

雌雄异株植物性别连锁的 DNA 标记

高武军^{1,2}, 洪达¹, 肖理会¹, 邓传良¹, 卢龙斗^{1,*}

¹河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007; ²河南大学生命科学学院, 河南开封 475001

DNA Markers of Sex-linkage in Dioecious Plants

GAO Wu-Jun^{1,2}, HONG Da¹, XIAO Li-Hui¹, DENG Chuan-Liang¹, LU Long-Dou^{1,*}

¹College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China; ²College of Life Science, Henan University, Kaifeng, Henan 475001, China

摘要: 文章结合作者的研究结果, 对近 10 年来分子标记技术, 包括 RAPD、AFLP、SSR、ITRs 及 Y 染色体特殊序列等标记在雌雄异株植物性别决定研究中的应用进展作了介绍和分析。

关键词: 雌雄异株; DNA 标记; 性别连锁

一样, 也是受遗传物质控制的。从植物性别研究来说, 雌雄异株植物无疑是一个较为理想的研究系统, 但它在植物界所占比例很少。Yampolsky 和 Yampolsky (1922) 在调查过的 12000 种被子植物中, 发现仅 4% 是严格的雌雄异株 (dioecism) 植物。它们主要分布于 6 个双子叶植物亚纲和 5 个单子叶植物亚纲中 (Renner 和 Ricklefs 1995)。目前, 通过对白麦瓶草 (*Silene latifolia*)、酸模 (*Rumex acetosa*)、芦笋 (*Asparagus officinalis*) 等一些典型的雌雄异株植物的遗传及分子生物学的研究, 增加了人们对植物性别决定基因及性别决定机制、植物性别的发育及其进化的认识。

作为一种基础的分子生物学技术, DNA 分子标记可以建立物种的遗传图谱, 对功能基因的克隆、系统演化、辅助育种的研究意义很大; 同时也有助于性状的鉴定和揭示生物体基因组结构的特征。雌雄异株植物由于雌雄株个体的主要性状差异表现在性别上, 而这种差异表现的本质又在于其遗传物质的组成, 因此采用分子标记技术可以快速、方便地获得雌雄性别的鉴定标记, 也可为进一步比较雌雄性别的分子机制差异提供参考。

1 随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记

RAPD 作为一种最为常用的标记在雌雄异株植物性别差异的研究中已广泛应用, 并获得了大量的雄性连锁的 RAPD 标记, 说明大多数雌雄异株植物的性别决定属于 XY 型。在雌雄异株植物性

别连锁的 RAPD 标记研究中, 一个最受到人们关注的问题是从 XY 型性别决定的雌雄异株植物上获得了雌性连锁标记 (董莉娜等 2007; 卢龙斗等 2006; Lu 等 2006; Xu 等 2004)。Xu 等 (2004) 在罗汉松中发现一个雌性 RAPD 标记 MSDE, 并成功转化为序列特异扩增区域 (sequence characterized amplified region, SCAR) 标记, MSDE 的 Southern 杂交分析也显示是雌性特有的标记。而此后也有多人分别在芦笋和银杏中各获得一个雌性性别连锁的 RAPD 标记, 并转化为雌性特异的 SCAR 标记 (卢龙斗等 2006; Lu 等 2006; Gao 等 2007), 但基因组 Southern 杂交的结果却显示出雌雄都有杂交信号, 究其原因可能是在雄性基因组中相关序列的排列阻止了标记作为一个单一整体被扩增, 或者扩增过程中出现 RAPD 引物特定扩增某一区域的序列的可能。当然也不排除这些序列是由于和雌性性别决定基因紧密连锁而被扩增, 或者具有这些序列标记的 X 染色体可能是从雄性亲本遗传来的, 总之, 其中原因还不清楚。我们认为这些研究结果的出现也和雌雄异株植物性别进化尚处于早期阶段的特征相符合, 在这一阶段性染色体之间仍可能存在少量的重组, 这些少量的重组会造成 RAPD 扩增出的标记在基因组 Southern 杂交都有信号出现。在雌雄异株植物 *Uapaca kirkiana* 中

