

水稻单端体的获得及其分子细胞学鉴定

于恒秀* 龚志云* 苏 艳 顾铭洪†

(扬州大学农学院农学系, 扬州 225009. * 同等贡献. † 联系人, E-mail: gumh@yzu.edu.cn)

摘要 从籼稻品种中粳 3037 第 1 染色体短臂、第 4 染色体长臂及第 11 染色体长臂端三体的自交后代中, 选择形态性状出现明显变异但体细胞染色体数目仍为 $2n = 24$ 的个体. 用水稻着丝粒特异的 BAC 克隆 17p22 为探针对有丝分裂早中期染色体进行荧光原位杂交(FISH)分析, 各筛选到了一单端体植株, 其体细胞中各含有一条端着丝粒染色体. 进一步分别以位于第 1 染色体短臂、第 4 染色体长臂及第 11 染色体长臂上的特异分子细胞学标记 a0059H02, a0034E24 及 a0071H11 为探针, 对以上 3 个单端体的有丝分裂早中期染色体及减数分裂粗线期的染色体进行荧光原位杂交分析, 证明这些变异株确为第 1 染色体短臂、第 4 染色体长臂和第 11 染色体长臂的单端体. 这些单端体的植株矮小, 结实率较低.

关键词 水稻 单端体 荧光原位杂交

水稻是重要的粮食作物. 由于水稻的基因组较小, 易于转化和繁殖, 因而在近代生物学研究中, 水稻已成为重要的模式植物之一. 在近 20 年中, 通过各国科学家的共同努力, 水稻的遗传研究得到了很大的发展. 特别是近年来水稻全基因组序列测定的完成, 为解析不同基因的功能提供了一个非常好的契机.

细胞学研究作为遗传研究的一个重要组成部分, 近年来在水稻上得到了很大的发展. 除了传统的水稻初级三体、易位体和染色体组型研究外, 成套覆盖不同染色体臂的端三体构建首先在水稻上获得成功^[1], 标志着水稻细胞遗传学研究已步入了作物细胞遗传学研究的前列. 加之水稻的基因组较小, 而细胞的全能性较好, 这更有利于将现代分子生物学手段与传统的细胞学研究相结合用以研究如着丝粒、端粒等染色体重要功能元件的结构和序列特征, 在此基础上, 进一步探索构建植物人工染色体的可能途径^[2].

在水稻非整倍体中, 除了三体以外, 有关其他非整倍体的研究特别是染色体数目减少的亚倍体很少见有报道, 这主要是因为这类变异很少发生. 一般认为, 水稻作为二倍体生物, 亚倍体变异一般很难出现, 即使发生也很难成活; 但在另一方面, 对于水稻是否是真正的二倍体物种, 很早就有讨论, Sakai^[3]根据水稻染色体在减数分裂中存在的所谓“次级联会”现象的构型, 认为水稻很可能是由染色体基数为“5”的物种进化而来. 在进化遗传研究中, 一般认为单倍性染色体数超过“9”的均有可能是多倍体^[4]. 如果这样, 则水稻是否是多倍体的可能是值得研究的. 并且最

近通过水稻全基因组序列的比对, 已获得水稻为古四倍体的直接证据^[5~10]. 如果水稻确为古四倍体, 那么当它缺失某条染色体或染色体臂时, 由于其他染色体上有同源片段的存在, 可以弥补缺失染色体的功能, 从而使得这类亚倍体得以存活.

在水稻亚倍体中, 由单个染色体臂的缺失形成的单端体是染色体缺失最少的非整倍体. 由于它缺失染色体片段较少, 理论上对稻株的生长和发育的影响也相对较小. 由本研究室构建的水稻端三体, 则为研究水稻单端体发生的可能性, 以及进一步研究单个染色体臂的缺失对水稻正常生长的影响程度创造了有利条件. 我们从水稻 24 种端三体的自交后代中通过筛选染色体数与正常二倍体相同而形态性状明显发生变异的个体, 从中分离获得了 3 种水稻单端体. 本文报道了这 3 种单端体的选育过程及其细胞学鉴定结果.

