



利用荧光标记高通量鉴定减数分裂重组抑制突变体

李帆, 阮继伟*

云南省农业科学院花卉研究所, 国家观赏园艺工程技术研究中心, 云南省花卉育种重点实验室, 昆明 650200

摘要 正向遗传学突变体筛选被广泛用于揭示减数分裂中涉及的遗传基因, 如调控减数分裂II型交叉形成途径的重组抑制基因。该研究利用拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)花粉荧光标记系进行EMS突变体的正向遗传学筛选, 鉴定拟南芥野生型Col遗传背景下的重组抑制突变体, 共获得18个重组率显著提高3倍以上的重组抑制突变体, 其中包括显性和隐性遗传突变。研究表明, 基于荧光标记高通量鉴定重组抑制突变体是可行的, 可为植物减数分裂重组调控分子机制研究提供新方法和突变材料。

关键词 减数分裂, 重组抑制突变体, 荧光标记, 高通量可视分析法

李帆, 阮继伟 (2019). 利用荧光标记高通量鉴定减数分裂重组抑制突变体. 植物学报 54, 522–530.

减数分裂重组对生物进化和遗传多样性至关重要, 是植物育种的基础生物学过程。首先, 其在姐妹染色单体之间形成物理性交叉, 确保减数分裂同源染色体的精准分离, 而错误的同源染色体分离是植物育性降低和非整倍体形成的重要因素; 其次, 同源重组促进DNA遗传物质间相互交换, 产生新的等位基因组合, 并通过配子在后代中形成遗传变异, 提高后代的遗传多样性。因此, 植物减数分裂的重组过程为充分利用植物遗传多样性进行创新育种提供了遗传学基础。

最近, 44个不同物种的基因组研究表明, 尽管不同物种基因组大小存在极大差异, 但重组率波动幅度并不大, 这表明减数分裂重组率受到严格的约束和限制(Fernandes et al., 2018)。在大多数物种中, 78%的染色体重组率低于1.5 cM, 而其中绝大多数染色体的重组率仅为0.5 cM, 这意味着每个配对同源染色体只形成了1个交叉, 这与为保障同源染色体后期的精准分离至少需要形成1个交叉相一致(Jones and Franklin, 2006; Mercier et al., 2015)。在大部分生物中, 交叉的形成和分布受到交叉干涉的影响, 即一个交叉的产生会抑制其沿染色体两侧一定范围内另一个交叉的形成, 导致交叉在染色体上呈非随机分布

(Berchowitz and Copenhaver, 2010)。根据对交叉干扰是否敏感, 可分为干涉敏感型(I型)和干涉不敏感型(II型)交叉(Hatkevich et al., 2017)。近年来, 利用正向遗传学和全基因组测序已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中鉴定出3种减数分裂重组抑制途径: (1) FANCM与其DNA结合辅助因子MHF1/2的解旋酶途径(Crismani et al., 2012; Girard et al., 2014); (2) RECQ4A/B、TOP3 α 和RMI1形成的BTR重组抑制途径(Séguéla-Arnaud et al., 2015, 2017); (3) FIGL1-FLIP复合体调节单链入侵抑制II型交叉形成途径(Girard et al., 2015; Fernandes et al., 2017; Hu et al., 2017)。这3种减数分裂重组抑制途径平行共存, 且通过不同机制限制II型交叉形成(Mieulet et al., 2018)。然而, 在大多数真核生物减数分裂过程中, II型交叉仅占交叉总数的10%左右, 且依赖于MUS81和FANCD2调控途径(Berchowitz et al., 2007; Higgins et al., 2008; Kurzbauer et al., 2018), 绝大多数交叉主要通过I型交叉形成途径产生(Macaisne et al., 2008, 2011; Wang et al., 2012; Lu et al., 2014; Huang et al., 2015)。更重要的是, 同时关闭I型和II型交叉形成途径后, 在拟南芥 *msh4/mus81/fancd2* 突变体中仍然可观察到交叉形成, 这表明还存

收稿日期: 2018-10-30; 接受日期: 2019-02-11

基金项目: 云南省农业联合青年项目(No.2018FG001-075)和云南省基础研究计划

* 通讯作者。E-mail: snruanjiwei@126.com

在其它交叉形成途径(III型) (Higgins et al., 2008; Kurzbauer et al., 2018)。但是, 目前抑制I型和III型交叉形成的基因及其调控途径尚不清楚, 而这些重组调控途径的分子机制对植物育种至关重要。

拟南芥花粉荧光标记系统(fluorescent tagged lines, FTLs)能高通量快速检测染色体特定标记区间的重组率(Yelina et al., 2013), 为高通量筛选减数分裂重组抑制突变体提供了可能。拟南芥花粉荧光标记系统是由一系列T-DNA插入片段编码的荧光标记构成, 由花粉特异性*LAT52*启动子激活, 在花粉中表达红荧光(DsRed)和绿荧光(eYFP), 通过统计花粉荧光标记的分离模式可以测量标记区间的重组率(Francis et al., 2007; Berchowitz and Copenhaver, 2008)。本研究采用正向遗传学方法, 创新性地利用拟南芥花粉荧光标记系统和流式细胞技术对拟南芥野生型Col遗传背景下的EMS突变体进行大规模重组率检测和筛选, 进而获得重组率提高的突变体, 旨在为植物减数分裂重组抑制基因及其调控途径研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料和培养条件

