

水稻端四体的分子细胞学鉴定及染色体行为分析

龚志云 高清松 于恒秀 裔传灯 顾铭洪 *

(扬州大学 江苏省作物遗传生理重点实验室/教育部植物功能基因组学重点实验室 , 江苏 扬州 225009 ; * 通讯联系人 , E mail : gumh@yzu . edu . cn)

Molecular Cytological Identification and Chromosome Behavior Analysis of Telotetrasomic in Rice

GONG Zhì yun , GAO Qīng song , YU Heng xiū , Yì Chuan deng , GU Míng hong *

(Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology of Jiangsu Province/ Key Laboratory of Plant Functional Genomics , Ministry of Education , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China , * Corresponding author , E mail : gumh@yzu . edu . cn)

Abstract : From the progenies of telotrisomic chromosome 9 of an indica variety , Zhongxian 3037 , a phenotypical mutant was selected . Cytological and molecular cytological investigations revealed two extra chromosomes which were the shortest in somatic cells of the mutant . Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using a rice centromere specific DNA (RCS₂) and DNA sequence specific for chromosome 9 on premetaphase and pachytene chromosomes showed that these two chromosomes were the short arms of chromosome 9 . That is to say , the mutant was a telotetrasomic of chromosome 9 . Among the 25 pachytene cells , two telosomic chromosomes paired each other as bivalents and didn't pair with other normal chromosome 9 as multivalents in 96 % cells . However , the bivalent was easy to disassociate in advance .

Key words : rice ; telotetrasomic ; meiosis ; fluorescent *in situ* hybridization ; molecular cytology ; chromosome behavior

摘 要 : 在水稻品种中粳 3037 第 9 染色体短臂端三体的自交后代中发现了一个变异株。该植株叶片内卷 , 株型偏散 , 结实率差。分子细胞学鉴定表明 , 该植株体细胞染色体数比正常植株多 2 条 , 多出的染色体均比较小。进一步用来源于水稻着丝粒特异 DNA 序列 (RCS₂) 以及位于水稻第 9 染色体短臂上的特异性 DNA 序列为探针 , 进行荧光原位杂交分析 , 证明该变异株多出的染色体均为第 9 染色体短臂 , 故该变异株为第 9 染色体短臂端四体。对变异株的减数分裂染色体行为进行分析表明 , 在所观察的 25 个细胞中 , 96 % 的细胞增加的两个端着丝粒染色体可配对形成二价体 , 一般不与正常的第 9 染色体配对形成多价体。但额外染色体形成的二价体在中期 容易发生提前解离的现象。

关键词 : 水稻 ; 端四体 ; 减数分裂 ; 荧光原位杂交 ; 分子细胞学 ; 染色体行为

中图分类号 : Q942 ; Q943 ; S511 . 032 文献标识码 : A 文章编号 : 1001-7216 (2008) 04-0335-05

在植物遗传学研究中 , 常可发现染色体数目发生变异而形成的非整倍体。按染色体数目分 , 它们可分为染色体数目减少的亚倍体和染色体数目增加的超倍体两类。水稻作为一种二倍体植物 , 亚倍体很难存活 , 因而对水稻非整倍体的报道主要集中在超倍体方面 , 如三体、双三体、四体等。到目前为止 , 国内外已有多次育成水稻成套初级三体^[1-2]的报道 , 另外也有少数次级三体及端三体等的报道^[3]。本实验室从 1992 年开始 , 着手进行水稻非整倍体研究 , 通过几年努力 , 已获得以中粳 3037 为遗传背景的成套初级三体与端三体 , 以及部分次级三体 , 并对它们做了相应的研究^[4-5]。

端四体是非整倍体材料之一 , 它是在原有二倍体基础上添加了由某一染色体臂形成的 2 份端着丝粒染色体而产生的变异个体。利用这类变异 , 一方面可以研究所在染色体 (臂) 上相关基因的剂量效应^[6] 以及减数分裂过程中染色体的行为 ; 另一方面 , 也可以用来研究水稻不同染色体之间的分化及