1 材料与方法

() 供试材料. 本研究用材料包括水稻品种中粳 3037, 以及从该品种育成的初级三体和端三体材料. 端三体共 24 种, 从每一种端三体自交后代中获得新的变异株. 原始品种中粳 3037 及该品种的初级三体(共 12 种)和端三体分别作为对照.

() 单端体的筛选. 单端体作为一种特殊的非整倍体, 最有可能的获得途径是从端三体的自交后代中筛选. 理论上, 端三体的自交后代中除了可以继续出现端三体以外, 还可分离出正常的二体、初级三体和单端体. 单端体一旦出现, 其性状表现将会与其

他类型有明显区别,为此,对每一种端三体的自交后代,先从形态上加以鉴别.凡是植株出现明显变异的个体均取其茎节培养得到其无性系,下一年种植成无性繁殖系,取这些变异株的根尖和幼穗,进一步作细胞学的鉴定和筛选.

() 细胞学鉴定. 从端三体的自交后代获得的变异个体逐株进行了细胞学鉴定. 细胞学鉴定分3步进行: 第1步,进行根尖染色体数目鉴定,从中选留 $2n = 24$ 的个体; 第2步,通过荧光原位杂交(FISH)对 $2n = 24$ 的个体逐株鉴定根尖细胞有丝分裂前中期染色体,从中确定是否存在端着丝粒染色体,确定存在一条端着丝粒染色体的个体即可认定为单端体; 第3步,对确定为单端体个体进一步通过细胞有丝分裂前中期染色体和减数分裂粗线期染色体的 FISH 鉴定,以确定它是否由原来的端三体的端着丝粒染色体传递至子代形成的单端体.

为获得清晰的根尖细胞有丝分裂前中期染色体图像,根尖收取后置于 0.002 mol/L 8-羟基喹啉中处理 2 h,然后用甲醇-冰醋酸为 3:1 的固定液固定,置于 -20°C 冰箱中备用. 制片时,将根尖置于 2%纤维素酶和 1%果胶酶溶液中, 37°C 下酶解 1 h,火焰干燥法制片,然后以 2% Giemsa 染色液染色,置于显微镜下观察.

减数分裂期的幼穗在收取后先固定于乙醇-冰醋酸为 3:1 的固定液中,粗线期染色体的制片按 Wu^[11] 的方法进行.

荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)按 Jiang 等人^[12] 的方法进行. 为确定端着丝粒染色体的存在,选用了来自水稻着丝粒的特异 BAC 克隆 17p22 为探针,以生物素-11-dUTP 标记后与玻片上染色体杂交,再以抗生物素抗体偶联 FITC 偶联物 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 检测. 为确定端着丝粒染色体是否是原端三体中的端着丝粒染色体,分别以相应染色体臂上的特异分子细胞学标记 a0059H02, a0034E24 及 a00a0071H11 等作为探针,以地高辛-11-dUTP (Boehringer Mannheim Biochemica) 标记后与玻片上的染色体杂交,再以抗地高辛抗体偶联罗丹明偶联物 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 进行检测,染色体以 DAPI 染色. 原位杂交的玻片置于荧光显微镜 (Leica DMRXA) 下观察,通过使用不同的滤光片观察染色体、着丝粒和染色体臂上的杂交信号. 以气冷式数码相机 (CCD) 摄像,并将图像输

入计算机中,以 Leica QFISH 软件调节对比度和亮度.

2 结果与分析

2.1 变异株的染色体数目鉴定

端三体中的三体染色体在随机分离的情况下,可能形成的配子将有 n (正常染色体配子)、 $n+1$ (增加一条正常染色体的配子)、 $n+1\text{tel}$ (增加一条端着丝粒染色体的配子) 和 $n-1+1\text{tel}$ (染色体数正常,但有一条染色体为端着丝粒染色体的配子) 4 种. 如果以上 4 种染色体组成的雌配子能保持可育 (或部分可育),而染色体数 (包括臂) 发生增减的雄配子不育的情况下,端三体的自交后代可能出现正常二体、初级三体、端三体和单端体 4 类个体. 这 4 类个体中,前 3 类个体均可从形态性状上根据已有的对照植株进行鉴别. 单端体一旦出现,必将在形态性状上有不同表现. 为确定这些形态性状发生变异的个体是否为单端体,首先需要对它们的染色体数进行鉴定. 根据对各端三体自交后代的观察,发现在 1S, 2L, 3L, 4S, 4L, 6L, 10L, 11S, 11L 和 12L 等 10 种端三体的自交后代中检测到 $2n = 24$ 且形态性状不同于已知二体、初级三体和端三体的个体.