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)野生型和花粉荧光标记系FTL-I2b均为哥伦比亚生态型(Columbia-0)遗传背景, 其中FTL-I2b为纯合荧光标记四分体花粉, 包含1个红荧光标记和1个绿荧光标记(图1)。种子由美国北卡罗莱纳大学Gregory P. Copenhaver教授实验室提供。取干燥的种子用氯气消毒4小时, 播种于MS固体培养基上(2.21 g·L⁻¹ MS盐、10 g·L⁻¹蔗糖、0.5 g·L⁻¹ 2-吗啉乙磺酸、100 mg·L⁻¹肌醇和8 g·L⁻¹植物琼脂, pH5.6), 4℃条件下暗处理48小时后置于20℃、光周期为12小时光照/12小时黑暗条件下培养8天, 将萌发的幼苗移栽于土壤中, 并在相同的生长条件下培养至花蕾抽薹, 之后将光周期调整为长日照(16小时光照/8小时黑暗)以诱导和促进开花。

1.2 实验方法

1.2.1 杂交F₁代种子的制备

由于拟南芥花粉荧光标记系FTL-I2b为纯合荧光标记, 且为四分体花粉表型, 为了利用流式细胞仪进行高通量重组率筛选, 需要半合子荧光标记和单花粉表型进

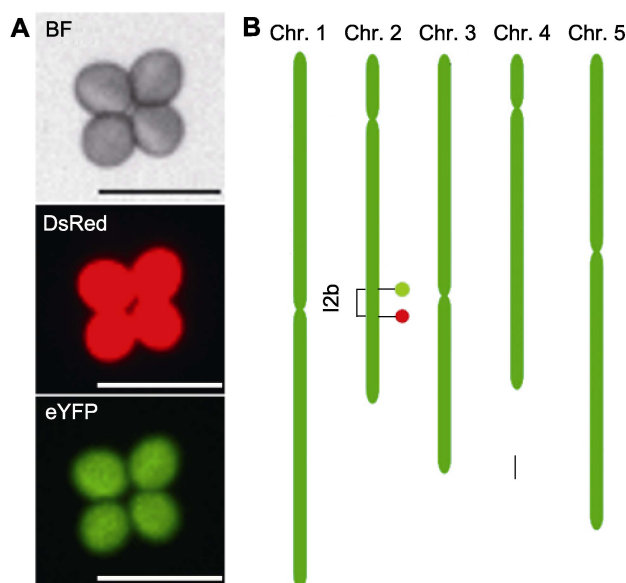


图1 拟南芥花粉荧光标记系FTL-I2b示意图

(A) 拟南芥花粉荧光标记系FTL-I2b四分体花粉荧光显微图, 其包含1个DsRed和1个eYFP标记, 能在不同的荧光激发下分别表达红荧光和绿荧光(Bar=50 μm); (B) 拟南芥花粉荧光标记系FTL-I2b在染色体上的位置示意图(Bar=1 Mb), 红色(下)和绿色(上)椭圆分别代表对应的荧光标记DsRed和eYFP, 并构建出1个I2b标记区间(1.45 Mb)。BF: 明场

Figure 1 A schematic illustration of *Arabidopsis* fluorescent tagged line FTL-I2b

(A) Fluorescence micrograph of a tetrad pollen of FTL-I2b, which contains a DsRed and an eYFP fluorescent marker and expresses red fluorescence and green fluorescence under different fluorescence excitations respectively (Bars=50 μm); (B) The genomic location of FTL-I2b fluorescent markers on the chromosome (Bar=1 Mb), the DsRed and eYFP fluorescent markers are indicated by filled circles colored by red (down) and green (up), respectively, which constructing a I2b interval (1.45 Mb). BF: Bright field

行检测。因此, 将FTL-I2b与Col杂交获得F₁代半合子荧光标记的单花粉植株, F₁代植株的重组率即为该遗传背景下对照的重组率。

1.2.2 EMS诱变

将干燥的F₁代种子(千粒重为0.023 g)装于50 mL离心管中, 加入100 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液并于4℃下浸种12小时; 用新的100 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液置换后, 置于EMS诱变密闭处理箱内(通风橱中进行), 加入二甲基亚砷和EMS (Sigma[®])使最终浓度分别为5%和75 mmol·L⁻¹; 将种子在室温下处理8小时, 期间上下轻微摇动离心管; 将处理后的种子依次用100 mmol·L⁻¹硫代硫酸钠和蒸馏水浸洗10次, 每次

3分钟;最后将处理的种子(M_1 代)转移到滤纸上干燥,完成后放置于种子袋中保存备用(由于处理之后的种子非常脆弱,为避免萌发率降低应尽快种植 M_1 代)。

1.2.3 M_1 代和 M_2 代突变群体

根据理想诱变后幼苗出现白化和毛状等隐性突变表型的标准, M_1 代种子的萌发率约为50%,将萌发后的幼苗分别种植并标号。在 M_1 代突变群体中,可通过检测重组率鉴定出显性重组抑制突变体。待 M_1 代植株自交结实后,分别收集每株自交种子(M_2 代)并标号。在 M_2 代突变群体中,花粉半合子荧光标记和重组抑制突变基因的分离比遵循3/8(显性重组抑制突变体)和1/8(隐性重组抑制突变体)。因此,每组 M_2 代株系种子至少需要筛选8株植株才能达到理论上的不漏筛。