其与稻属不同染色体组分化的联系^[7]。

本试验从水稻品种中粳 3037 第 9 染色体短臂端三体的自交后代中筛选到一变异株 , 命名为中 9S 1。为防止通过有性繁殖可能产生分离变异 , 我们取中 9S 1 的基部茎节 , 经清洗、消毒后移植于培养基上 , 通过无性繁殖保存。经细胞学和分子细胞学 (荧光原位杂交) 鉴定 , 确定中 9S 1 为水稻第 9 染色体短臂的端四体。在此基础上 , 对中 9S 1 减数分裂过程中染色体行为和遗传表现进行了分析。

1 材料与方法

1 . 1 试验材料

田间种植水稻品种中粳 3037 第 9 染色体的端三体以及从该端三体后代中发现的变异株中 9S 1。

收稿日期 : 2008-03-04 ; 修改稿收到日期 : 2008-04-08。
基金项目 : 国家自然科学基金资助项目 (30600345 , 30770131 , 30771210)。

第一作者简介 : 龚志云 (1975 -) , 女 , 博士研究生。

为便于与原品种比较 ,同时种植了普通中粳 3037 作对照。所有材料均于 2006 年移植于扬州大学水稻试验农场 ,常规水肥管理。

1.2 染色体的制备

取新鲜根尖置于 0.002 mol/L 的 8 羟基喹啉中 ,在 20℃ 下处理 2 h ,然后用甲醇 :冰醋酸为 3 :1 (体积比)的固定液固定 ;取时期合适的幼穗用乙醇 :冰醋酸为 3 :1 (体积比)的固定液固定 ;将固定后的材料置于 -20℃ 冰箱中备用。有丝分裂的染色体制片按 Kurata 等^[8]的方法进行。减数分裂的染色体制片按 Wu 等^[9]的方法进行。

1.3 常规镜检

制好的玻片用 4,6-二脒基-2-苯基吲哚 (4,6-diamidino-2-phenylindole ,DAPI) 染色后在 Leica DMRXA 荧光显微镜下观察。对于染色体分散好 ,形态清晰的细胞用气冷式数码相机 (CCD) 摄像。

1.4 荧光原位杂交

所用水稻着丝粒特异探针 RCS₂ 由美国 Wisconsin Madison 大学 Jiming Jiang 教授赠与 ;45S rDNA 由日本北海道大学 Sano 博士提供 ;端粒 DNA 探针 pAtT4 引自美国康奈尔大学 ;第 9 染色体短臂上的特异分子细胞学标记 a0052116 来自美国 Clemson 大学 BAC 库中心。用 Digoxigenin-11-dUTP 和 Biotin-16-dUTP 标记探针 ,标记、杂交和检测按 Jiang 等^[10]的方法进行。

1.5 杂交后检测与图像处理

荧光原位杂交信号通过抗地高辛抗体偶联罗丹明偶联物 (anti digoxigenin rhodamine) 或抗生物素抗体偶联 FITC 偶联物 (anti biotin FITC) 检测 ,染色体用 DAPI 反染。镜检中获得清晰图像后 ,以气冷式数码相机 (CCD) 摄像 ,并将图像输入计算机中 ,用 Leica QFISH 软件调节对比度和亮度。

2 结果与分析

2.1 中 9S-1 的细胞学和分子细胞学鉴定

中 9S-1 是从中粳 3037 第 9 染色体短臂端三体自交后代中发现的。为了明确中 9S-1 的变异性质 ,首先对它进行细胞学鉴定。为此 ,在中 9S-1 苗期收集和固定其根尖 ,根据 Kurata 等^[8]的制片方法 ,检查了中 9S-1 体细胞中染色体数目。结果表明 ,每个体细胞中有 26 条染色体 ,比正常中粳 3037 体细胞染色体数目多 2 条 ,进一步比较每一视野每一个细胞中的 26 条染色体可以发现 ,有 2 条染色体的长度比正常染色体短 (如图 1-A 中两个箭头所示)。由