2.2 单端体的筛选

为确定以上从端三体自交后代中筛选获得的变异个体是否为单端体,需要对它们进一步鉴定. 由于水稻体细胞中的染色体较小,以有丝分裂前中期区别各染色体比较困难,为了鉴别每一种变异株中的染色体变异类型,本研究用荧光原位杂交 (FISH) 的方法首先确定以上染色体数为 24 的变异株中是否有端着丝粒染色体存在. 为此,我们以变异株有丝分裂早中期的染色体为材料,以水稻着丝粒特异的 BAC 克隆 17p22 为探针进行了 FISH 分析,结果 (图 1(a) 和 (b), 绿色杂交信号) 显示,在分别来自于端三体 1S, 4L, 11L 的自交后代筛选到的染色体数为 24 的 2 株、5 株和 3 株形态变异株中,各有一株其 24 条染色体中 23 条为正常染色体,一条为端着丝粒染色体,以 FITC 偶联物检测显示的着丝粒杂交信号 (绿色) 在这些染色体上均位于染色体端部 (图 1(a) 和 (b), 箭头所示), 说明这 3 株很可能为单端体变异,它们分别被暂称为 mt1S, mt4L 和 mt11L.

对于以上 3 个可能的单端体变异株的进一步鉴

定, 考虑到这 3 个变异株是分别来自于第 1 号染色体短臂、第 4 号染色体长臂和第 11 号染色体长臂端三体的自交后代, 且由端三体形成的 $n-1+1\text{tel}$ 的配子中的端着丝粒染色体通常来自于相应端三体中的端着丝粒染色体. 因此, 对这些变异株的进一步分析, 选择了 3 种端三体中相应端着丝粒染色体臂上的特异分子细胞学标记作为探针, 它们分别为第 1 号染色体短臂的 a0059H02, 第 4 号染色体长臂的 a0034E24 和第 11 号染色体长臂的 a0071H11, 它们都是相应染色体臂上特异的一段核苷酸序列. 鉴定分 2 步: 第 1 步, 根尖细胞有丝分裂前中期染色体的 FISH 鉴定; 第 2 步, 花粉母细胞减数分裂粗线期染色体配对构象的 FISH 鉴定. 以根尖有丝分裂前中期染色体进行的 FISH 鉴定显示, 前面由着丝粒特异探针 17p22 通过 FISH 分析所确定的 3 个变异株确实为相应染色体臂的单端体变异. 以由端三体 1S 衍生的 mt1S 为例, 当第 1 染色体短臂探针 a0059H02 以地高辛-11-dUTP 标记后与 mt1S 染色体杂交, 再以抗地高辛抗体偶联罗丹明偶联物检测, 发现 2 个红色杂交信号: 一个杂交信号位于正常的染色体上, 即第 1 号染色体的短臂上; 另一杂交信号位于端着丝粒染色体上, 说明该端着

丝粒染色体即为第 1 号染色体的短臂(图 1(a)). 同样的情况也见于以探针 a0034E24 对 mt4L(图 1(b))和探针 a0071H11 对 mt11L 的 FISH 鉴定中, 说明它们所携带的端着丝粒染色体分别为第 4 号染色体的长臂和第 11 号染色体的长臂.

为进一步研究以上单端体中的端着丝粒染色体是否确实来自于相应染色体完整的一个臂, 本研究以这些单端体的减数分裂粗线期染色体为材料, 分别以生物素标记的水稻着丝粒特异的 BAC 克隆 17p22 以及以地高辛标记的相应染色体臂上的特异分子细胞学标记进行了 FISH 分析, 以了解端着丝粒染色体与相应的正常染色体的联会情况. 结果表明, 在每一单端体的荧光原位杂交图像中, 均可见到位于二价体上由着丝粒特异的 BAC 克隆 17p22 显示的杂交信号(呈绿色). 由于粗线期染色体收缩不完全, 长短臂差异明显的染色体可以从着丝粒的荧光信号清楚地发现它们的臂长差异. 第 4 号染色体不仅差异明显, 而且短臂由于高度异染色质化更易被识别(图 1(c)). 尤其重要的是, 由该染色体长臂特异分子细胞学标记 a0034E24 所作的 FISH 结果表明, 在单端体

