

利用 C 基因组 *Cot-1* DNA 比较分析 稻属 A, B, C, D 基因组

蓝伟侦* 覃瑞* 李刚 何光存†

(中南民族大学生命科学院生物技术国家民族事务委员会重点实验室, 武汉 430074; 武汉大学生命科学院, 植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072. * 同等贡献. † 联系人, E-mail: gche@whu.edu.cn)

摘要 以药用野生稻(CC) *Cot-1* DNA 作为探针, 对其自身体细胞染色体和栽培稻×药用野生稻杂交后代 F_1 , 回交后代 BC_1 以及宽叶野生稻(CCDD), 高秆野生稻(CCDD)和斑点野生稻(BBCC)体细胞染色体进行荧光原位杂交实验. 在药用野生稻体细胞染色体中, 同源染色体呈现相似的 *Cot-1* DNA 杂交带型, 并对其核型进行了同源性聚类. 对 F_1 (AC)和 2 个 BC_1 (AAC 和 ACC)的杂交实验中, 在不封阻的情况下, 药用野生稻 C 基因组 *Cot-1* DNA 探针能清晰地鉴别 C 组染色体, 而在 A 组染色体上信号分布很少, 说明 A 基因组与药用野生稻 C 基因组中高度重复序列同源性较低. 此外, 对宽叶野生稻、高秆野生稻和斑点野生稻 3 个四倍体体细胞染色体进行了 FISH 分析, 在 24 条 C 组染色体上均可观察到较强的杂交信号, B 和 D 基因组的 24 条染色体上信号较少, 但在 D 组染色体上的信号较 B 组染色体的多, 说明 D 与 C 基因组的亲缘关系较 B 与 C 基因组的近. 进一步分析发现, 高秆野生稻 D 组染色体上的杂交信号要比宽叶野生稻 D 组染色体上的杂交信号多, 说明高秆野生稻的 D 基因组与 C 基因组的同源性要高, 这可能是高秆野生稻和宽叶野生稻同属于 CCDD 染色体组型但可区分为不同种的原因之一. 上述结果表明, *Cot-1* DNA 具有很强的种的特异性和依赖基因组型的特异性, 利用 *Cot-1* DNA 作探针更能有效地对不同基因组进行 FISH 鉴定. 同时, 本研究采用 F_1 植株和 BC_1 植株, 即 1 个二倍体和 2 个三倍体人工选育杂种, 与宽叶野生稻、高秆野生稻和斑点野生稻进行了基于 C 基因组 *Cot-1* DNA 杂交的比较分析, 对稻属异源四倍体的可能起源机制进行了初步探讨.

关键词 *Cot-1* DNA 染色体 基因组 原位杂交 稻属

稻属(*Oryza*)含有 2 个栽培种, 即亚洲栽培稻(*O. sativa* L)和非洲栽培稻(*O. glaberrima* Steud), 以及 20 余个野生种^[1], 其染色体组分别为 AA, BB, EE, FF, GG, BBCC, CC, CCDD, HHJJ和HHKK^[2,3]. 由于稻属中许多性状在一些物种内变异较大, 而种间差异很小, 加上杂交事件和多倍体普遍存在, 以及分布广而复杂的特点^[4], 为了便于稻属中物种的界定和合理体现各个种间的关系, Vaughan等人^[5,6]把稻属分成 4 个复合体, 即栽培稻复合体(*O. sativa* complex)、药用野生稻复合体(*O. officinalis* complex)、马来野生稻复合体(*O. ridleyi* complex)、疣粒野生稻复合体(*O. meyeriana* complex). 其中, 药用野生稻复合体含有 10 个种, 涵盖了 BB, CC, EE, BBCC和CCDD共 5 种类型染色体组^[3]. C基因组是药用野生稻复合体的最基本的基因组成分, 由于该复合体中同时存在二倍体和四倍体多个物种, 而且这些物种在形态上的相似性、地理分布的相互重叠以及历史上频繁的杂交和多倍化,

使得该复合体成为稻属中最大、最复杂, 也最具丰富多样性的群体^[4,7]. 对稻属基因资源研究表明, 野生稻是栽培稻遗传改良的丰富基因资源. 在药用野生稻复合体中, 药用野生稻(*O. officinalis*, CC)、宽叶野生稻(*O. latifolia*, CCDD)、高秆野生稻(*O. alta*, CCDD)和斑点野生稻(*O. punctata*, BBCC)就具有抗病、抗虫、抗逆等多种优良特性^[8-11]. 因此, 弄清稻属种间的遗传关系, 将有助于更好地保护和利用野生稻中的遗传资源.