于中 9S-1 来源于第 9 染色体短臂的端三体 ,而且该端三体比普通二体多出的一条端着丝粒染色体本身就是长度很短的第 9 染色体短臂 ,所以初步判断中 9S-1 多出的两条染色体有可能是第 9 染色体短臂组成的端着丝粒染色体。为进一步验证这一推断的可靠性 ,同时考虑到中粳 3037 中 ,第 9 和第 10 染色体均为核仁染色体^[11] ,我们以水稻着丝粒特异 DNA 序列 (RCS₂)、水稻核仁染色体特异的重复序列——核糖体 DNA (45S rDNA) 以及第 9 染色体短臂的特异分子细胞学标记 (a0052116) 为探针 ,分别进行荧光原位杂交 (fluorescent *in situ* hybridization ,FISH) 分析。

2.1.1 以 RCS₂ 为探针进行 FISH 分析

为确定变异株中 9S-1 中额外增加的 2 条染色体是否是端着丝粒染色体 ,首先以 Biotin-16-dUTP 标记着丝粒特异 DNA 序列 (RCS₂) ,将标记过的 RCS₂ 与中 9S-1 体细胞早中期染色体进行原位杂交后 ,再以抗生物素抗体偶联 FITC 偶联物 (anti biotin FITC) 检测 ,染色体用 DAPI 反染后置于荧光显微镜下观察 ,结果如图 1-A 所示。在荧光显微镜下 ,染色体呈现蓝色荧光 ,且染色体的常、异染色质片段清晰可辨。Biotin-16-dUTP 标记的 RCS₂ 经 anti biotin FITC 检测之后呈现绿色荧光 ,可以清楚地发现绿色杂交信号位于每条染色体的着丝粒区域。从图 1-A 中可以看出 ,除了 12 对正常染色体有绿色杂交信号外 ,还有 1 对比较小的染色体有杂交信号 ,并且这对信号位于染色体的末端 (箭头所示) ,说明细胞中所添加的两条小染色体是端着丝粒染色体。由于普通水稻第 9 染色体的短臂相对于长臂是比较短的 ,从形态大小上分析 ,中 9S-1 细胞中这 2 条端着丝粒染色体与推断是一致的。

2.1.2 以 45S rDNA 为探针进行 FISH 分析

在正常中粳 3037 中 ,第 9、10 染色体是核仁染色体^[11] ,而真核生物的核仁染色体短臂末端一般都含有核糖体 DNA (45S rDNA)^[12] ,并且由于 45S rDNA 是重复序列 ,在进行 FISH 分析时可以获得可靠的杂交信号。为此 ,以 45S rDNA 为探针对中 9S-1 的两个端着丝粒染色体的来源作进一步检测。以 Digoxigenin-11-dUTP 标记 45S rDNA ,将标记过的 45S rDNA 与中 9S-1 体细胞早中期染色体进行原位杂交后 ,再以抗地高辛抗体偶联罗丹明偶联物 (anti digoxigenin rhodamine) 检测 ,染色体同样经 DAPI 反染后再经过以上处理的制片置于荧光显微镜下观察。可以看到在荧光显微镜下 ,染色体呈现

蓝色荧光, Digoxigenin-11-dUTP 标记的 45S rDNA 经 anti-digoxigenin-rhodamine 检测之后呈现红色荧光, 根据红色杂交信号的位置可以清楚判断细胞中的两对核仁染色体(图 1-A)。从图 1-A 中可以看出, 中 9S-1 除了正常的两对核仁染色体有杂交信号以外, 两个经 RCS₂ 检测为端着丝粒染色体上也有红色杂交信号, 说明这两个端着丝粒染色体的确是 1 对核仁染色体的短臂, 增加的 2 条端着丝粒染色体可能来源于第 9 染色体短臂。