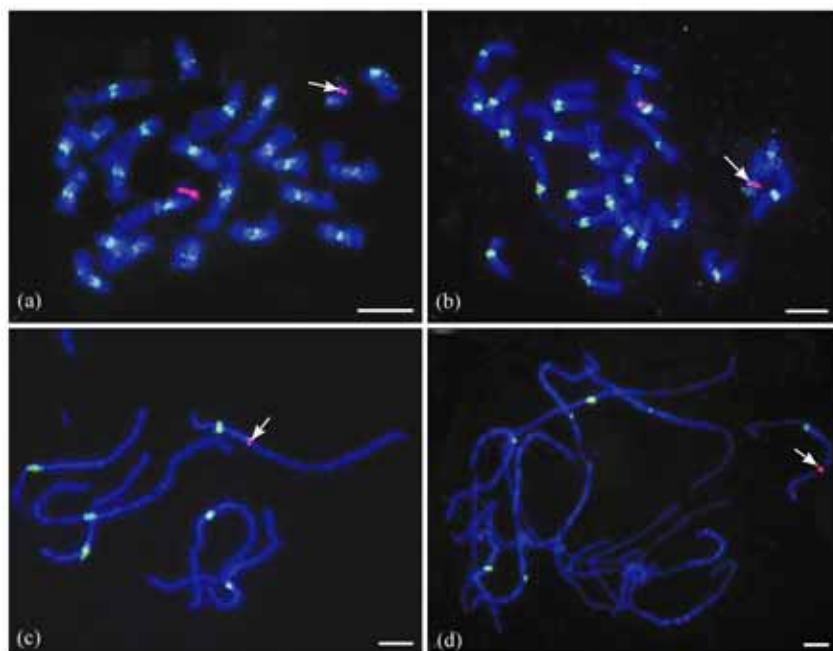


图 1 单端体的 FISH 鉴定结果

(a) 1S 单端体(mt1S)前中期染色体. (b)和(c) 分别为 4L 单端体(mt4L)有丝分裂前中期和花粉母细胞减数分裂粗线期染色体. (d) 11L 单端体(mt11L)减数分裂粗线期染色体. 绿色信号为以着丝粒特异 BAC 克隆 17p22 为探针的荧光原位杂交结果; 红色信号为以染色体臂上的特异分子细胞学标记为探针的荧光原位杂交结果. 标尺示 5 μm

mt4L 的粗线期, 由第 4 号染色体联会形成的二价体中, 其长臂的联会是正常的, 呈现出双股的结构, 由探针 a0034E24 显示的红色杂交信号清楚地位于长臂上. 与之相反, 其短臂部分则是单股. 这进一步证明, mt4L 确实为第 4 号染色体长臂的单端体. 同样的结果也发现在 mt1S 和 mt11L 粗线期染色体的 FISH 分析中, 图 1(d)显示的是 mt11L 的杂交图像. 从图中可以清晰地看到, 第 11 染色体上由着丝粒特异 BAC 克隆 17p22 杂交显示的绿色杂交信号和第 11 染色体长臂特异探针 a00a0071H11 杂交显示的红色杂交信号, 该染色体的短臂呈单股的结构, 表明 mt11L 第 11 号染色体缺失一条短臂, 因而 mt11L 是第 11 染色体长臂的单端体. 因此, mt1S, mt4L 和 mt11L 确实分别为第 1 号染色体短臂的单端体、第 4 号染色体长臂的单端体和第 11 号染色体长臂的单端体.