基因组原位杂交(genomic *in situ* hybridization, GISH)技术是鉴别异源多倍体的基因组组成、分析异源多倍体基因组的起源和进化, 以及不同基因组相互关系的简便而十分有效的工具之一. Fukui等人^[12]利用药用野生稻总DNA作为探针, 分别对小粒野生稻(*O. minuta*)和宽叶野生稻染色体进行基因组原位杂交, 把这两个野生种鉴定为BBCC和CCDD染色体组. Shishido等人^[13]运用多色基因组原位杂交

(multicolor genomic *in situ* hybridization, McGISH)方法对一个栽培稻与野生稻的杂种(AABBCC)进行了鉴别. 在此基础上, Li等人^[14,15]进一步运用McGISH技术确定马蓝普野生稻(*O. malampuzhaensis*)为BBC基因组, 同时利用药用野生稻(CC)和澳洲野生稻(EE)总DNA作为探针, 对C, D和E基因组间的亲缘关系进行了研究, 表明基因组E与C, D的亲缘关系比基因组C与D的亲缘要远, 基因组E与C的亲缘关系则近于基因组E与D的亲缘关系.

DNA重复序列散布于整个基因组中, 是真核生物基因组的重要特征和重要组成部分^[16,17]. 在高等植物中, 重复序列通常达基因组成分的 50%以上^[18,19], 如水稻、玉米、小麦、黑麦及柠檬, 其百分比分别为 50%, 78%, 83%, 92%和 95%^[19,20], 占了高等植物基因组的绝大部分. 已有研究表明, 重复序列在基因组进化中可能扮演着重要角色. 如一个基因组重复序列的拷贝数在染色体位点进化很快, 导致形成物种的特异基因组成分, 甚至产生另外一条染色体^[21-24]. 通过这些重复序列的变异来研究物种歧化和基因组起源, 可以确定其原始祖先并建立不同物种和基因组之间的进化树^[23]. 在这方面, 重复序列DNA探针优于基因组DNA探针. Linares等人^[25]以A和C基因组特异重复序列为探针, 通过双色荧光原位杂交鉴别了六倍体燕麦(AACCDD)中的两个相近基因组A和D. 此外, 人们也利用一些特异重复序列作为探针进行分子杂交, 用来识别染色体、构建遗传图谱和物理图谱、研究基因渗入以及基因组的组成和分化^[26-32].

Cot-1 DNA主要为中度和高度重复序列, 包含卫星DNA, 微卫星DNA, 核糖体DNA以及端粒、着丝粒重复序列等重复序列, 决定着染色体的重要结构和特征^[33]. 本研究利用药用野生稻*Cot-1* DNA作为探针, 对自身体细胞中期染色体进行原位杂交, 来确定

重复序列在基因组中分布情况. 同时, 在未封阻的情况下, 对栽培稻×药用野生稻杂交后代 F_1 及回交后代 BC_1 体细胞染色体进行原位杂交, 鉴别了杂交后代异源基因组成分. 同样, 进一步利用该药用野生稻 *Cot-1* DNA, 对宽叶野生稻(CCDD)、高秆野生稻(CCDD)和斑点野生稻(BBCC) 3 个四倍体野生稻种进行原位杂交比较分析. 通过研究 *Cot-1* DNA 在基因组 B, C 和 D 中的分布状况, 来分析 C 基因组和 B, C 和 D 不同基因组间的亲缘关系, 并初步探讨水稻重复序列在基因组中的起源和进化特点.

1 材料与方法

() 植物材料和染色体制片. 供试材料为药用野生稻(*O. officinalis* Wall)稻株HY018 (原产广西, 具有高抗病虫害特性)、栽培稻(*O. sativa* L)珍汕 97B与药用野生稻HY018 的杂种 F_1 植株以及利用亲本珍汕 97B和药用野生稻HY018 与 F_1 回交的 2 个 BC_1 植株, 由武汉大学遗传研究所提供. 宽叶野生稻(*O. latifolia*) IRW6, 高秆野生稻(*O. alta*) IRW41 和斑点野生稻(*O. punctata*) IRW31 由华南农业大学卢永根院士提供, 实验材料情况见表 1. 染色体制片参照Ren等人^[34]方法.

() *Cot-1* DNA的制备. 采用CTAB法提取药用野生稻总DNA, 参照Doyle等人^[35]的方法稍作修改. *Cot-1* DNA制备参照Zwick等人^[33]的方法, 总DNA于 0.14 MPa 高压灭菌 3~15 min, 使其打断成长 800~1500 bp的片段, 根据 *Cot-1* DNA动力学公式 $Cot-1 = C(\text{mol/L}) \times Ts$, 计算*Cot-1* DNA完全复性所需的时间. *Cot-1* DNA完全复性后, 用S1 核酸酶(2 U/ μ g DNA, Promega) 37 酶解 1 h, 平衡酚抽提, 无水乙醇沉淀过夜, 12000 r/min离心 10 min, 70%的乙醇洗涤, 于TE缓冲液中溶解, 得到所需*Cot-1* DNA.