2.1.3 以第 9 染色体短臂特异分子细胞学标记为探针进行 FISH 分析

选用第 9 染色体的短臂特异分子细胞学标记 a0052116 进一步进行 FISH 分析, 以进一步确定中 9S-1 细胞中额外增加的 2 条端着丝粒染色体是否是水稻第 9 染色体的短臂。由于 a0052116 是单拷贝序列, 为了提高检测的灵敏性和准确性^[13], 并研究这两条端着丝粒染色体的配对等行为, 本研究选择中 9S-1 的粗线期染色体进行 FISH 分析。先以 Digoxigenin-11-dUTP 标记 a0052116, 将标记过的

a0052116 与中 9S-1 粗线期染色体进行原位杂交, 再以抗地高辛抗体偶联罗丹明偶联物 (anti-digoxigenin-rhodamine) 检测, 染色体以 DAPI 反染。在荧光显微镜下, 染色体呈现蓝色荧光, Digoxigenin-11-dUTP 标记的 a0052116 经 anti-digoxigenin-rhodamine 检测之后呈现红色荧光(图 1-B)。结果表明, 在中 9S-1 细胞中除了正常的 1 对已联会形成二价体的第 9 染色体上有红色杂交信号外, 另外还有 1 个二价体结构上也有红色的杂交信号(箭头所示)。与正常的同源染色体联会形成的二价体相比, 这个二价体非常短, 但配对得非常好, 说明它们来源于细胞中的两条端着丝粒染色体。由此进一步证实中 9S-1 中添加的两条端着丝粒染色体来源于第 9 染色体的短臂, 中 9S-1 是第 9 染色体短臂的端四体。

在真核生物中, 正常染色体的长短臂末端都有端粒的存在, 它们是维持线性染色体稳定性的重要结构。端着丝粒染色体是染色体在着丝粒部位错分裂形成的, 因而在其形成初期臂的一端有端粒, 而另

