| 五、结论·····                      | (44)  |
| 第 3 章 甜菜 MAAL9 品系高频传递遗传机制····· | (45)  |
| 一、前言·····                      | (45)  |
| 二、材料与方法·····                   | (46)  |
| 三、结果与分析·····                   | (59)  |
| 四、讨论·····                      | (68)  |
| 五、结论·····                      | (72)  |
| 第 4 章 甜菜 MAAL9 品系 DNA 分子标记遗传变异 |       |
| 特性·····                        | (74)  |
| 一、前言·····                      | (74)  |
| 二、材料与方法·····                   | (75)  |
| 三、结果与分析·····                   | (88)  |
| 四、讨论·····                      | (110) |
| 五、结论·····                      | (114) |



|           |       |
|-----------|-------|
| 缩略词表..... | (116) |
| 参考文献..... | (117) |

## 目 录

|            |                     |       |
|------------|---------------------|-------|
| (1) .....  | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第一章   |
| (1) .....  | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第二章   |
| (4) .....  | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第三章   |
| (2) .....  | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第四章   |
| (10) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第五章   |
| (55) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第六章   |
| (55) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第七章   |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第八章   |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第九章   |
| (40) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第十章   |
| (44) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第十一章  |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第十二章  |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第十三章  |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第十四章  |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第十五章  |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第十六章  |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第十七章  |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第十八章  |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第十九章  |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第二十章  |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第二十一章 |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第二十二章 |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第二十三章 |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第二十四章 |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第二十五章 |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第二十六章 |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第二十七章 |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第二十八章 |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第二十九章 |
| (25) ..... | 甜菜 MAAL9 品系传递特性及其机制 | 第三十章  |



# 第1章 植物单体附加系传递特性及其机制研究概述

## 一、植物单体附加系

### 1. 植物单体附加系的创立和传递性

植物单体附加系 (monosomic alien addition lines, MAALs) 是通过物种间杂交及回交等手段, 将亲缘关系较远的 1 个物种的 1 条染色体附加到另 1 个物种中而形成的。通过远缘杂交创造并利用 MAALs, 可以分开植物染色体, 向栽培作物物种中转移有利的基因及其农艺性状, 实现亲缘关系较远的物种间基因渗入, 以及比较物种间的同线性关系等。

迄今为止, 许多研究者在单子叶植物中创造了单体附加系材料。Islam 等 (1981) 利用中国春小麦 (*Triticum aestivum* L.,  $2n=6\times=42$ ) 与大麦属植物大麦 (*Hordeum vulgare*,  $2n=2\times=14$ ) 杂交, 得到的 20 个杂种后代中有 1 株是属于 28 条染色体的正常杂种后代; 其与中国春小麦回交的七倍体  $BC_1$  后代再次与中国春小麦回交, 在  $BC_2$  后代中大麦的染色体被附加到小麦的遗传背景中, 获得了 5 个单体附加系、6 个二体附加系和 7 个双单体附加系<sup>[1]</sup>。Morgan (1991) 利用羊茅属植物 *Festuca drymeja* ( $2n=2\times=14$ ) 与黑麦草属的四倍体多花黑麦草 (*Lolium multiflorum*,  $2n=4\times=28$ ) 杂交, 形成三倍体的杂交种 ( $2n=3\times=21$ ), 进一步用该杂种与二倍性的多花黑麦草 (*L. multiflorum*,  $2n=2\times=14$ ) 回交, 在得到的 165 棵植株中, 29 棵植株属于 MAALs ( $2n+1=15$ )<sup>[2]</sup>。De Vries 等 (1992) 把葱与洋葱杂交, 得到杂种  $F_1$ , 将杂种  $F_1$  加倍变成双二倍体, 与葱

回交产生异源三倍体的  $BC_1$  杂种植株; 经过再次回交, 从  $BC_2$  代群体中筛选到 MAALs 植株 ( $2n=17$ )<sup>[3]</sup>。Aggarwal 等 (1996) 利用药用野生稻和栽培稻杂交, 再与栽培稻进行连续回交, 把药用野生稻 C 基因组各条染色体分散到二倍体的栽培稻遗传背景中, 得到异源单体附加系<sup>[4]</sup>。Friebe 等 (2000) 把 *Aegilops speltoides* 染色体分散转移到小麦基因组中, 建立了 1 套完整的 *Aegilops speltoides* 小麦单体附加系<sup>[5]</sup>。Kynast 等 (2001) 将玉米的 10 条单倍数目的染色体分散到燕麦基因组中, 建立了 1 套完整的燕麦遗传背景下的玉米 MAALs<sup>[6]</sup>。