收稿 2007-10-27 修定 2008-01-05

资助 河南省自然科学基金 (2006180014)。

* 通讯作者 (E-mail: lld5910@yahoo.com)。

发现的扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记(Mwase 等 2007)甚至哺乳动物(Reinhard 2007)中也发现有类似现象。

2 AFLP 标记

AFLP 标记是荷兰 Keygene 公司发展的一种 DNA 指纹技术, 已广泛用于雌雄异株植物的性别特异性标记的研究。Terauchi 和 Kahl (1999)在构建山萹苈(*Dioscorea tokoro*)的遗传图谱时发现 10 个 AFLP 标记位于性染色体上。Reamon-Büttner 和 Jung (2000)在芦笋中获得 9 个与性别位点连锁的 AFLP 标记, 其中 3 个与性别决定位点紧密连锁, 这些标记可用于雌雄植株的鉴定。Peil 等(2003)用 AFLP 标记表明大麻的性染色体上有一个假常染色体区(pseudoautosomal region, PAR)。Parrish 等(2004)从黄毛榕(*Ficus fulva*)中获得一个雄性特异性 246 bp 的 AFLP 片段, 这暗示无花果也可能是雄性异配性别, 并且该 AFLP 标记转换成的 SCAR 标记可在雌雄株中均扩增出大小相等的片段, 表明雄性和雌性特异的染色体区的趋异性是很低的。Stehlik 和 Blattner (2004)在叶蓼(*Rumex nivalis*)中获得一个 164 bp 雄性特异性 AFLP 片段, 并将其转化为 SCAR 标记, 此标记是串联重复的非编码 DNA。

3 简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)

SSR 又称为微卫星 DNA, 这些序列广泛存在于真核细胞的基因组, 由于串联重复的数目是可变的而呈现出高度多态性, 可用于雌雄异株植物性别决定和分化的研究。虽然早在 1982 年, Singer 就已发现人类 Y 染色体特异的微卫星 DNA 标记, 并且在雌雄同花的植物如拟南芥中也分离出微卫星 DNA 序列, 但在雌雄异株中分离性别特异的微卫星 DNA 序列标记的研究却较少。Parasnis 等(1999)用微卫星(GATA)₄探针鉴定的 1 个 5 kb 的特异带仅出现在雄株中, 表明微卫星标记和性别的差异有关。单一物种的微卫星 DNA 序列的研究不仅可以获得性别鉴定的标记, 而且还可以为该物种性染色体的确定和进化研究提供证据。另外, 通过不同科、属雌雄异株植物的微卫星 DNA 的系统比较也可能获得性别决定进化的有益的信息。

4 Y 染色体特有的重复序列

在 XY 性别决定的雌雄异株植物中, 从 Y 染

色体上寻找特异的序列或功能基因一直是研究的热点之一。酸模的雄性具有 2 个 Y 染色体 Y₁Y₂。Shibata 研究小组在酸模 Y 染色体结构和形态改变的研究中发现 2 个特异的序列 RAYSI (Shibata 等 1999)和 RAE180 (Shibata 等 2000), 2 个序列都是 Y 染色体特异的重复序列, 并且二者无同源性, 在 X 染色体上不存在同源序列。其中 RAE180 除了存在于 2 条 Y 染色体上以外, 在第 1 和第 4 号常染色体上也存在。分析这些序列标记的特征可以更好地了解酸模的 Y 染色体可能的进化过程。首先是其祖先的性染色体 XY 的重组受到抑制, 然后形成 XY 的性染色体系统, 同时类似于 RAE180 和 RAYSI 的序列也在 Y 染色体上大量累积, 最后 Y 染色体可能断裂而形成 Y₁Y₂ 两条性染色体。但是为什么在性染色体上形成到 XY 阶段的时候性染色体的进化并没有停止, 而是最终形成 XYY, 这是偶然事件, 还是其物种适应性进化的需要呢? 这些问题还不清楚。以 RAYSI 和 RAE180 作为探针和多色荧光原位杂交的研究发现处于不同地理区域的酸模的 4 个群体的 Y 染色体的 2 条 Y 染色体的长度、臂比值、结构特征均呈现 3 种类型(Shibata 等 1999, 2000)。这种同一物种 Y 染色体的多态性说明该物种的性染色体的进化正处于一个最不稳定的时期。显然对性染色体的结构特征的进一步分析可以更好地揭示其进化、功能和结构特征。