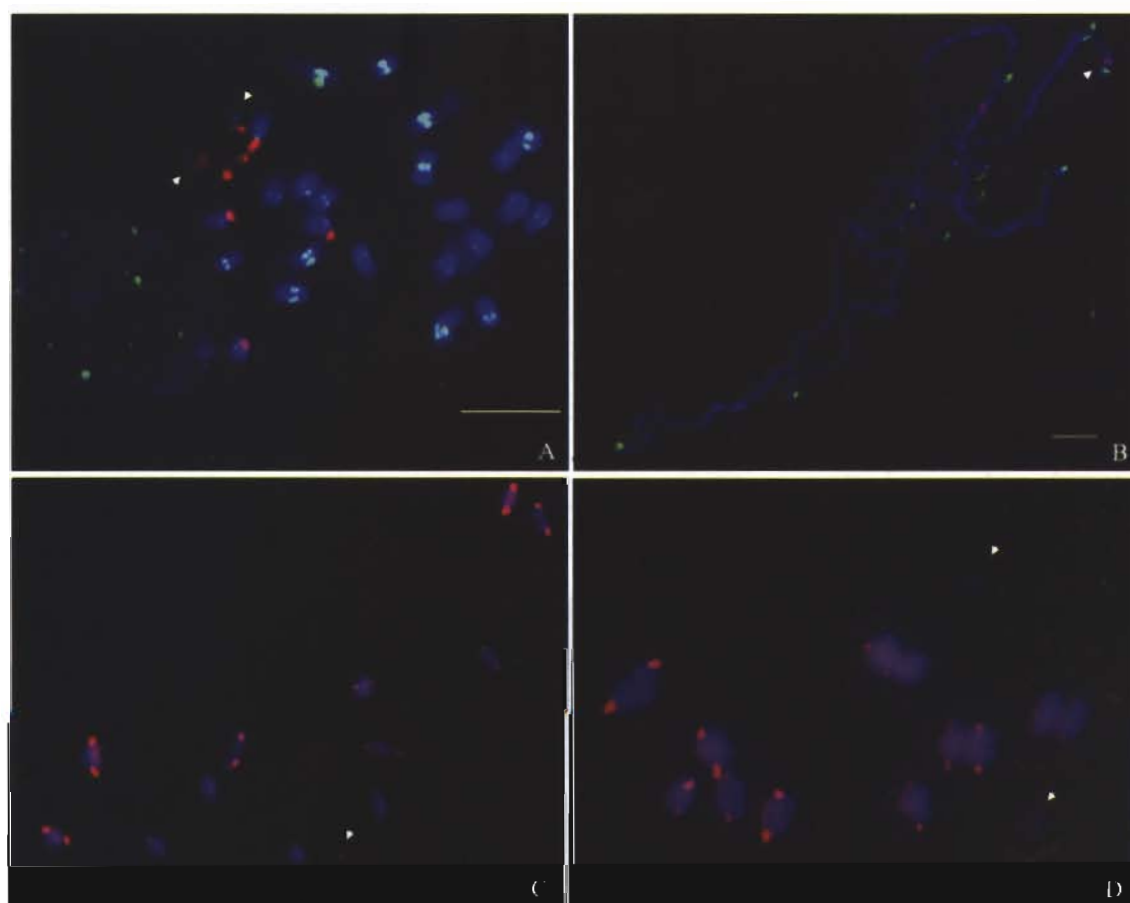


图 1 不同探针对中 9S-1 有丝分裂和减数分裂染色体的荧光原位杂交分析

Fig. 1. Fluorescent *in situ* hybridization with different probes on mitosis and meiosis chromosomes of Zhong 9S-1.

A—有丝分裂染色体, 探针为 45S rDNA(红色)、RCS₂(绿色); B—减数分裂染色体, 探针为端粒 DNA(绿色)、a0052116(红色); C 和 D—减数分裂染色体, 探针为 RCS₂(红色)。图中染色体都以 DAPI 染色, 显示为蓝色。所有标尺均为 5 μm。

A, Mitosis chromosomes, probes are 45S rDNA(red) and RCS₂(green); B, Meiosis chromosomes, probes are pAtT4 DNA(green) and a0052116(red); C and D, Meiosis chromosomes, probe is RCS₂(red). Chromosomes were counterstained with DAPI in all images. Scale bars are 5 μm in all images.

一端(靠着丝粒的一端)不存在端粒。但是端着丝粒染色体为了其结构的稳定性以及正常地传递,错分裂部分又会有新端粒的形成。我们以 Biotin-16-dUTP 标记的端粒 DNA(pAtT4)与中 9S-1 粗线期染色体进行原位杂交,再以抗生物素抗体偶联 FITC 偶联物检测,染色体以 DAPI 反染,结果如图 1-B 所示。在荧光显微镜下,染色体呈现蓝色荧光,biotin-dUTP 标记的 pAtT4 经 anti-biotin-FITC 检测之后呈现绿色荧光,从图 1-B 中可以看出每条染色体末端都有杂交信号,并且已发生联会的端着丝粒染色体的两个末端都有绿色信号分布,表明这两个增加的端着丝粒染色体在发生断裂的着丝粒部位已经添加端粒 DNA。

2.2 中 9S-1 的减数分裂行为分析

进一步根据中 9S-1 在减数分裂中的染色体配对情况分析了端四体中 9S-1 中添加的 1 对端着丝粒染色体在减数分裂时的行为特征。在多数细胞中,1 对端着丝粒染色体在减数分裂前期 I 的粗线期可配对形成正常的二价体,一般不与正常的第 9 染色体发生联会形成多价体(图 1-B)。在检测的 25 个处于粗线期的细胞中,端着丝粒染色体正常配对的达 24 个,占 96%,到中期 I 时,端着丝粒染色体配对形成的二价体可以排列到赤道板(图 1-C)上。但并不是所有的细胞都如此,在部分细胞中由端着丝粒染色体配对形成的二价体会提前解离(图 1-D)。在所观察的 11 个中期 I 的细胞中,这类细胞有 5 个,频率达 45%。

2.3 中 9S-1 植株的形态特征

端四体由于是在正常染色体的基础上添加了两

条端着丝粒染色体形成的,它们在植株的性状表现上与普通的中粳 3037 明显不同,与原来的端三体也有明显差异。根据我们对中 9S-1 的调查,与正常中粳 3037 和原来的端三体相比,它的剑叶和穗长均变短,结实率差,仅为 28.0%,但株高变化不明显(图 2)。中 9S-1 的叶片形状也与中粳 3037 有明显差异,表现变窄、内卷,株型偏散,穗型小。说明两条第 9 染色体短臂的添加对植株性状的影响很明显。