不仅单子叶植物中有单体附加系创造成功的报道, 而且双子叶植物中也有许多创造单体附加系的实例。Mc. Grath 等 (1990) 利用油菜和甘蓝杂交重新合成的植物 *B. napus Hasker* ( $2n=38$ , AACC, 由 2 种卷心菜杂交种的加倍处理得到) 进行连续回交 2 代, 把甘蓝 (*B. oleracea*,  $2n=18$ , CC) 的 1 套 C 基因组分散到油菜的完整二倍体基因组中<sup>[7]</sup>。Rooney (1991) 等人从陆地棉 × 斯特提棉的六倍体回交后代中鉴定了 4 个陆地棉附加斯特提棉的单体异源附加系<sup>[8]</sup>。Jacobsen (1995) 用二倍体马铃薯 (*Solanum tuberosum*,  $2n=2 \times =24$ ) 和番茄属二倍体的番茄 (*Lycopersicon esculentum*,  $2n=2 \times =24$ ) 进行原生质体融合, 形成六倍体融合杂种细胞 ( $2n=6 \times =72$ )。该杂种植株体细胞有 4 套马铃薯染色体组和 2 套番茄染色体组。利用四倍体的马铃薯对六倍体杂种进行回交, 在  $BC_1$  后代中发现番茄的 12 条染色体, 其中的 9 条被附加到马铃薯基因组中<sup>[9]</sup>。Singh (1998) 利用 *G. tomentella* ( $2n=78$ , DDEE) 与栽培大豆杂交及回交, 在  $BC_2$  和  $BC_3$  后代中鉴定出 287 株 MAALs; 根据形态特征把具有 *G. tomentella* 单条染色体和栽培大豆完整二倍体染色体组的 MAALs ( $2n=41$ ) 分成 2 个群<sup>[10]</sup>。在已获得甜瓜属种间双二倍体 (*C. hytivus* Chen & Kirkbride,  $2n=38$ ) 和异源三倍体 ( $2n=26$ , HCC) 的基础上, 罗向东 (2006) 以酸黄瓜、不同基

因型的栽培黄瓜、异源三倍体、双二倍体等为核心材料,获得了2个“黄瓜-酸黄瓜”单体异附加系<sup>[11]</sup>。

据研究,整套植物单体附加系之间的传递率存在很大差异。在马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 染色体附加到番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 染色体组形成的马铃薯-番茄单体附加系中,马铃薯第九号染色体传递率的变化范围为0%~32%,而第十号染色体的传递率约为24%<sup>[12,13]</sup>。Shigyo等(2003)对洋葱-大葱的8个单体附加系进行研究发现,传递率变化范围为9%~49%<sup>[14]</sup>。Kaneko(2003)等报道,甘蓝-油菜单体附加系3个连续世代的平均传递率的变化范围为26%~44%<sup>[15]</sup>。总之,一般情况下植物单体附加系世代间传递率低于50%。

## 2. 甜菜单体附加系的创立和传递性

白花甜菜属 (*Beta Corolliflora* Zoss) 白花甜菜组 (*Corollinae section*), 是甜菜属的野生种之一。Barocka(1841)报道,白花甜菜具有抗病、抗寒、无融合生殖等优异特性<sup>[16]</sup>。Jassem等(1990)证实,甜菜属白花甜菜多倍体物种中存在无融合生殖现象<sup>[17]</sup>。世界上很多学者试图通过栽培甜菜 (*Beta vulgaris*) 与白花甜菜杂交,开发及转移野生种的优异特性,但杂交后代很难传递下去。郭德栋等(1988)通过二倍体栽培甜菜 (*Beta vulgaris* L. VV,  $2n=18$ ) 与四倍体野生白花甜菜 (*B. corolliflora* Zoss. CCCC,  $2n=36$ ) 进行远缘杂交,获得了真实杂种  $F_1$  代 VC88-1 (VVCC,  $2n=36$ )。VC88-1 与栽培甜菜回交,获得了异源三倍体甜菜 (VVC,  $2n=27$ )。异源三倍体甜菜进一步与栽培甜菜回交,在回交后代中筛选到了1套完整的栽培甜菜基因组带有白花甜菜染色体的单体附加系 ( $VV+1C_1-9$ ,  $2n=18+1$ ), 如图1-1所示。带有白花甜菜染色体的栽培甜菜单体附加系,由于形成配子时白花甜菜单个染色体在减数分裂时不配对,随机分向两极,故其单体附加系传递率通常不超过50%。实际上,由于带有白花甜菜染色体的配子 ( $9+1$ ) 生活力下降,所以