() 探针标记. 探针采用切刻平移试剂盒

表 1 各稻种的染色体数、基因组及地理分布

稻种名称	染色体数目	基因组	分布
药用野生稻(<i>O. officinalis</i>)	24	CC	亚洲热带、亚热带、澳大利亚亚热带
宽叶野生稻(<i>O. latifolia</i>)	48	CCDD	拉丁美洲
高秆野生稻(<i>O. alta</i>)	48	CCDD	拉丁美洲
斑点野生稻(<i>O. punctata</i>)	48	BBCC	非洲
栽培稻×药用野生稻 F_1 植株	24	AC	-
BC_1 植株(栽培稻回交)	36	AAC	-
BC_1 植株(药用野生稻回交)	36	ACC	-

(Nick Translation Kit, Roche)方法进行标记,用生物素-11-dUTP 标记药用野生稻 *Cot-1* DNA. 20 μ L 反应体系中含有 dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 生物素-11-dUTP, DNase, DNA 聚合酶, 0.2~0.5 μ g 探针 DNA, 于 15 标记 1.5~3 h, 经凝胶电泳检测标记探针长为 200~500 bp, 加入 1 μ L 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 终止反应. Sepharose CL-6B (Sigma) 纯化探针, 抗生物素蛋白的碱性磷酸酶(AP, alkaline phosphatase conjugate, Roche)的点印记法检测标记效果.

() 原位杂交及检测. 荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)方法分别参阅 Jiang 等人^[36]和 Li 等人^[14,15]的方法. 染色体于 60 烤片 1 h 制片, RNase A/2 \times SSC (10 μ g/mL) 37 处理 1 h, 2 \times SSC 室温漂洗 10 min, 胃蛋白酶(Genview)/10 mmol/L HCl (5 μ g/mL) 处理 15 min, 2 \times SSC 室温漂洗 10 min, 甲醛/1 \times PBS 室温固定 10 min, 70% 甲酰胺 70 变性 3.5~5 min, -20 用 70%, 95% 和 100% 乙醇各脱水 5 min, 室温晾干. 杂交液含 80 ng 标记的探针 DNA, 50% 去离子甲酰胺 (Sigma), 8% 的硫酸葡聚糖 (Amresco), 2 \times SSC, 0.5% SDS, 0.5 μ g 鲑鱼精 DNA (DNA Salmon, Sigma). 37 杂交过夜. 杂交信号的检测: 42 20% 甲酰胺, 2 \times SSC, 0.2 \times SSC 洗脱, 室温 0.1% Triton X-100 (Sigma) 处理 5 min, 室温 1 \times PBS 洗脱并凉干片子. 每张片子加入 streptavidin-Cy3 (Rockland), 37 温育 1 h, 1 \times PBS 室温洗涤 3 次, 每次 5 min. 10 μ g/mL DAPI (Sigma) 复染, Olympus BX61 荧光显微镜观察, 用 Case Data Manager Expo 2.1.1 图像系统控制的 Cool-1300QS CCD (VDS, Germany) 照相系统摄取图片.

2 结果与分析

2.1 药用野生稻自身 *Cot-1* DNA 原位杂交及其核型分析

用药用野生稻自身 *Cot-1* DNA 作为探针, 对有丝分裂中期染色体进行原位杂交, 其结果见图 1(a)~(c). 在实验中, 杂交严紧度和洗脱严紧度分别为 65%~75% 和 80%~90%^[14]. 图 1(a) 为药用野生稻 *Cot-1* DNA 的杂交信号, 图 1(b) 和 (c) 为染色体与杂交信号的合成图. 根据杂交结果来看, *Cot-1* DNA 主要分布在染色体的着丝粒、近着丝粒和端粒区域, 染色体臂的中部相对要少. 从信号的分布特点来看, *Cot-1* DNA 在染色体上的分布具有特异的杂交带型. 同源

染色体呈现相似 *Cot-1* DNA 杂交带型, 根据染色体从长到短进行了配对排序分析见图 2(j). 从图 1(a)~(c) 和图 2(j) 可以看出, 在药用野生稻第 1, 2, 4 和 6 染色体上, 重复序列信号主要分布在端粒、着丝粒和近着丝粒区. 在染色体第 3 和 7 染色体上, 重复序列信号主要集中在染色体短臂的端粒区. 第 10 和 11 染色体重复序列信号主要分布在着丝粒区, 而第 9 染色体重复序列主要在长短臂的端部. 其余第 5, 8 和 12 染色体上的信号分布较少, 并且分布相对较分散.