1.2.4 减数分裂重组抑制突变体的筛选

重组抑制突变体的筛选包括荧光标记表型初筛和重组率检测2个步骤。利用荧光显微镜对植物进行荧光标记表型初筛,挑选出半合子荧光标记表型的植株,具体步骤为:在多孔板中加入200 μL 花粉缓冲液(50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_3PO_4 溶液和0.5% Triton-X溶液,pH7.0),在每个孔中分别放入至少5朵待检测植株当天开放的花朵,轻轻震荡多孔板使花粉从花朵中分离,用干净的镊子取出花朵,在荧光显微镜下静置多孔板稍许,并对每个孔进行荧光标记检测,筛选出半合子荧光标记表型的植株。而重组率的检测则利用流式细胞仪对半合子荧光标记植株进行测量,具体包括以下步骤:在2 mL离心管中加入300 μL 花粉缓冲液,放入至少15朵待检测植株当天开放的花朵,大力震荡离心管5分钟使花粉从花朵中分离,用干净的镊子取出花朵,花粉悬浊液用孔径为100 μm 的尼龙网过滤,用流式细胞仪统计花粉荧光标记情况,计算植株的重组率,筛选获得重组率提高的重组抑制突变体。

1.2.5 花粉荧光标记分析及统计

花粉荧光标记分别采用荧光显微镜和流式细胞仪进行分析与统计。使用Olympus IX81倒置荧光显微镜对花粉荧光标记进行拍照筛选,显微镜配备有X-Cite Series 120Q UV荧光汞灯和XM10相机,采用Olympus OlyVIA 2.4软件(<http://www.olympus-sis.com>)对花粉显微图像进行自动拍照和处理。使用BD

FACSVerse流式细胞仪对半合子荧光标记植株的花粉荧光标记进行统计,流式细胞仪配备488 nm和633 nm独立激光器,527/32 nm和586/42 nm滤光片。采用Yelina等(2013)的花粉荧光标记流式分析方法进行统计,花粉荧光标记统计数据由BD FACSuite软件获取。采用Microsoft Excel 2016软件计算重组率,公式为重组率 $= (G+R)/(2GR+G+R) \times 100$,其中G和R分别为单绿色和单红色花粉数量,GR为含有红绿双色花粉的数量。

2 结果与讨论

2.1 FTL-I2b半合子荧光标记重组率及其EMS诱变

由于拟南芥花粉荧光标记系FTL-I2b是纯合荧光标记背景和四分体花粉表型,为了利用流式细胞仪进行高通量重组率筛选,将FTL-I2b与Col杂交获得半合子荧光标记和单花粉表型的 F_1 代(图2)。使用荧光显微镜和流式细胞仪对 F_1 代植株荧光标记进行表达检测,结果显示I2b区间的荧光表达具有稳定性和一致性,该遗传背景下的重组率为 $(4.97 \pm 0.22) \text{ cM}$ ($n=10$)。

为了确定EMS诱变最佳处理时间,我们用75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EMS分别对 F_1 代种子进行不同的时间梯度处理(0、6、7、8和9小时,每个处理400粒种子)。根据理想EMS诱变后50%的种子萌发率及在幼苗中出现白化和毛状等隐性表型的标准(Kim et al., 2006),采用75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EMS处理8小时为最佳诱变处理(图3)。由于EMS诱变在基因组中会产生多个点突变,5 000株 M_1 代突变群体足以满足在任意基因中发现突变的可能(Lukowitz et al., 2000; Qu and Qin, 2014)。同时,受限于 F_1 代杂交种子的制备效率,我们对10 000粒 F_1 代种子进行诱变,获得了5 000多株 M_1 代突变植株。

2.2 重组抑制突变体的正向遗传学筛选

在获得 M_1 代突变群体后,理论上通过重组率筛查可以鉴定出显性重组抑制突变体,但由于 M_1 代群体量大,诱变之后的 M_1 代种子不耐储存(储存7天后种子全部未能萌发),而拟南芥重组率可检测的花期较短(约2周),实际实验过程中,难以在短时间内完成所有植株的重组率筛查。因此,我们只在 M_2 代分离群体中

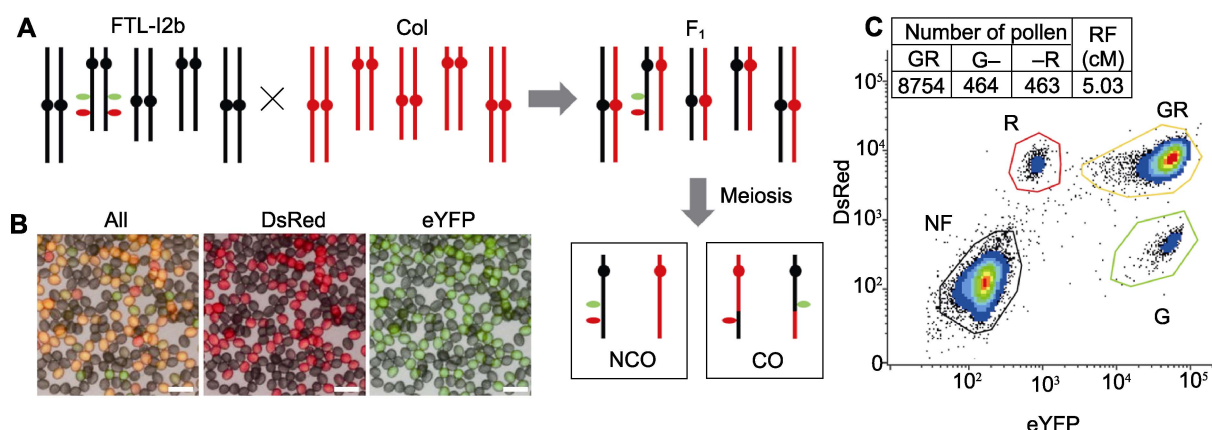


图2 拟南芥FTL-I2b半合子荧光标记(I2b/++)