单体附加系传递率一般不超过 20%<sup>[18]</sup>。但是, 白花甜菜第九号染色体附加到栽培甜菜染色体组而形成的单体附加系 MAAL9 品系, 却具有世代间近 100% 的稳定高频传递特性<sup>[19]</sup>。

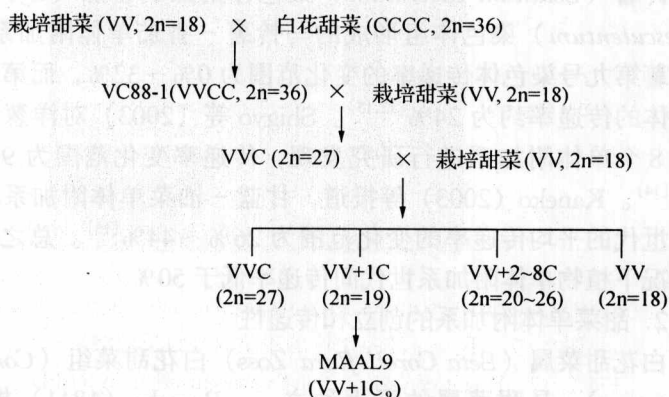


图 1-1 甜菜单体附加系的获得

Fig.1-1 Breeding of the monosomic addition line of sugar beet

## 二、植物单体附加系高频传递机制

一般情况下, 行孟德尔式遗传的植物单体附加系的传递率不会大于 50%, 而甜菜单体附加系 MAAL9 却具有高频传递特性。这种现象出现的原因主要有两种可能: 一种是因为附加的染色体为杀配子染色体, 另一种是由于无融合生殖机制在起作用。

### 1. 植物杀配子染色体

(1) 杀配子染色体的发现 Maguire 等 (1963) 曾经报道过 1 个高频传递的玉米带有摩擦禾染色体的单体附加系<sup>[20]</sup>。Maguire 以高频传递的玉米单体附加系为母本, 以携带显性标记性状的玉米为父本杂交, 所有的  $F_1$  个体都表现父本所携带的显性标

记性状,表明该玉米单体附加系进行的是有性生殖,母本形成的种子有受精行为,未发生孤雌生殖。以后,Endo (1975)把离果山羊草 (*Aegilops triuncialis*,  $2n=28$ , CCCC) 与普通小麦 ( $2n=42$ , AABBDD) 杂交,用普通小麦做轮回亲本与杂种连续回交,发现回交后代材料持续表现育性下降,并且在染色体组中总是保留着1条来自离果山羊草的近端着丝粒染色体<sup>[21]</sup>。研究表明,这条染色体上存在着1个或几个基因,能够选择性地引起缺少这条染色体的配子不育。这样,可以使带有这条染色体的配子正常存活,而使无该染色体的配子发生染色体断裂,从而产生缺失、易位等染色体畸变而使之致死或半致死,并保证这条外源染色体的优先传递<sup>[22]</sup>。由于这条染色体可以引起缺少它的配子败育,并保证自身的优先传递,因而被称为杀配子染色体<sup>[23]</sup>,或被称为“布谷鸟”(杜鹃)染色体<sup>[24,25]</sup>。Maguire (1963)创造的玉米单体附加系高频传递的原因,就是由于附加的摩擦禾染色体为杀配子染色体或携带杀配子基因<sup>[20]</sup>。后来还发现来自 *Agropyron*, *Elymus*, *Trinopyrum* 和 *Oryza* 属一些物种的某些染色体,也有杀配子功能<sup>[26,27,28]</sup>。

(2) 杀配子染色体的作用机制及其应用 迄今为止,关于植物杀配子染色体的作用机制还不十分清楚。Endo (1990)经过多年研究认为,在减数分裂后期缺少杀配子染色体的减数孢子在形成配子过程中的有丝分裂阶段发生了染色体断裂<sup>[25]</sup>。这种断裂引起的染色体畸变是致死或半致死的,结果使得在后代群体中来自母本的个体大部分携带有这条染色体。也就是说,杀配子染色体具有双重功能,它能使缺少它的细胞发生染色体畸变,同时又保护含有它的细胞中的染色体免受杀配子作用。

Tsujimoto 等 (1985)<sup>[29]</sup> 和 Endo (1988)<sup>[30]</sup> 报道,柱穗山羊草 2C 杀配子染色体在不同普通小麦遗传背景中杀配子能力不同。在不完全杀配子作用下,可诱导各种类型的染色体结构变异,变异频率高达 10%~20%,这在麦类植物协同进化中有特