5 染色体间隙类端粒重复序列(interstitial telomere-like repeats, ITRs)及 ITR 邻近序列(ITR-adjacent sequences, IASs)

雌雄异株植物性别决定研究中一个重要的问题是性染色体的起源, 目前广泛接受的观点是性染色体起源于一对同型常染色体(Charlesworth 1996), 在进化过程中, 这对染色体重组被抑制, 一些突变被积累在上面, 同时通过染色体重排(如易位或末端到末端的融合)而形成异型的性染色体。在染色体重排的过程中端粒是一个重要的染色体结构, 它位于线性染色体的末端, 对于染色体末端的保护和染色体长度的保持是非常重要的, 通过对端粒特殊序列的研究可以进一步揭示染色体的进化历程。目前已经发现的 ITRs 序列就是这种染色体重排的重要证据之一。ITRs 是端粒的染色体内部区域的同源序列, 该序列的存在和基因组的不稳定性相关的, 包括染色体断裂和复原

(Biessmann 和 Mason 1994)。有人对多种雌雄异株植物和动物(Gortner 等 1998; Hizume 等 1998)的 ITRs 分析发现,不同物种的起源、染色体定位、序列特征和重复序列的长短是不同的。大多数的 ITRs 被认为是来自于端粒介导的染色体重排,而这种染色体的重排是染色体进化中非常有效的过程。通过原位杂交技术也发现在多种植物和动物的性染色体间隙中也发现了端粒的同源序列(Meyne 等 1990; Fuchs 等 1995; Gortner 等 1998; Hizume 等 1998)。Matsunaga 等(1999)发现白麦瓶草的性染色体上有亚端粒重复序列,这些序列累积在 X 染色体的两个末端和 Y 染色体的一个末端。Y 染色体的另一末端上的这种序列的缺失可能和 Y 染色体通过断裂融合形成过程有关。

另外, ITRs 邻近序列 IASs 在不同的种间(Mao 等 1997; Uchida 等 2002a)甚至同一种内(Riha 等 1998)也是明显不同的,但是在同一物种中具有序列一致性。Uchida 等(2002b)从白麦瓶草中分离到多个小的 ITRs, 这些 ITRs 两端具有同源的 IASs。对其中一个 IAS-d 的 FISH 原位杂交分析说明端粒介导的染色体重排出现在白麦瓶草性染色体的间隙区域。Uchida 等(2002b)认为 IAS-d 首先在常染色体的亚端粒区累积,然后亚端粒部分区域通过染色体重排可能移动到间隙区域,例如末端到末端的融合或转位。显然,在白麦瓶草中,性染色体的 ITRs 和 IASs 序列是性染色体进化的重要标记,对这一类 DNA 重复序列标记的进一步研究,将有助于性染色体起源奥秘的揭开。

6 结语

雌雄异株植物中雄性基因组包括 3 个部分:常染色体(autosome)、X 和 Y 染色体,雌性基因组包括 2 个部分,即常染色体和 X 染色体。Y 染色体是雌雄个体基因组间唯一不同的部分,这种不同不仅仅在于 Y 染色体是唯一的大部分染色体部分不能重组的染色体,而且是仅仅存在于雄性中的永久的单倍性染色体, Y 染色体和 X 染色体具有共同的祖先和稳固的减数分裂关系,其上面的基因趋向退化。采用现代分子生物学技术寻找雌雄基因组间的差异部分就有可能获得雌雄性别形成的奥秘,其中分子标记技术是最快速、实用的方法。