2.2 栽培稻 \times 药用野生稻杂交后代 F_1 及回交后代 BC_1 的 *Cot-1* DNA 原位杂交

用药用野生稻 *Cot-1* DNA 作为探针, 在不封阻的情况下, 对栽培稻 \times 药用野生稻杂交后代 F_1 植株 (AC), 以及两个回交后代 BC_1 植株 (AAC 和 ACC) 体细胞染色体进行原位杂交, 其结果见图 1(d)~(l). 在杂种 F_1 体细胞中期分裂相中 (图 1(f)), 可明显见到 12 条染色体具有较强红色信号, 属于药用野生稻的 C 组染色体, 另 12 条染色体杂交信号分布微弱, 属于栽培稻的 A 组染色体. 图 1(g)~(i) 分别为 BC_1 植株 (AAC) DAPI 复染的染色体、杂交信号及其合成图. 从图中可见, 12 条染色体的大部分区域被染成红色, 而且信号点集中地分布在染色体的着丝粒、近着丝粒和端粒区 (图 1(i)), 它们应属于药用野生稻的 C 组染色体; 另 24 条染色体几乎观察不到红色杂交信号, 应属于栽培稻 A 组染色体 (图 1(i)). 而在另一个 BC_1 植株 (ACC) 体细胞中期分裂相中 (图 1(k)), 则有 24 条染色体集中分布红色信号, 另 12 条蓝色的几乎不存在红色杂交信号, 它们应分别来源于药用野生稻和栽培稻. 两个 BC_1 植株 AAC 和 ACC 的红色杂交信号强度与杂种 F_1 的杂交信号接近, 并且具有相似的带型, 说明它们均来源于药用野生稻的染色体组. 从 BC_1 植株 (ACC) 有丝分裂后期染色体杂交结果来看 (图 1(l)), 可明显地观察到药用野生稻染色体 (红色) 和栽培稻染色体 (蓝色) 彼此聚合并向两极移动. 此外, 已知药用野生稻基因组大小为 697 Mb, 栽培稻约为 450 Mb^[37]. 从 AC 杂种和两个 BC_1 植株的 FISH 结果中, 可以直观地观察到药用野生稻染色体 (红色) 普遍比栽培稻染色体 (蓝色) 长 (图 1(f), (i), (k)). 用 SPOT advanced 软件测量染色体长度并统计, 栽培稻 A 组染色体与药用野生稻 C 组染色体总长度的比值约为 1 : 1.5, 与这两个基因组大小比值基本一致. 另外, 对杂种 F_1 植株进行了核型分析, 其结果见表 2.

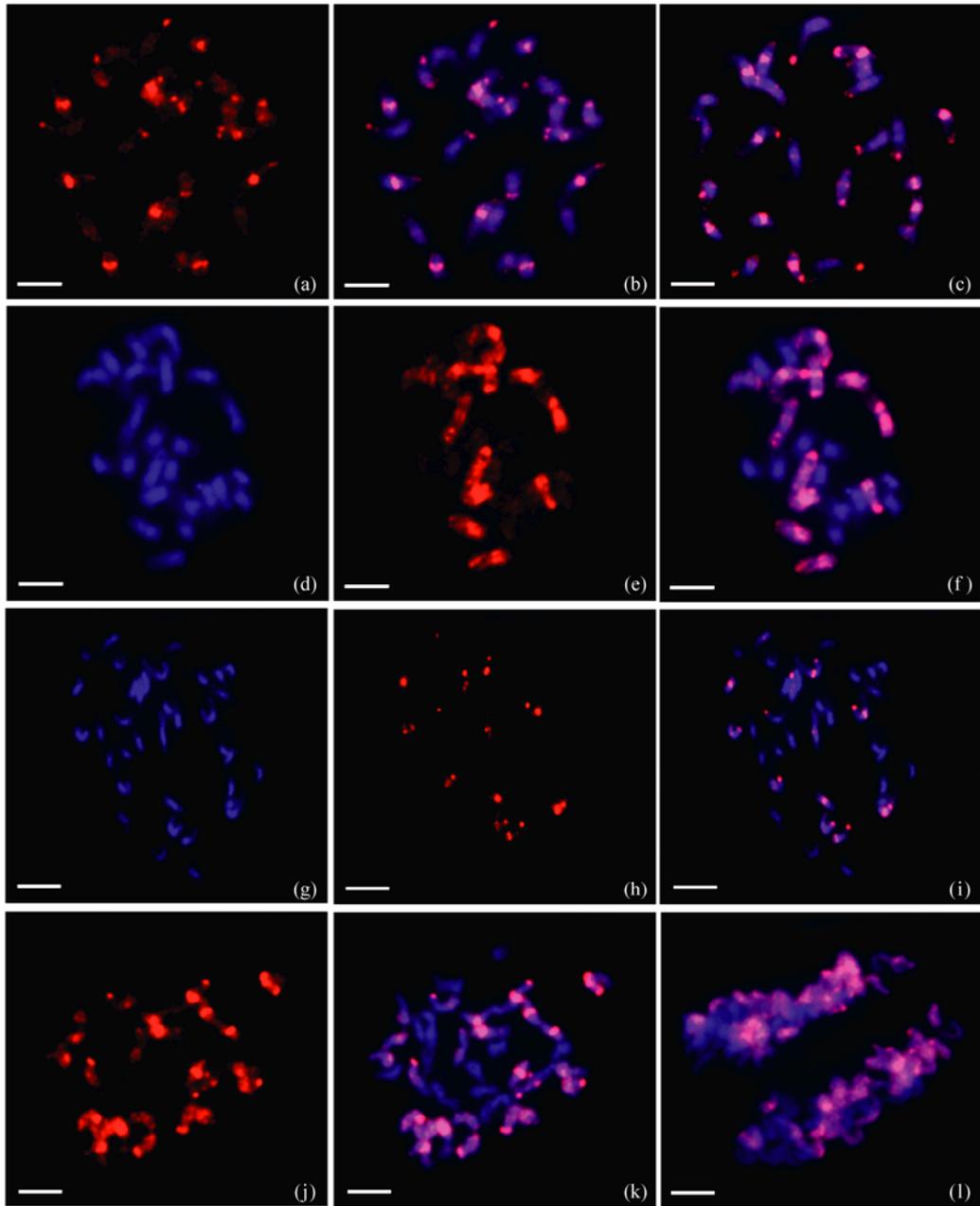


图 1 药用野生稻自身 C_{0t-1} DNA 原位杂交以及药用野生稻 C_{0t-1} DNA 对栽培稻×药用野生稻 F_1 植株及回交后代 BC_1 植株体细胞染色体原位杂交结果