2.3 单端体的形态特征

单端体作为一种染色体结构变异, 由于缺失了染色体的一个臂, 在性状上也会出现明显的反映, 对 3 个单端体材料的田间性状调查结果列于表 1, 图 2 为这 3 个单端体材料的植株和穗子形态. 3 个单端体在形态上都不同于正常的 3037 及其来源的初级三体和端三体, 其共同的特点是植株矮小、穗形较小、结实率较低, 如 1S 单端体的株高只有 57 cm, 结实率仅 7%, 表现为分蘖少、叶色较深、叶片较窄、稍内卷; 4L 单端体株高为 69 cm, 结实率为 28.42%, 分蘖较多; 11L 单端体株高为 54 cm, 结实率稍高, 为 37.14%, 但叶色较淡、叶片较窄, 它们与相应的初级三体和端三体相比, 主要性状有明显的差异^[1,13].

表 1 单端体的形态

材料	株高/cm	结实率(%)	形态
1S 单端体	57	7	穗型较小、分蘖较少、叶色较深、叶片狭窄、内卷
4L 单端体	69	28.42	穗型较小、分蘖较多
11L 单端体	54	37.14	穗形较小、叶色较淡、叶片较窄、分蘖较多
中粳 3037	88	88.13	

3 讨论

非整倍体作为一类特殊的遗传材料, 在遗传研究中常被用于染色体组的进化研究, 这在曼陀罗^[14,15]等植物中已有报道. 对于多倍体起源的植物如小麦等, 非整倍体也被广泛地用于研究染色体组之间的遗传联系等等^[16~22].

单体由于缺失了一条完整的染色体, 常会对植株的形态性状发育产生极显著的影响, 育性也会有明显的降低, 但在多倍体起源的物种中, 它们大都是可以生存的, 如在小麦上早在 20 世纪 60 年代已有成套的单体育成的报道^[23].

一般认为, 水稻是一种二倍体植物, 因而很少有单体的研究报道. Chandrasekharan^[24]曾获得过一个单体植株, 它在减数分裂中可形成 11 个二价体和 1 个单价体. Wang 等人^[25]以辐射花粉给正常二倍体授粉, 后代中曾得到 5 种单体, 但它们均表现生长势弱、完全不育, 因而只能以无性繁殖方法保存. 单端体是只缺失染色体某一个臂的非整倍体, 在理论上由染色体缺失造成的影响要比普通单体小得多, 但由于涉及单个臂的非整倍体很难发现, 因而至今尚未见单端体的研究报道.



图 2 单端体的植株形态

(a) 左边为正常的中粳 3037, 右边为第 1 染色体短臂的单端体. (b) 左边为正常的中粳 3037, 右边为第 4 染色体长臂的单端体. (c) 左边为正常的中粳 3037, 右边为第 11 染色体长臂的单端体. (d) 单端体的穗部形态, 从左到右依次为正常的中粳 3037, 1S 单端体, 4L 单端体和 11L 单端体

本研究从端三体的自交后代中获得了三种单端体,说明从端三体的分离后代中筛选单端体是可行的,而且从获得的 3 种单端体看,尽管它们的生长势都较弱,育性也较低,但都可以在自然条件下正常生长至成熟.这 3 种单端体的获得,说明目前水稻单倍性染色体组的 12 个成员中,并非所有的片段都是不可缺少的,这从一个侧面说明水稻染色体组中存在着大片段重复的可能.很可能在稻属染色体组的进化过程中,存在着不同染色体组的重组分化和重新二倍体化的过程^[26~31].

本研究从 24 种端三体的自交后代中,只分离获得了 3 种单端体,说明水稻不同染色体臂的缺失,对于稻株正常生存的影响是不同的,可能对于多数染色体臂来说,它们的缺失均可造成配子不育,因而也就无法获得这些染色体臂缺失的单端体变异.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 30170567)资助项目.