(A) FTL-I2b与Col杂交示意图, F₁代经过杂交后具有半合子荧光标记, 通过减数分裂形成重组和未重组的配子; (B) 杂交F₁代花粉半合子荧光标记显微图, 图中黄色花粉(GR)为未重组配子, 单红色(R)和单绿色(G)花粉为重组配子(Bars=50 μm); (C) 利用流式细胞仪统计花粉中荧光标记可计算该标记区间I2b的重组率, 计算公式为重组率(RF)=(G+R)/(2GR+G+R)×100。

Figure 2 The *Arabidopsis* hemizygous fluorescent markers (I2b/++) of FTL-I2b

(A) A schematic illustration of FTL-I2b cross with Col, the hybrid F₁ contains a hemizygous fluorescent markers after hybridization, the recombined and unrecombined gametes are formed through meiosis; (B) Fluorescence micrograph of pollen in hybrid F₁ generation, in which yellow pollen (GR) is unrecombined gamete, and monochromatic red (R) and green (G) pollen is recombined gametes (Bars=50 μm); (C) The recombination frequency (RF) of I2b interval can be calculated by counting the fluorescent marker pattern in the gametes via flow cytometry, the formula calculating recombination frequency=(G+R)/(2GR+G+R)×100.

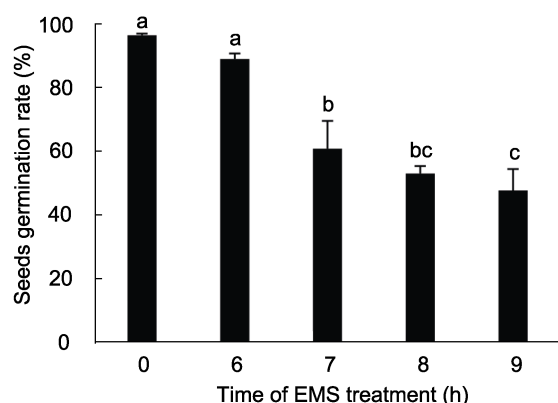


图3 不同时间的EMS (75 mmol·L⁻¹)处理下M₁代拟南芥种子的萌发率

种子萌发率为3次重复的平均发芽率, 不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

Figure 3 The germination rate of M₁ *Arabidopsis* seeds by different treat time using 75 mmol·L⁻¹ EMS

The average germination rate was derived from three repeats, different lowercase letters indicate significant differences (P<0.05).

进行了重组抑制突变体的正向遗传学筛选(图4), 该群体不仅能够重新发现M₁代中的显性重组抑制突变体, 也能鉴定隐性重组抑制突变体。

在M₂代分离群体中, 花粉荧光标记遵循1:2:1的孟德尔遗传定律进行分离和重组, 为了利用流式细胞仪进行高通量筛选, 我们首先通过荧光显微镜鉴定每株M₂代植株的花粉荧光标记情况, 分离出具有半合子荧光标记(I2b/++)的植株进行重组率检测。通过这种方法和策略, 我们不仅鉴定出重组率增加的重组抑制突变体, 还发现了重组率降低的突变体和大花粉突变体(图5)。通过对约12 000株M₂代突变植株重组率进行检测, 发现了281株重组率提高的突变体(≥7 cM)、72株重组率降低的突变体(≤4 cM)和11株大花粉突变体。

在281株重组率提高的突变体中, 有18株突变体的重组率提高了3倍以上(≥15 cM), 我们对其进行了进一步研究。通过与拟南芥野生型(WT)回交, 在18株突变体中鉴定出1个显性重组抑制突变体*drs* (dominant recombination suppressor), 其余为隐性重组抑制突变体*rrs* (recessive recombination suppressor)。目前已报道的9个重组抑制基因均为蛋白功能缺失导致的重组率提高, 表现为隐性性状基因, 而利用拟南芥花粉荧光标记系鉴定出显性重组抑制突变体, 且重组率与野生型相比提高了4倍(21.65 cM: 4.97 cM)。