(a) 药用野生稻(CC)自身 C_{0t-1} DNA 杂交信号; (b)和(c) 药用野生稻自身 C_{0t-1} DNA 在中期染色体上的 FISH 图像, 其中(b)为染色体 DAPI 复染后与(a)的合成图; (d)~(f) 分别是栽培稻×药用野生稻 F_1 植株(AC) DAPI 复染的染色体、杂交信号及其合成图; (g)~(i) 分别是栽培稻×药用野生稻 BC_1 植株(AAC) DAPI 复染的染色体、杂交信号以及其合成图; (j)~(l) 栽培稻×药用野生稻 BC_1 植株(ACC) 杂交信号及其合成图, 其中(i)为后期染色体的 FISH 图像. 标尺为 5 μ m

2.3 CC 基因 C_{0t-1} DNA 对 CCDD 和 BBCC 野生种基因组的原位杂交

用药用野生稻 C_{0t-1} DNA 作为探针, 对宽叶野生稻(CCDD)、高秆野生稻(CCDD)和斑点野生稻(BBCC)

体细胞中期染色体进行原位杂交, 其结果见图 2(a)~(i). 图 2(a)为 DAPI 染色的 48 条宽叶野生稻染色体. 图 2(b)为药用野生稻 C 基因组 C_{0t-1} DNA 探针的杂交信号. 可以明显地观察到信号主要集中在 24 条染色