殊意义<sup>[31,32]</sup>。李集临等 (2003)<sup>[33]</sup> 和孙仲平等 (2004)<sup>[34]</sup> 的研究结果, 也证明柱穗山羊草 2C 染色体可以诱导中国春-偃麦草以及中国春-黑麦二体附加系发生易位、缺失等染色体畸变。李红美等 (2005)<sup>[35]</sup> 利用抗白粉病烟农 15-中间偃麦草小麦二体附加系与农林 26-离果山羊草 3C 染色体小麦二体附加系杂交, 对其  $F_1$ ,  $F_2$  和  $F_3$  的细胞遗传学进行研究。结果表明, 在减数分裂过程中出现染色体构型紊乱、落后染色体、染色体桥等现象。因此, Endo (1996)<sup>[36]</sup> 将杀配子染色体称之为“活体诱变剂”。利用杀配子染色体可诱导异种染色体断裂与重接的效应, 创造了“中国春”普通小麦的 436 个缺失系, 应用这些缺失系构建了小麦所有 21 条染色体的物理图谱<sup>[34]</sup>。袁建华等 (2003) 利用杀配子染色体创造了普通小麦-大赖草异易位系, 为将大赖草抗逆、抗病基因引入小麦提供了 1 条新路子<sup>[37]</sup>。Shi 等 (2005) 利用 2C 杀配子染色体诱发中国春小麦背景中黑麦 1R 染色体结构变异, 创建了 1R 染色体缺失遗传材料, 其可用于黑麦 1R 染色体上重要农艺性状基因的定位<sup>[38]</sup>。

## 2. 植物无融合生殖

植物无融合生殖 (Apomixis), 是指不经过精卵融合而以种子进行繁殖的 1 种特殊的无性生殖方式<sup>[39]</sup>。对于没有精卵融合产生的二倍体子代, 其基因型与母本精确相同, 使子代继承亲代固有遗传特性, 形成遗传上稳定的、可由种子繁殖的无性系。植物无融合生殖可以固定有利基因型, 改变育种程序及种子生产过程, 具有重大的经济意义<sup>[40]</sup>。

(1) 无融合生殖的发现 植物无融合生殖现象最早是由 Smith 于 1841 年在雌雄异株的三捻莒属植物 *Alchornea ilifolia* 中发现的。1866 年, 孟德尔在完成豌豆杂交实验后, 试图利用山柳菊重复其实验结果。然而, 当他完成大量的杂交组合实验后, 却发现结果同他总结出的经典遗传理论并不吻合。这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, 目前已在被子植物的 400 多个物种中发现无融合生殖现象<sup>[31]</sup>。

(2) 无融合生殖的分类及遗传机制 目前, 植物无融合生殖主要有 2 种分类方式, 一种是根据无融合生殖发生的完全程度, 可分为专性无融合生殖和兼性无融合生殖两种; 另外一种是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 2 类<sup>[42]</sup>。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) 2 类。

植物无融合生殖的遗传机制主要有 2 种观点<sup>[43]</sup>, 即单基因控制论和多基因控制论。Nogler (1984)<sup>[44]</sup>在金风花 (*Ranunculus auricomus*) 中和 Savidan (1982)<sup>[45]</sup>在非洲狼尾草中均发现孢子体无融合生殖植物遵循单基因孟德尔法则分离。例如, 在二倍体孢子生殖的摩擦禾和玉米杂交的  $F_1$  中, 二倍体孢子生殖和有性生殖的比例为 1:1, 从而推断摩擦禾的二倍体孢子生殖是由 1 个显性基因控制的。随后的研究表明一些配子体无融合生殖植物同样遵循单基因孟德尔法则分离。Barcaccia (2001) 利用植物生长测验和 AFLP 连锁分析对早熟禾无融合生殖遗传规律进行研究, 结果支持单基因控制学说<sup>[46]</sup>。

在蒲公英有性生殖二倍体和无融合生殖三倍体的杂交实验中, 发现控制无融合生殖的 2 个过程, 即二倍体孢子形成和孤雌生殖的基因是不连锁的<sup>[47]</sup>。蔡雪等 (1997) 研究得出, 水稻 84-15 的无融合生殖和高粱 SSA-1 的自交结实受双隐性基因控制<sup>[48]</sup>。对专性无融合生殖材料巴费尔草 (*Cenchrus ciliaris*) 的研究表明, 显性基因 B 控制有性生殖并对控制无融合生殖的显性基因 A 有上位性, 无融合生殖基因型为 Aabb 和 AAbb<sup>[49]</sup>。孢子体无融合生殖范围较广, 至少 52 个科中存在这种现象<sup>[50]</sup>。有关孢子体无融合生殖, 目前研究最多的是柑橘类植物<sup>[51]</sup>。研究表明, 有性生殖和无融合生殖均发生在胚珠内, 并且不定胚发育