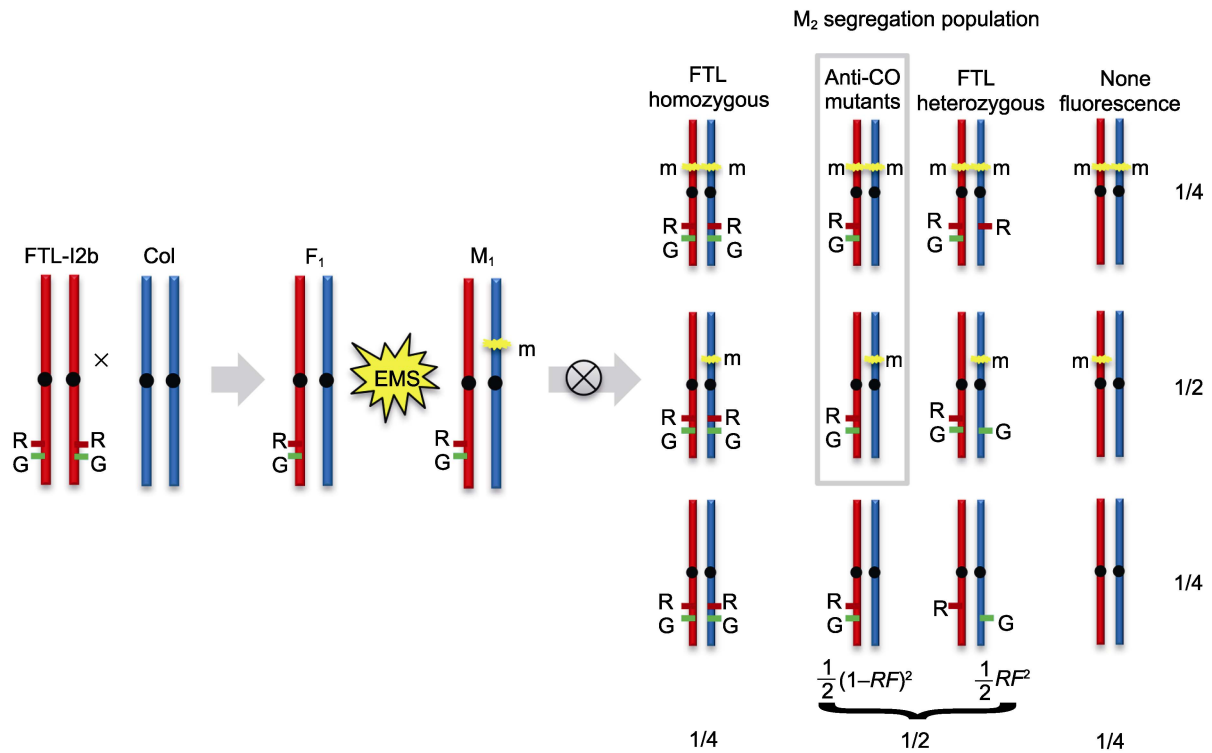


图4 拟南芥减数分裂重组抑制突变体正向遗传学筛选示意图

突变体正向遗传学的筛选建立在拟南芥野生型(WT)遗传背景基础上, 利用花粉荧光标记系FTL-I2b半合子荧光标记(I2b/++)进行高通量重组率检测, 筛选获得重组率提高的突变体。图中FTL-I2b中的DsRed和eYFP荧光标记分别由R和G表示。m代表基因的显性或隐性突变。RF: 重组率

Figure 4 A schematic illustration of *Arabidopsis* meiotic anti-CO mutants forward genetics screen

The forward genetics mutants screen was used the FTL-I2b containing linked hemizygous fluorescent reporters (I2b/++) on the genetic background of *Arabidopsis* wild type (WT). High-throughput detecting the recombination frequency by flow cytometry could identify the mutants with increased recombination rate. The DsRed and eYFP fluorescent reporters of FTL-I2b are indicated by R and G, respectively. The m refers to a dominant or recessive mutation. RF: Recombination frequency

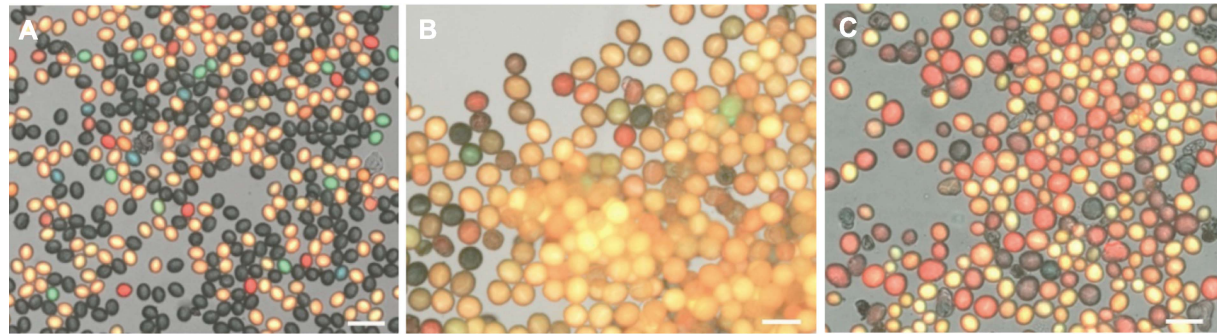


图5 拟南芥野生型与大花粉突变体花粉显微图

(A) 拟南芥野生型(WT)花粉大小为(21.82±0.98) μm (n=10); (B) 大花粉突变体1 (*big pollen 1*)的大花粉率为100%, 花粉大小为(38.36±1.37) μm (n=10); (C) 大花粉突变体2 (*big pollen 2*)的大花粉率为50%, 花粉大小为(36.00±2.70) μm (n=10)。Bars=50 μm

Figure 5 The pollen micrograph of *Arabidopsis* wild type and big pollen mutants

(A) The pollen size of *Arabidopsis* wild type (WT) is (21.82±0.98) μm (n=10); (B) The large pollen rate of *big pollen 1* mutant is 100%, pollen size is (38.36±1.37) μm (n=10); (C) The large pollen rate of *big pollen 2* mutant is 50%, pollen size is (36.00±2.70) μm (n=10). Bars=50 μm

值得注意的是,我们在隐性突变体中发现了重组率为50.53 cM的突变体,其重组率大幅度提高(近10倍),这是迄今为止重组率提高最多的突变体,而突变体*fancm/recq4a/recq4b*的重组率最多提高9倍。

2.3 显性重组抑制突变体

我们进一步对显性重组抑制突变体*drs*进行了纯化和遗传研究。在与拟南芥野生型(WT)的三代回交后代中均能发现重组率提高的突变体,且重组率也与M₂代植株相似,表明该突变体由单基因突变控制且能稳定遗传。然而,除了重组率显著提高以外,显性重组抑

制突变体*drs*与拟南芥野生型在植株表型上并无明显差异。如图6所示,突变体*drs*与拟南芥野生型均能正常生长并结实,果荚长度也无显著差异(育性正常),但突变体*drs*花粉荧光标记具有更多的单色花粉,表明重组率增加(21.83 ± 1.65 cM, $n=3$)。由于在杂交F₁代中就能实现重组率的提高,显性重组抑制突变体*drs*比隐性重组抑制突变体更具优势,尤其是在提高遗传分析、基因定位和植物育种效率方面。因此,显性重组抑制突变体*drs*的鉴定对提高植物育种效率具有重要作用。