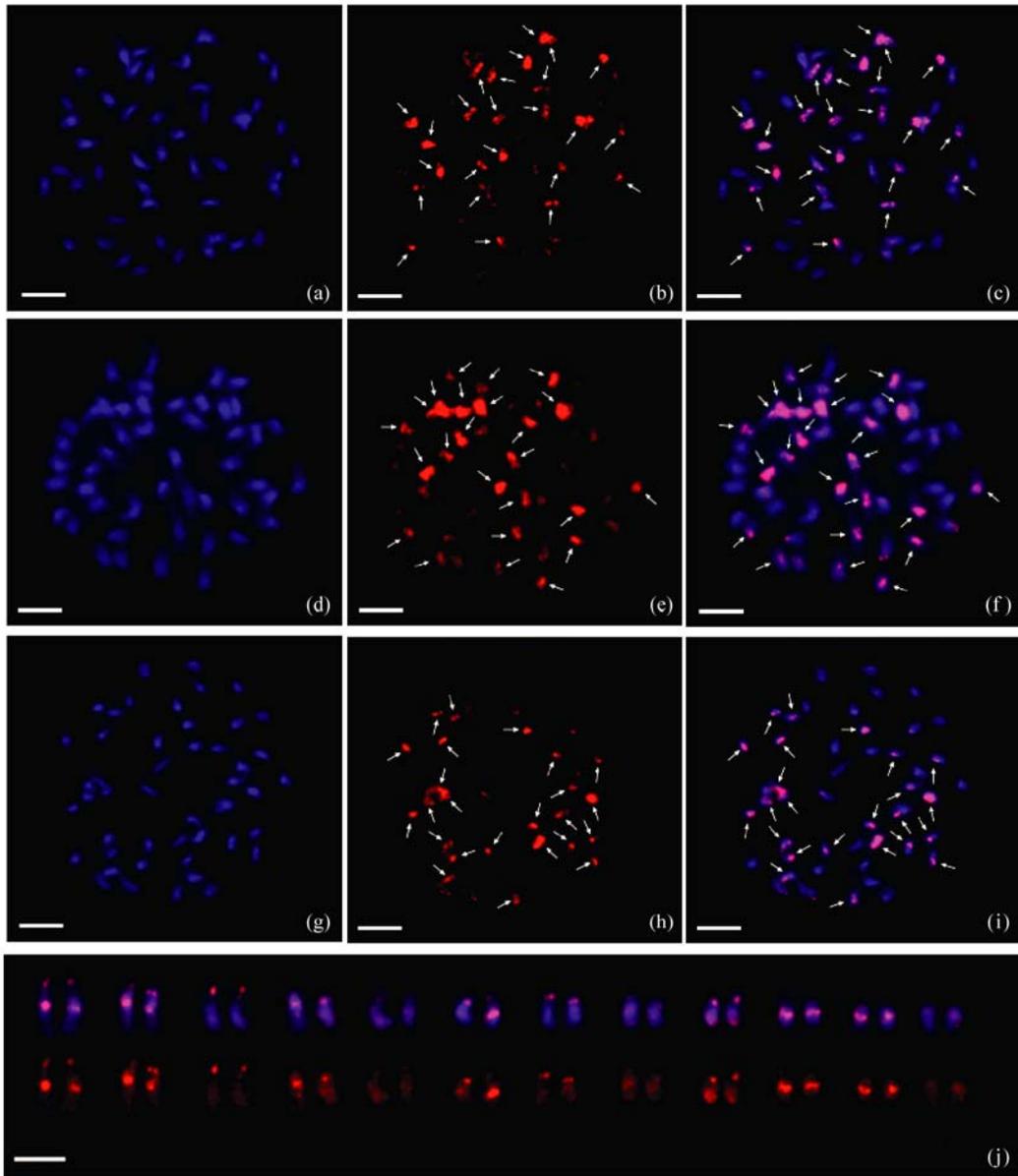


图 2 药用野生稻 *Cot-1* DNA 对宽叶野生稻、高秆野生稻和斑点野生稻中期染色体原位杂交结果以及基于 FISH 图像的药用野生稻核型

(a)~(c) 分别是宽叶野生稻(CCDD) DAPI 复染的染色体、杂交信号及其合成图, 箭头号标示 C 组染色体上的杂交信号; (d)~(f) 分别是高秆野生稻(CCDD) DAPI 复染的染色体、杂交信号及其合成图, 箭头号标示 C 组染色体上的杂交信号; (g)~(i) 分别是斑点野生稻(BBCC) DAPI 复染的染色体、杂交信号及其合成图, 箭头号标示 C 组染色体上的杂交信号; (j) 基于自身 *Cot-1* DNA 信号带型的药用野生稻核型. 标尺为 5 μm

体上, 表明这 24 条染色体与药用野生稻 C 基因组同源性较高, 应属于宽叶野生稻 C 组染色体(箭头所示), 信号较少染色体属于 D 基因组. 图 2 为(a)和(b)的合成图, 杂交信号在 C 组染色体分布特点与药用野生稻自身 *Cot-1* DNA 带型有较大的区别(图 1(b), (c)), 说明在药用野生稻染色体和宽叶野生稻 C 组染色体中,

其中度和高度重复序列构成存在差异. 另外, 在一些 D 组染色体上也存在一些较弱的信号.

图 2(d)为 DAPI 复染的高秆野生稻(CCDD)染色体. 药用野生稻 *Cot-1* DNA 在高秆野生稻染色体上的杂交信号见图 2(e), 图 2(f)为(d)和(e)的合成图. 在其中期分裂相中, 可以明显地观察到 24 条染色体具有

表 2 栽培稻×药用野生稻杂种 F₁ 植株的核型分析

染色体编号	栽培稻 A 组染色体				药用野生稻 C 组染色体			
	实际长度/ μm	相对长度	臂比粒	着丝位置	实际长度/ μm	相对长度	臂比	着丝粒位置
1	3.91±0.16	11.70±0.36	1.27±0.32	m ^{a)}	5.83±0.53	11.65±0.38	1.40±0.43	m
2	3.74±0.23	11.19±0.11	1.23±0.25	m	5.43±0.41	10.85±0.10	1.51±0.27	m
3	3.43±0.37	10.26±0.34	1.87±0.31	sm ^{b)}	5.14±0.12	10.27±0.12	2.13±0.11	sm
4	3.05±0.17	9.12±0.28	1.11±0.35	m	4.66±0.25	9.31±0.31	1.23±0.46	m
5	2.96±0.12	8.85±0.24	1.28±0.21	m	4.49±0.19	8.97±0.17	2.41±0.57	sm
6	2.83±0.49	8.47±0.19	1.12±0.29	m	4.20±0.42	8.39±0.23	1.30±0.40	m
7	2.75±0.21	8.23±0.45	2.85±0.36	sm	4.01±0.37	8.01±0.15	1.84±0.24	sm
8	2.48±0.39	7.41±0.26	1.77±0.14	sm	3.78±0.14	7.55±0.35	1.27±0.34	m
9	2.27±0.33	6.79±0.37	1.39±0.12	m	3.58±0.11	7.15±0.21	1.28±0.13	m
10	2.21±0.16	6.61±0.16	1.47±0.49	m	3.23±0.29	6.15±0.16	1.26±0.52	m
11	1.97±0.27	5.89±0.22	1.86±0.41	sm	2.95±0.32	5.90±0.40	1.27±0.39	m
12	1.83±0.24	5.47±0.50	1.21±0.17	m	2.74±0.24	5.48±0.47	2.11±0.18	sm

a) 中间着丝粒; b) 亚中间着丝粒

较强的红色信号, 这些染色体应该属于 C 基因组(箭头所示), 其余的 24 条染色体分布少量较弱的杂交信号, 则应属于 D 基因组(图 2(e), (f)). 从 2 个 CCDD 染色体组野生种的杂交结果来看, D 染色体上均存在一些杂交信号, 说明 C 和 D 基因组之间的中度和高度重复序列亦具有部分的同源性.

图 2(g)为 DAPI 复染的斑点野生稻(BBCC)染色体, 图 2(h)和(i)分别为 *Cot-1* DNA 在斑点野生稻染色体上的杂交信号及其合成图. 同样, 可以很容易地区分出斑点野生稻 B 和 C 基因组染色体. 其中 24 条 C 组染色体具有较强的红色信号(箭头所示), 其余 24 条染色体属于 B 组染色体(图 2(h), (i)). 斑点野生稻 C 组染色体杂交信号的分布存在较大差异, 有大半染色体杂交信号仅存在端粒或着丝粒区, 其它染色体信号分布相对均匀(图 2(i)). 在 B 组染色体上, 只有少数几条染色体分布少许杂交信号(图 2(h)), 说明斑点野生稻 B 和 C 基因组之间的中度和高度重复序列的同源性不高.