此外,由于雌雄异株植物的天然异交方式也

增加了分子标记研究的复杂性。天然的异交方式会增加研究材料群体内个体之间的遗传多态性,以致采用分子标记获得的雌雄特异序列标记往往不一定就是和性别相关的,因此从研究材料的选择来说,天然群体显然不宜用分子标记方法分析雌雄基因组之间的差异。因此,用单倍体培养建立除性别以外的遗传上一致的 DNA 池或者用染色体分拣技术建立 XY 性染色体的 DNA 池作为分子标记扩增的模板,将有可能更有效地得到性别连锁的标记。同时,结合多色荧光原位杂交等技术可能会更有效地推动分子标记技术在雌雄异株植物性别决定研究中的应用。

作为植物遗传学领域一个新的研究热点问题来说,雌雄异株植物性别决定及分化的关键理论尚未获得大的突破,一些新的研究思路 and 方向也在不断探索中。例如在表观遗传学方向中,最近发现 miRNA (Aukerman 和 Sakai 2003; Nick 等 2005)和组蛋白的乙酰化(Sung 和 Amasino 2004a, b)都可能参与植物生殖器官的分化过程,这也暗示雌雄异株植物性别决定可能是一个系统的、复杂的决定过程。进化遗传学与发育遗传学相结合(Meagher 2007)所建立的单性花发育全过程和基因差异表达变化的平行关系模型,对这两个平行模型比较有可能获得控制性别发育的关键基因。此外,黄瓜是植物性别表达研究雌雄同株异花的一种模式材料,其性别发育和控制研究相对比较成熟,人们已在一定程度上阐明了其性别表现与关键基因的作用之间的关系(陈惠明等 2005)。这些研究对雌雄异株植物性别决定来说也都有一定的参考价值。

参考文献

- 陈惠明, 卢向阳, 许亮, 易克, 田云(2005). 黄瓜性别决定相关基因和性别表达机制. 植物生理学通讯, 41 (1): 7~13
- 董莉娜, 孙坤, 苏雪, 张黎, 丁松爽, 马瑞君(2007). 与棱果沙棘性别相关的 RAPD 标记. 植物研究, 27 (1): 73~76
- 卢龙斗, 李瑞丽, 高武军, 邓传良, 王连军(2006). 芦笋雌性特异性片段的克隆和分析. 分子细胞生物学报, 39 (3): 305~308
- Aukerman MJ, Sakai H (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its *APETALA2*-like target genes. *Plant Cell*, 15: 2730~2741
- Biessmann H, Mason JM (1994). Telomeric repeat sequences. *Chromosoma*, 103: 154~161
- Charlesworth B (1996). The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr Biol*, 6: 149~162