通常依赖于有性生殖过程产生的胚乳,但是受精对于不定胚生殖并不是必需的。Garcia 等 (1999) 用 69 个分子标记分析了柑橘属植物 *volkameriana* × *poncirus trifoliata* 后代,结果显示柑橘属植物不定胚的遗传机制是复杂的,至少含有 6 个基因位点<sup>[52]</sup>。所有这些表明,无融合生殖性状可能受多基因控制。

### (3) 无融合生殖的鉴定方法

1) 形态鉴别。Hanna 等 (1995) 提出了 7 种可初步识别无融合生殖的形态特征<sup>[53]</sup>: 一是异花授粉植物中产生整齐一致的后代或典型的母本后代; 二是同一母本的不同  $F_1$  代出现相同类型; 三是两性状截然不同的亲本杂交后其  $F_2$  代不分离或分离很少; 四是用具有显性标记基因的亲本花粉给 1 个隐性亲本授粉, 其杂交后代表现为隐性性状; 五是在非整倍体、三倍体、远缘杂交或预期不育的植株中, 其种子育性很高; 六是非整倍体或杂合体稳定遗传; 七是 1 籽多苗 (多胚) 现象、多柱头、1 小花多胚珠及融合子房等。

2) 显微观察法。显微观察法是鉴定植物无融合生殖最直接和最有效的方法之一, 目前常用的主要有胚胎学观察法、胼胝质的沉积观察法、染色体数目观察法、细胞 DNA 含量显微分光光度法和电子显微镜观察法等几种<sup>[54]</sup>。

3) 生化鉴定法。生化鉴定法主要有化学成分分析法和同工酶法 2 种。前者利用气象色谱或分光光度计等高灵敏分析仪器结合试剂进行显色反应, 无融合生殖后代表现与母本同样反应; 而有性生殖后代表现与亲本不同的颜色或为中间色或接近父本。化学成分分析法已用于柑橘种类、品种和杂种实生苗与珠心苗的鉴别。后者借助于过氧化物酶等同工酶酶谱, 利用无融合生殖产生的群体植株表现整齐度较高, 而有性生殖产生的群体植株整齐度较低的特性来区分。

4) 分子生物学方法。近年来, 分子标记等分子生物学技术的发展和广泛应用, 为植物无融合生殖鉴定提供了新方法。目

前,应用于植物无融合生殖鉴定的 DNA 分子标记,主要有 RFLP (Restriction fragment length polymorphisms, DNA 限制性片段长度多态性)、RAPD (Random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA)、AFLP (Amplified fragment length polymorphisms, 扩增片段长度多态性) 和 SSR (Simple sequence repeats, 简单序列重复) 等。

### 三、遗传标记及其应用

遗传标记 (Genetic markers) 是指可以明确反映遗传多态性的生物特征。从孟德尔将豌豆 (*Pisum sativum*) 的形态性状作为最初的遗传标记开始,遗传标记经历了形态标记 (morphological marker)、细胞标记 (cytological marker)、生化标记 (biochemical marker) 和分子标记 (molecular marker) 等 4 个主要的阶段<sup>[55]</sup>, 经历了由少量到大量、由粗放到精确、由宏观到微观的发展过程。

#### 1. 形态标记

形态标记是指那些能够明确显示遗传多态性的外观性状,即植物的外部特征,如株高、穗长、叶形、叶质、花色、粒色、千粒重等<sup>[56]</sup>。其具有直观、快速、简便、可靠的优点。典型的形态标记用肉眼即可识别和观察,广义的形态标记还包括那些借助简单测试可以识别的某些性状或生理特性。形态标记是人们最早利用的遗传标记。早在 19 世纪中期,奥地利学者孟德尔在其著名豌豆杂交实验中,就是利用 7 对形态特征差异明显的相对性状,对豌豆分离群体进行分类,提出了“遗传因子”假说,并由此发现了生物遗传的分离规律和独立分配规律。利用具有显性形态标记性状的材料做父本,给具有隐性相对性状的母本授粉,根据杂种  $F_1$  代是否具有显性标记性状表型判断杂交是否成功,是一种研究母本株形成种子过程中是否接受了外来遗传物质的简便、有效方法。但形态标记数量少,鉴别标记的基因有限,多态性较差,易受环境、生育期及基因显隐性等因素的影响,因此其