2.4 中 9S-1 有性繁殖后代的遗传表现

端四体中 9S-1 是部分不育的,我们收集了中 9S-1 的种子,并种植了后代,研究它的遗传表现。在 20 株后代中,有 15 株恢复了正常,它们与普通中粳 3037 形态极为相似;有 3 株形态与第 9 染色体的端三体十分相似;有 2 株形态与端四体相同;说明端四体本身是不稳定的。从理论上分析,端四体中 9S-1 形成的配子可能以 n (正常染色体配子)、 $n+9S$ (增加一条端着丝粒染色体的配子)为主,如果雌雄配子都可育(部分可育),那么变异株的自交后代会形成正常二倍体、端三体和端四体 3 种类型。

3 讨论

植物中在正常染色体基础上添加两条普通染色体形成的四体已有报道^[14-18]。在这些报道中对添加染色体的鉴定,一般是根据染色体的形态或采用分带技术进行的。近年来随着分子细胞学技术的迅速发展,利用 FISH 的方法来确定添加染色体的来源^[19],可以大大提高鉴别对象的准确性。端四体材料是四体的一种,目前相关报道很少。我们曾获得过成套水稻的端三体材料^[5],从端三体的后代中也

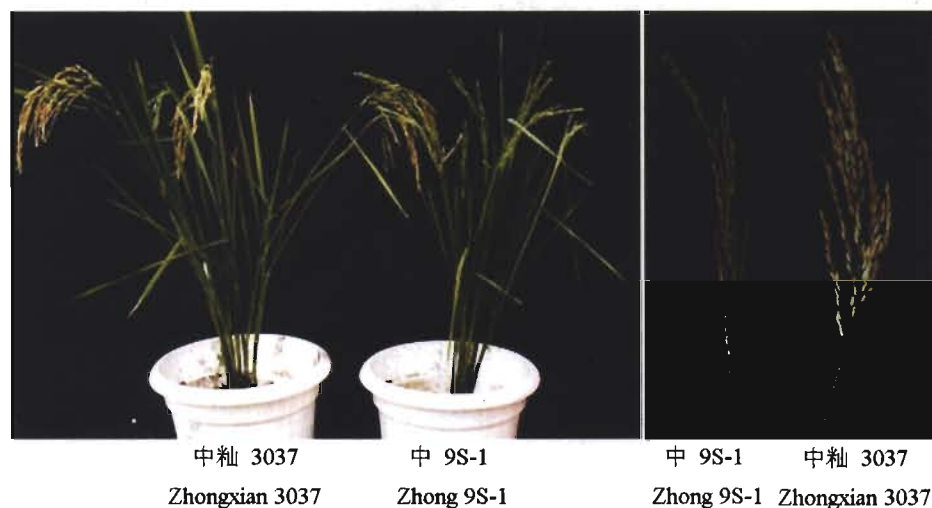


图 2 中 9S-1 及其亲本中粳 3037 的形态

Fig. 2. Morphology of Zhong 9S-1 and its wild parent Zhongxian 3037.

曾发现过端四体的分离,但由于种种原因,未能对它们作系统研究。本文报道的端四体材料也来源于端三体的后代,通过 FISH 技术准确地确定该材料中所添加两条染色体的性质及来源。端四体中添加的两条染色体臂对植株的性状也产生了明显影响。在端四体中 9S-1 中突出地表现为育性降低和叶形变窄内卷。由于水稻不同染色体和染色体臂携带的基因不同,不同端四体的性状表现也应该有所差异。

同源染色体配对是减数分裂过程中重要的染色体行为之一,当同源染色体多于 2 条时,在配对时会形成多价体^[18-20]。在增加 2 条正常第 9 染色体的水稻四体材料中,会形成多价体^[18],但在本研究中发现所增加的 2 条第 9 染色体臂基本上不会与正常的第 9 染色体发生配对形成多价体,而是两条增加的染色体臂配对在一起。这可能是由于增加的这一对染色体臂在发生断裂的着丝粒区域增加了新的端粒,而使端着丝粒染色体靠着丝粒一端的末端结构与正常第 9 染色体末端不同有关,因为在同源染色体配对时,端粒一般起着同源染色体识别的作用^[21]。另外,由于所增加的两条染色体臂非常短,发生交换的频率比较低,所以形成的二价体会发生提前解离的现象。对其发生的机理还有待进一步研究。

参考文献：

[1] Hu C H . Studies on the development of twelve types of trisomic in rice with reference to genetic and breeding programme . *J Agric Assoc , China : New Series* , 1968 , 63 : 53-71 .