- Fuchs J, Brandes A, Schubert I (1995). Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Plant Syst Evol*, 196: 227~241
- Gao W-J, Li R-L, Li SH-F, Deng CH-L, Li S-P (2007). Identification of RAPD and SCAR markers linked to the sex locus in dioecious *Asparagus officinalis* plant. *Russ J Plant Physiol*, 54 (6): 816~821
- Gortner G, Nanno M, Weising K, Zink D, Nagl W, Kahl G (1998). Chromosomal localization and distribution of simple sequence repeats and the *Arabidopsis*-type telomere sequence in the genome of *Cicer arietinum* L.. *Chromosome Res*, 6: 97~104
- Hizume M, Kurose N, Shibata F, Kondo K (1998). Molecular cytogenetic studies on sex chromosomes and proximal heterochromatin containing telomere-like sequences in *Cycas revoluta*. *Chromosome Sci*, 2: 63~72
- Lu L-D, Li R-L, Gao W-J (2006). Identification of RAPD makers linked to the male sex in dioecious *Ginkgo biloba* L.. *Genetica si Biologica Moleculara*, 2: 176~182
- Mao L, Devos KM, Zhu L, Gale MD (1997). Cloning and genetic mapping of wheat telomere-associated sequences. *Mol Gen Genet*, 254: 584~591
- Matsunaga S, Kawano S, Michimoto T, Higashiyama T, Nakao S, Sakai A, Kuroiwa T (1999). Semi-automatic laser beam microdissection of the Y chromosome and analysis of Y chromosome DNA in a dioecious plant, *Silene latifolia*. *Plant Cell Physiol*, 40: 60~68
- Meagher TR (2007). Linking the evolution of gender variation to floral development. *Ann J Bot*, 100: 165~176
- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyzis RK (1990). Distribution of non-telomeric sites of the (TTTAGGG)_n telomeric sequences in the vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, 99: 3~10
- Mwase WF, Erik-Lid S, Bjørnstad Å, Stedje B, Kwapata MB, Bokosi JM (2007). Application of amplified fragment length polymorphism (AFLPs) for detection of sex-specific markers in dioecious *Uapaca kirkiana* Muell. *Arg African Biotechnol*, 6 (2): 137~142
- Nick L, Archana K, Shawn C, Mark G, Stephen PM (2005). microRNA172 down-regulates glossy15 to promote vegetative phase change in maize. *Proc Nat Acad Sci USA*, 102 (26): 9412~9417
- Paranis AS, Ramakrishna W, Chowdari KV (1999). Microsatellite (GATA)_n reveals sex-specific differences in papaya. *Theor Appl Genet*, 99 (6): 1047~1052
- Parrish TL, Koelewijn HP, van Dijk PJ (2004). Identification of a male-specific AFLP marker in a functionally dioecious fig, *Ficus fulva* Reinw. ex Bl. (Moraceae). *Sex Plant Reprod*, 17: 17~22
- Peil A, Flachowsky H, Schumann E, Weber WE (2003). Sex-linked AFLP markers indicate a pseudoautosomal region in hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 107: 102~109
- Reamon-Büttner SM, Jung C (2000). AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L.. *Theor Appl Genet*, 100: 432~438
- Renner SS, Ricklefs RE (1995). Dioecy and its correlates in the flowering plants. *Am J Bot*, 82: 596~606
- Riha K, Fajkus J, Siroky J, Vyskot B (1998). Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants. *Plant Cell*, 10: 1691~1698
- Shibata F, Hizume M, Kuroki Y (1999). Chromosome painting of Y chromosome and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequences in the dioecious plant *Rumex acetosa*. *Chromosoma*, 108: 266~270
- Shibata F, Hizume M, Kuroki Y (2000). Differentiation and the polymorphic nature of the Y chromosomes revealed by repetitive sequences in the dioecious plant, *Rumex acetosa*. *Chromosome Res*, 8: 229~236
- Singer MF (1982). Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int Rev Cytol*, 76: 67~112
- Stehlik I, Blattner FR (2004). Sex-specific SCAR markers in the dioecious plant *Rumex nivalis* (Polygonaceae) and implications for the evolution of sex chromosomes. *Theor Appl Genet*, 108: 238~242
- Sung S, Amasino RM (2004a). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature*, 427: 159~164
- Sung S, Amasino RM (2004b). Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 4~10
- Szibor R (2007). X-chromosomal markers: past, present and future. *Forensic Science International: Genetics*, 1: 93~99
- Terauchi R, Kahl G (1999). Mapping of the *Dioscorea tokoro* genome: AFLP markers linked to sex. *Genome*, 42 (4): 752~762
- Uchida W, Matsunaga S, Sugiyama R, Kawano S (2002a). Interstitial telomere-like repeats in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Genes Genet Syst*, 77: 63~67
- Uchida W, Matsunaga S, Sugiyama R, Shibata F, Kazama Y, Miyazawa Y, Hizume M, Kawano S (2002b). Distribution of interstitial telomere-like repeats and their adjacent sequences in a dioecious plant, *Silene latifolia*. *Chromosoma*, 111: 313~320
- Xu W-J, Wang B-W, Cui K-M (2004). RAPD and SCAR markers linked to sex determination in *Eucommia ulmoides* Oliv.. *Euphytica*, 136 (3): 233~238
- Yampolsky C, Yampolsky H (1922). Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. *Bibliotheca Genet*, 3: 1~62