3 讨论

在植物基因组中, 重复序列多在 50%以上, 占据基因组的大部分^[38], *Cot-1* DNA 主要为中度和高度重复序列^[33]. 在过去, 对植物基因组研究主要集中在特异重复序列、转座子以及简单重复序列^[26-28,39-42]. 本研究利用荧光原位杂交方法, 用药用野生稻 *Cot-1* DNA 作为探针, 对其自身有丝分裂中期染色体进行定位分析. 从 *Cot-1* DNA 在药用野生稻的 FISH 结果来看, 重复序列在染色体分布具有一定的带型(图 1(b),

(c)), 我们对同源染色体的识别是依据相似带型进行的(图 2(j)). 与常规的染色体核型分析方法不同, 这是根据自身基因组 *Cot-1* DNA 的组成为依据, 对染色体进行的同源性聚类, 突破了传统的分析方法. 在传统的染色体核型分析方法中, 由于稻属染色体小, 形态相似, 着丝粒不明显, 易发生折叠和扭曲, 给分析带来困难和偏差. 在此之前, 为了克服这些困难, 我们曾以水稻这一模式植物的基因组遗传成分为依据, 利用 BAC-FISH 对药用野生稻第 4 号染色体进行了比较染色体核型分析^[43], 该分析是根据水稻和药用野生稻相对应的染色体同源性而不是常规的根据染色体长短进行的, 是在比较分子遗传图基础上进行的. 本研究中的 *Cot-1* DNA 同源性带型聚类, 是结合基因组的组成进行的染色体核型分析, 能够更加快速、准确地进行同源染色体配对. 该方法与前述的 BAC-FISH 比较染色体核型研究有机的结合, 不仅将进一步提高稻属染色体识别的准确性, 而且对研究稻属中不同种间同源性较高的染色体进化及重复序列在基因组进化中的地位具有重要的意义.

颜辉煌等人^[44]利用药用野生稻总 DNA 作探针, 未标记的栽培稻总 DNA 作封阻, 对栽培稻×药用野生稻杂种 F₁ 以及回交后代材料根尖体细胞染色体制片进行基因组原位杂交. 他们对不同的封阻比例的杂交结果进行了比较, 发现 1:16 的效果最佳, 杂种染色体间的反差最为明显. 不封阻或仅用 4 倍栽培稻总 DNA 作封阻时, 栽培稻染色体 DNA 也会被杂交上而使所有染色体均显棕色(非荧光检测)或黄绿色(荧光

检测)。然而,本实验利用药用野生稻 C_{ot-1} DNA作为探针,在不封阻的情况下,对栽培稻×药用野生稻杂种 F_1 以及两个回交后代 BC_1 植株染色体进行原位杂交,发现这3个杂交种C组染色体都能清晰地鉴别出来(图1(d)~(l))。从FISH结果来看,在C组染色体端粒、着丝粒和近着丝粒的一些区域被涂喷成红色,而在A组染色体上的杂交信号分布很少。已有的研究表明,植物基因组中的基因和单或低拷贝序列普遍存在着保守性,呈现出同线性和共线性关系^[45,46],所以在用基因组总DNA作为探针,在没有封阻情况下,异源染色体均有信号分布,杂交信号亦包括了单或低拷贝序列,这些序列可能是基因或非编码序列。颜辉煌等人^[44]和我们利用A基因组总DNA的GISH(结果未显示)研究亦发现,封阻DNA的应用可以增加杂种或异源多倍体染色体的反差,可能是封阻DNA封阻了单低拷贝序列结果。本研究中,采用C基因组的 C_{ot-1} DNA作为探针,在未封阻情况下,对杂种 F_1 (AC)、2个 BC_1 植株(AAC和ACC)以及3个异源四倍体(CCDD与BBCC)进行的杂交,通过严紧洗脱的方法,杂交信号高度集中于C基因组染色体的着丝粒、近着丝粒和端粒区(图1(d)~(l)和图2(a)~(i))。上述结果一方面说明常规GISH方法信号很大部分来源于重复序列,另一方面也证明中、高度重复序列用于异源杂种的鉴定具有更高的种或基因组的特异性。在我们近期比较染色体核型研究中(结果未显示),用来源于A基因组的 C_{ot-1} DNA对药用野生稻、非洲栽培稻及亚洲栽培稻第8染色体FISH分析发现,亚洲栽培稻和非洲栽培稻长臂端部均有信号,而且非洲栽培稻在该位点明显加倍,但在药用野生稻第8染色体长臂端部没有观察到信号。而自身基因组 C_{ot-1} DNA原位杂交发现药用野生稻第8染色体长臂端部有明显的信号存在。这说明重复序列在不同物种中既有同源部分,也有在进化过程中伴随物种形成而形成的种的特异性部分。因此,对于一个特定的种来说,其 C_{ot-1} DNA在基因组中具有不同分布特点,这也进一步说明采用 C_{ot-1} DNA进行核型分析的可行性与更高的准确性。由于 C_{ot-1} DNA包括总基因组的中高度重复序列的集合体,采用其作为探针,可以观察整个基因组中重复序列分布的情况,进一步分析它们的在不同物种基因组的分布特点,则可能为探索在物种形成过程中重复序列所扮演的角色提供一个有益的思路。本研究还表明,杂交及杂交后洗脱的严紧度是