参 考 文 献

- Cheng Z K, Yan H H, Yu H X, et al. Development and applications of a complete set of rice telotrisomics. *Genetics*, 2001, 157(1): 361~368
- Cheng Z K, Buell C R, Wing R A, et al. Toward a cytological characterization of the rice genome. *Genome Res*, 2001, 11: 2133~2141^[DOI]
- Sakai K I. Chromosome studies in rice. . The secondary association of the meiotic chromosomes. *Jap J Genetics*, 1935, 11: 145~156
- Hancock J F. Plant evolution and the origin of crop species, 2nd ed. Massachusetts: CABI publishing, 2004. 3~31
- Blanc G, Wolfe K H. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell*, 2004, 16: 1667~1678^[DOI]
- Chapman B A, Bowers J E, Schulze S R, et al. A comparative phylogenetic approach for dating whole genome duplication events. *Bioinformatics*, 2004, 20: 180~185^[DOI]
- Paterson A H, Bowers J E, Chapman B A. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(26): 9903~9908 ^[DOI]
- Blanc G, Wolfe K H. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell*, 2004, 16: 1667~1678^[DOI]
- Wang X, Shi X, Hao B, et al. Duplication and DNA segmental loss in the rice genome: Implications for diploidization. *New Phytol*, 2005, 165(3): 937~946^[DOI]
- Zhang Y, Xu G H, Guo X Y, et al. Two ancient rounds of polyploidy in rice genome. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2005, 6(2): 87~90^[DOI]
- Wu H K. Note on preparing of pachytene chromosomes by double mordant. *Sci Agric*, 1967, 15: 40~44
- Jiang J, Gill B S, Wang G L, et al. Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 4487~4491
- Cheng Z K, Yu H X, Li X, et al. A new set of primary trisomics in *indica* rice, its breeding and cytological investigation. *Chinese Journal of Genetics*, 1996, 23(4): 263~272
- Blakeslee A F. Types of mutations and their possible significance in evolution. *Am Nat*, 1921, 55: 254~267
- Blakeslee A F, Belling J, Farnham M E. Chromosomal duplication and mendelian phenomena in *Datura* mutants. *Science*, 1920, 52: 388~390
- Heyne E G, Livers R W. Monosomic analysis of leaf rust reaction, awnness, winter injury and seed color in Pawnee wheat. *Argon J*, 1953, 45: 54~58
- Sears E R, Okamoto M. Intergenomic chromosome relationships in hexaploid wheat. *Proceedings of the Tenth International Congress on Genetics*, 1958, 2: 258~259
- Sears E R. The use of telocentric chromosomes in linkage mapping. *Genetics*, 1962, 47: 983
- Kimber G, Sears E R. Uses of wheat aneuploids. *Basic Life Sci*, 1979, 13: 427~443
- Li W N, Li Z S, Huang S S. Chromosomal location of gene for auricle development in common wheat. *Wheat Information Service*, 1990, 71: 27~28
- Qi L, Echaliier B, Friebe B, et al. Molecular characterization of a set of wheat deletion stocks for use in chromosome bin mapping of ESTs. *Funct Integr Genomics*, 2003, 3(1-2): 39~55
- Zharkov N A. Resolving capacity of monosomic line analysis in cytogenetic studies of common wheat. *Tsitol Genet*, 2004, 38(3): 22~28
- Sears E R. The aneuploids of common wheat. *Mo Agric Exp Stn Res Bull*, 1954, 572: 1~59
- Chandrasekharan N M, 著. 顾铭洪, 译. 水稻的起源和细胞遗传. 北京: 农业出版社, 1981
- Wang Z X, Iwata N, Sukekiyo Y, et al. A trial to induce chromosome deficiencies and monosomics in rice by using irradiated pollen. *Rice Genetic Newsletter*, 1988, 5: 64~65
- Kishimoto N, Higo H, Abe K, et al. Identification of the duplicated segments in rice chromosomes 1 and 5 by linkage analysis of cDNA markers of known functions. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 722~726^[DOI]
- Wang S, Liu K, Zhang Q. Segmental duplications are common in rice genome. *Acta Bot Sin*, 2000, 42: 1150~1155
- Paterson A H, Bowers J E, Peterson D G, et al. Structure and evolution of cereal genomes. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, 13: 644~650^[DOI]
- Guyot R, Keller B. Ancestral genome duplication in rice. *Genome*, 2004, 47(3): 610~614^[DOI]
- Soranzo N, Sari Gorla M, Mizzi L, et al. Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Mol Genet Genomics*, 2004, 271(5): 511~521^[DOI]
- Yu J, Wang J, Lin W, et al. The Genomes of *Oryza sativa*: A history of duplications. *PLoS Biol*, 2005, 3(2): e38^[DOI]

(2005-05-25 收稿, 2005-07-21 收修改稿)