[2] Khush G S , Singh R J , Sur S C , Librojo A L . Primary trisomies of rice : Origin , morphology , cytology and use in linkage mapping . *Genetics* , 1984 , 107 : 141-163 .

[3] 程祝宽 , 于恒秀 , 潘学彪 , 等 . 一种水稻端三体的细胞学研究 . *江苏农学院学报* , 1997 , 18(3) : 43-45 .

[4] 程祝宽 , 李欣 , 于恒秀 , 等 . 一套新的籼稻初级三体的选育及其细胞学鉴定 . *遗传学报* , 1996 , 23(5) : 363-371 .

[5] 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 .

[6] Cheng Z K , Yan H H , Dang B Y , et al . Microdissection and amplification of the chromosome arm 5S in a rice telo-

tetrasomic . *Chinese Sci Bull* , 1998 , 43(7) : 590-594 .

[7] Wang Z X , Ideta O , Yoshimura A , et al . Identification of extra chromosome of aneuploids and tetrasomics in rice and the use of these aneuploids in genome analysis . *Breeding Sci* , 1995 , 45 : 327-330 .

[8] Kurata N , Omura T . Karyotype analysis in rice : . A new method for identifying all chromosome pairs . *Jpn J Genet* , 1978 , 53 : 251-255 .

[9] Wu H K . Note on preparing of pachytene chromosomes by double mordant . *Sci Agric* , 1967 , 15 : 40-44 .

[10] 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 .

[11] 程祝宽 , 顾铭洪 . 籼、粳稻及其杂种粗线期的核型分析 . *遗传学报* , 1994 , 21(5) : 385-392 .

[12] 龚志云 , 吴信淦 , 程祝宽 , 等 . 水稻 45srDNA 和 5srDNA 的染色体定位研究 . *遗传学报* , 2002 , 29(3) : 241-244 .

[13] Cheng Z H , Buell C R , Wing R A , Jiang J M . Resolution of fluorescence *in situ* hybridization mapping on rice mitotic pro-metaphase chromosomes , meiotic pachytene chromosomes and extended DNA fibers . *Chromosome Res* , 2002 , 10 : 379-387 .

[14] 高俊华 , 毛丽萍 , 王润奇 . 谷子四体的细胞学和形态学研究 . *作物学报* , 2000 , 26(6) : 801-804 .

[15] 胡保民 , 张天真 , 潘家驹 . 陆地棉三体的诱导、鉴定、研究和利用 : . 额外染色体的传递及四体的分离 . *作物学报* , 1996 , 22(3) : 283-287 .

[16] Wang Z X , Iwata N . Aneuploids and tetrasomics in rice (*Oryza sativa* L .) derived from anther culture of trisomics . *Genome* , 1995 , 38 : 696-705 .

[17] Wang Z X , Iwata N . Producing of n + 1 plants and tetrasomics by means of anther culture of trisomics plants in rice (*Oryza sativa* L .) . *Theor Appl Genet* , 1991 , 83 : 12-16 .

[18] 于恒秀 , 程祝宽 , 李欣 , 等 . 两种水稻四体的分离和细胞学鉴定 . *中国水稻科学* , 1999 , 13(4) : 193-196 .

[19] Cheng Z H , Buell C R , Wing R A , et al . Toward a cytological characterization of the rice genome . *Genome Res* , 2001 , 11 : 2133-2141 .

[20] Singh K , Multani D S , Khush G S . Secondary trisomics and telotrisomics of rice : Origin , characterization and use in determining the orientation of chromosome map . *Genetics* , 1996 , 143 : 517-529 .

[21] de La Roche Saint Andre C . Alternative ends : Telomeres and meiosis . *Biochimie* , 2008 , 90 : 181-189 .