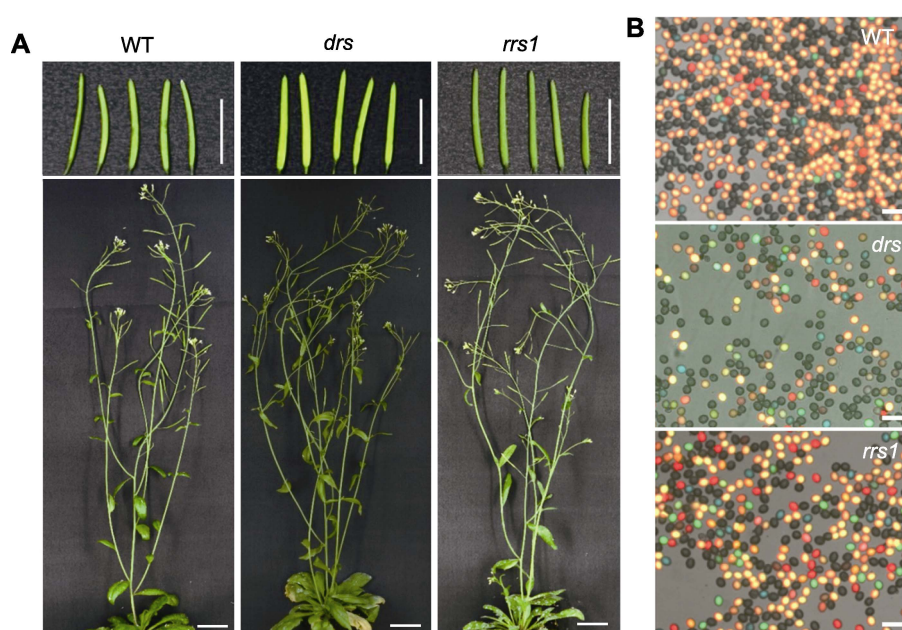


图6 拟南芥野生型与重组抑制突变体

(A) 拟南芥野生型(WT)、显性重组抑制突变体(*drs*)和隐性重组抑制突变体(*rrs1*)植株表型(Bars=1 cm); (B) 拟南芥野生型(WT)、显性重组抑制突变体(*drs*)和隐性重组抑制突变体(*rrs1*)花粉荧光标记显微图(Bars=50 μm)。

Figure 6 *Arabidopsis* wild type and recombination suppressor mutants

(A) The plant phenotype of *Arabidopsis* wild type (WT), dominant recombination suppressor mutant (*drs*) and recessive recombination suppressor mutant (*rrs1*) (Bars=1 cm); (B) The fluorescent pollen micrograph of *Arabidopsis* wild type (WT), dominant recombination suppressor mutant (*drs*) and recessive recombination suppressor mutant (*rrs1*) (Bars=50 μm)

2.4 隐性重组抑制突变体

在隐性重组抑制突变体的研究中,为了剔除包含已知隐性重组抑制基因的突变体,我们对隐性突变体进行了全基因组测序,并将检测到的EMS突变位点与9个已知重组抑制基因进行比对分析。通过这种研究策略,我们鉴定出1个包含*FANCM*突变基因的隐性重组抑制突变体*rrs1*,而其它隐性重组抑制突变体则是由其

它未知基因突变引起。与*fancm-1*突变体相似,隐性重组抑制突变体*rrs1*的重组率提高3倍左右(16.26 ± 1.02 cM, $n=3$),但植株生长和育性与拟南芥野生型无显著差异(图6A, B)。全基因组测序显示,突变体*rrs1*在*FANCM* (*AT1G35530*)基因中发生了G/A碱基替换(Chr. 1: 13092875),导致编码蛋白发生错译突变(G540D)。该*FANCM*-G540D突变位点位于保守基因序列SF2解旋酶结构域上,与之前鉴定的*FANCM*-

S535F突变位点处于同一解旋酶结构域上,因此推测FANCM蛋白的功能缺失导致*rrs1*突变体重组率提高。*FANCM*基因新突变位点的发现进一步表明,利用拟南芥花粉荧光标记系进行重组抑制突变体的筛选可行,该方法不仅能发现所有类型的重组抑制突变体,还能筛选并鉴定出已知重组抑制基因。

2.5 讨论

减数分裂重组起始于减数分裂初期产生的大量DNA双链断裂,而只有极少数的断裂双链被修复形成交叉,其余的大量断裂双链通过不同的途径和机制修复形成非交叉(Giraut et al., 2011; Lu et al., 2012; Qi et al., 2014)。在模式植物拟南芥中,细胞学分析表明每个减数分裂的细胞大约形成200个双链断裂,但只有约10个断裂双链被修复形成交叉,其余的断裂双链则被修复产生非交叉(Yelina et al., 2015)。近年来,利用拟南芥*zmm*突变体短角果表型(因缺乏I型交叉形成的ZMM基因而育性降低)进行果荚表型恢复系的正向遗传学筛选,已经获得了多个重组率提高的突变体,通过全基因组测序鉴定出多个II型交叉重组抑制基因,如*FANCM*、*RECQ4*和*FIGL1*。然而,由于该突变体筛选是建立在*zmm*突变体的基础之上,不能揭示调控绝大多数交叉(I型交叉)形成的重组抑制基因。因此,我们利用拟南芥花粉荧光标记系作为重组率增加的报告因子,在拟南芥野生型(WT)遗传背景下进行EMS突变体的正向遗传学筛选,共获得了18个重组率显著提高(3倍以上)的重组抑制突变体,其中包括显性和隐性遗传突变。通常EMS诱变产生较多基因功能缺失的隐性突变体和少量功能获得型的显性突变体(Kim et al., 2006),这与我们的筛选结果一致,表明利用拟南芥花粉荧光标记系进行重组抑制突变体筛选是成功的。通过全基因组测序,我们在隐性突变体中鉴定出1个包含FANCM-G540D突变位点的重组抑制突变体*rrs1*,该突变体与*fancm-1*突变体具有相似的重组提高能力,表明*rrs1*突变体可能是由FANCM-G540D突变造成,这也进一步证明利用拟南芥花粉荧光标记系进行重组抑制突变体筛选可行。

我们的研究表明,利用拟南芥花粉荧光标记系进行高通量重组抑制突变体筛选具有以下几个优势。首先,该方法克服了基于*zmm*重组恢复系只能筛选获得II型交叉重组抑制基因的缺陷,为发现I型交叉重组

抑制基因提供了新途径。其次,基于可视化的荧光标记突变体筛选,不仅能鉴定出重组率提高的突变体,还能筛选获得重组率降低和大花粉突变体等副产物,为植物减数分裂相关分子调控机理研究提供了研究材料。更重要的是,荧光标记系分别在拟南芥5条染色体上分布着大量荧光标记(包括35个DsRed、41个eYFP和37个eCFP),这些荧光标记的不同组合为研究拟南芥不同染色体区间的重组率提供了强大而高效的工具(Francis et al., 2007; Berchowitz and Copenhaver, 2008; Li et al., 2017)。例如,FTL-CEN3和FTL-CEN5的荧光标记分别横跨3号和5号染色体着丝粒区域,而该区域为抑制减数分裂重组的“冷点”,这为研究调控该区域的重组抑制基因提供了可视化的分析方法。因此,利用不同荧光标记系进行高通量减数分裂重组抑制突变体的筛选,鉴定减数分裂重组抑制突变体有待深入研究,如染色体着丝粒异染色质区域的重组抑制突变体,这对充分利用植物减数分裂重组的自然潜力进行育种具有重要意义。

参考文献

- Berchowitz LE, Copenhaver GP (2008). Fluorescent *Arabidopsis* tetrads: a visual assay for quickly developing large crossover and crossover interference data sets. *Nat Protoc* 3, 41–50.
- Berchowitz LE, Copenhaver GP (2010). Genetic interference: don't stand so close to me. *Curr Genomics* 11, 91–102.
- Berchowitz LE, Francis KE, Bey AL, Copenhaver GP (2007). The role of *AtMUS81* in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*. *PLoS Genet* 3, e132.
- Crismani W, Girard C, Froger N, Pradillo M, Santos JL, Chelysheva L, Copenhaver GP, Horlow C, Mercier R (2012). FANCM limits meiotic crossovers. *Science* 336, 1588–1590.
- Fernandes JB, Duhamel M, Segu  la-Arnaud M, Froger N, Girard C, Choinard S, Solier V, De Winne N, De Jaeger G, Gevaert K, Andrey P, Grelon M, Guerois R, Kumar R, Mercier R (2017). FIGL1 and its novel partner FLIP form a conserved complex that regulates homologous recombination. *PLoS Genet* 14, e1007317.
- Fernandes JB, Séguéla-Arnaud M, Larchevêque C, Lloyd AH, Mercier R (2018). Unleashing meiotic crossovers in hybrid plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 2431–2436.
- Francis KE, Lam SY, Harrison BD, Bey AL, Berchowitz

- LE, Copenhaver GP (2007). Pollen tetrad-based visual assay for meiotic recombination in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 3913–3918.
- Girard C, Chelysheva L, Choinard S, Froger N, Macaisne N, Lehmemdi A, Mazel J, Crismani W, Mercier R (2015). AAA-ATPase FIDGETIN-LIKE 1 and helicase FANCM antagonize meiotic crossovers by distinct mechanisms. *PLoS Genet* **11**, e1005369.
- Girard C, Crismani W, Froger N, Mazel J, Lemhemdi A, Horlow C, Mercier R (2014). FANCM-associated proteins MHF1 and MHF2, but not the other Fanconi anemia factors, limit meiotic crossovers. *Nucleic Acids Res* **42**, 9087–9095.
- Giraut L, Falque M, Drouaud J, Pereira L, Martin OC, Mézard C (2011). Genome-wide crossover distribution in *Arabidopsis thaliana* meiosis reveals sex-specific patterns along chromosomes. *PLoS Genet* **7**, e1002354.
- Hatkevich T, Kohl KP, McMahan S, Hartmann MA, Williams AM, Sekelsky J (2017). Bloom syndrome helicase promotes meiotic crossover patterning and homolog disjunction. *Curr Biol* **27**, 96–102.
- Higgins JD, Buckling EF, Franklin FC, Jones GH (2008). Expression and functional analysis of *AtMUS81* in *Arabidopsis* meiosis reveals a role in the second pathway of crossing-over. *Plant J* **54**, 152–162.
- Hu Q, Li YF, Wang HJ, Shen Y, Zhang C, Du GJ, Tang D, Cheng ZK (2017). Meiotic chromosome association 1 interacts with TOP3 α and regulates meiotic recombination in rice. *Plant Cell* **29**, 1697–1708.
- Huang JY, Cheng ZH, Wang C, Hong Y, Su H, Wang J, Copenhaver GP, Ma H, Wang YX (2015). Formation of interference-sensitive meiotic cross-overs requires sufficient DNA leading-strand elongation. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 12534–12539.
- Jones GH, Franklin FCH (2006). Meiotic crossing-over: obligation and interference. *Cell* **126**, 246–248.
- Kim Y, Schumaker KS, Zhu JK (2006). EMS mutagenesis of *Arabidopsis*. In: Salinas J, Sanchez-Serrano JJ, eds. *Arabidopsis* Protocols. Totowa: Humana Press. pp. 101–103.
- Kurzbauer MT, Pradillo M, Kerzendorfer C, Sims J, Laddner R, Oliver C, Janisiw MP, Mosiolek M, Schweizer D, Copenhaver GP, Schlögelhofer P (2018). *Arabidopsis thaliana* FANCD2 promotes meiotic crossover formation. *Plant Cell* **30**, 415–428.
- Li F, De Storme N, Geelen D (2017). Dynamics of male meiotic recombination frequency during plant development using fluorescent tagged lines in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep* **7**, 42535.
- Lu PL, Han XW, Qi J, Yang JG, Wijeratne AJ, Li T, Ma H (2012). Analysis of *Arabidopsis* genome-wide variations before and after meiosis and meiotic recombination by resequencing *Landsberg erecta* and all four products of a single meiosis. *Genome Res* **22**, 508–518.
- Lu PL, Wijeratne AJ, Wang ZJ, Copenhaver GP, Ma H (2014). *Arabidopsis* PTD is required for type I crossover formation and affects recombination frequency in two different chromosomal regions. *J Genet Genomics* **41**, 165–175.
- Lukowitz W, Gillmor CS, Scheible WR (2000). Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol* **123**, 795–806.
- Macaisne N, Novatchkova M, Peirera L, Vezon D, Jolivet S, Froger N, Chelysheva L, Grelon M, Mercier R (2008). SHOC1, an XPF endonuclease-related protein, is essential for the formation of class I meiotic crossovers. *Curr Biol* **18**, 1432–1437.
- Macaisne N, Vignard J, Mercier R (2011). SHOC1 and PTD form an XPF-ERCC1-like complex that is required for formation of class I crossovers. *J Cell Sci* **124**, 2687–2691.
- Mercier R, Mézard C, Jenczewski E, Macaisne N, Grelon M (2015). The molecular biology of meiosis in plants. *Annu Rev Plant Biol* **66**, 297–327.
- Mieulet D, Aubert G, Bres C, Klein A, Droc G, Vieille E, Rond-Coissieux C, Sanchez M, Dalmais M, Mauxion JP, Rothan C, Guiderdoni E, Mercier R (2018). Unleashing meiotic crossovers in crops. *Nat Plants* **4**, 1010–1016.
- Qi J, Chen YM, Copenhaver GP, Ma H (2014). Detection of genomic variations and DNA polymorphisms and impact on analysis of meiotic recombination and genetic mapping. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 10007–10012.
- Qu LJ, Qin GJ (2014). Generation and identification of *Arabidopsis* EMS mutants. In: Sanchez-Serrano JJ, Salinas J, eds. *Arabidopsis* Protocols. Totowa: Humana Press. pp. 225–239.
- Séguéla-Arnaud M, Choinard S, Larchevêque C, Girard C, Froger N, Crismani W, Mercier R (2017). RMI1 and TOP3 α limit meiotic CO formation through their C-terminal domains. *Nucleic Acids Res* **4**, 1860–1871.
- Séguéla-Arnaud M, Crismani W, Larchevêque C, Mazel J, Froger N, Choinard S, Lemhemdi A, Macaisne N, Van Leene J, Gevaert K, De Jaeger G, Chelysheva L, Mercier R (2015). Multiple mechanisms limit meiotic crossovers: TOP3 α and two BLM homologs antagonize

crossovers in parallel to FANCM. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 4713–4718.

Wang YX, Cheng ZH, Huang JY, Shi Q, Hong Y, Copenhagen GP, Gong ZZ, Ma H (2012). The DNA replication factor RFC1 is required for interference-sensitive meiotic crossovers in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **8**, e100-3039.

Yelina NE, Lambing C, Hardcastle TJ, Zhao XH, Santos B, Henderson IR (2015). DNA methylation epigenetically

silences crossover hot spots and controls chromosomal domains of meiotic recombination in *Arabidopsis*. *Gene Dev* **29**, 2183–2202.

Yelina NE, Ziolkowski PA, Miller N, Zhao X, Kelly KA, Muñoz DF, Mann DJ, Copenhagen GP, Henderson IR (2013). High-throughput analysis of meiotic crossover frequency and interference via flow cytometry of fluorescent pollen in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Protoc* **8**, 2119–2134.

High-throughput Identification of Meiotic Anti-CO Mutants by Fluorescent Reporters

Fan Li, Jiwei Ruan*

Yunnan Key Laboratory of Flower Breeding, National Engineering Research Center for Ornamental Horticulture, Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650200, China

Abstract The forward genetic approach has become a widespread methodology to reveal genetic factors involved in meiosis, such as the crossover negative regulators, which limit the class II crossover formation. Here we developed a forward genetics mutant screen to identify anti-CO mutants under the Col wild-type background of *Arabidopsis thaliana*. We isolated 18 mutant lines showing more than three-fold increase in male meiotic recombination frequency as compared with the wild type, including dominant and recessive mutants. Thus, the EMS screen based on fluorescent reporters allows for high-throughput identification of meiotic anti-CO mutants and provides a novel approach and genetic materials to study the molecular mechanism of meiotic recombination regulation.

Key words meiosis, anti-CO mutants, fluorescent marker, high-throughput visual assay

Li F, Ruan JW (2019). High-throughput identification of meiotic anti-CO mutants by fluorescent reporters. *Chin Bull Bot* **54**, 522–530.

* Author for correspondence. E-mail: snruanjiwei@126.com

(责任编辑: 朱亚娜)