基因组原位杂交一个非常重要的因素,本研究杂交严紧度为65%~75%,杂交后洗脱严紧度控制在80%~90%,在这样严紧度条件下,可以避免产生非特异杂交,使杂交信号具有较高的特异性^[14,15]。

Fukui等人^[12]利用药用野生稻的总DNA作为探针,对小粒野生稻(BBCC)和宽叶野生稻(CCDD)进行原位杂交。在小粒野生稻48条染色体中,发现24条染色体带有较强的荧光信号,被鉴定为C基因组,其余24条染色体信号较弱属于B基因组。结合宽叶野生稻染色体GISH结果作分析,得出C基因组与B基因组的遗传距离比C基因组与D基因组的遗传距离要远的结论。我们的研究也表明,来源于C基因组的 C_{ot-1} DNA在严紧洗脱条件下,在宽叶野生稻和高秆野生稻D组染色体上的信号比斑点野生稻B组染色体上要多。Li等人^[14]用二倍体斑点野生稻(BB)和药用野生稻(CC)总DNA作为探针,结合McGISH技术,对四倍体斑点野生稻(BBCC)进行原位杂交,实验结果验证了斑点野生稻BB和CC的基因组构成,并发现了一些C组染色体上的检测信号也存在于B组染色体上。本研究利用药用野生稻 C_{ot-1} DNA作为探针,对斑点野生稻(BBCC)染色体进行原位杂交,可明显观察到24条染色体具有较强杂交信号(图2(i),箭头所示),这24条染色体应该属于C基因组,其余24条染色体属于B基因组,与Li等人^[14]结果相互印证。此外, C_{ot-1} DNA信号在几个野生种C组染色体上的特定区域,如端粒或着丝粒均存在,这表明染色体端粒和着丝粒富含中高度重复序列。在B和D基因组亦有相似的分布,说明中度和高度重复序列在稻属中可能存在一定的保守性,这与重复序列维持染色体结构、形态和功能相关,对研究不同物种中不同染色体保持相同形态具有重要意义。

药用野生稻的C基因组是药用野生稻复合体的最基本的基因组成分。Li等人^[15]用药用野生稻总DNA作为探针,对高秆野生稻(CCDD)染色体进行原位杂交,发现在所有染色体上都检测到不同强度的杂交信号,而且一些染色体的信号强度只有微小的差异,所以很难区分其染色体是属于C或D基因组,说明C与D基因组相近。而本实验利用药用野生稻 C_{ot-1} DNA作为探针,对宽叶野生稻(CCDD)和高秆野生稻(CCDD)中期染色体进行原位杂交,都可以很容易地区分出具有较强杂交信号的24条染色体(图2(c), (f)),这24条染色体应属于C基因组,其余24条

染色体属于D基因组,进一步说明 C_{ot-1} DNA具有依赖基因组型的特异性.已有的研究表明,植物基因组的差别主要源于它们的重复DNA序列的不同^[47].我们的FISH结果也表明,C基因组与D基因组中度和高度重复序列的差异较大.从宽叶野生稻和高秆野生稻C组染色体上的信号分布特点来看,信号分布比较均一,覆盖了染色体的大半区域.而且药用野生稻重复序列与这两个种的C基因组的同源性比斑点野生稻C基因组的同源性要高.另外,在高秆野生稻D组染色体上的杂交信号要比宽叶野生稻D组染色体多,说明高秆野生稻C基因组与D基因组的亲缘关系比宽叶野生稻C基因组与D基因组的亲缘关系近.同时,B基因组与C基因组的亲缘关系相对D基因组与C基因组的亲缘关系更远,与Fukui等人^[12]的研究结果相一致.综合药用野生稻自身 C_{ot-1} DNA杂交作进一步分析,发现药用野生稻自身 C_{ot-1} DNA带型与这3个四倍体野生种C组染色体上的信号带型存在较大差异.这些差异的产生,也许是因为地域分布或其他因素的影响,在长期进化过程中由于存在基因互作、插入、缺失、重复等遗传事件,从而形成了自己种的特异性的基因组成分,这些成分也应该包含具有种特异性的低中高度重复序列,这些特异性基因组成分的产生可能源于原始祖先基因组,在进化过程中伴随着DNA加倍、重排以及基因积累突变成新基因或者假基因,甚至还伴随着DNA序列丢失等事件而最终形成的.因为已有的研究表明,植物基因组中普遍存在加倍、重排和基因选择性丢失等现象^[48-51].

药用野生稻复合体包含近10个种,基因组类型众多(BB, CC, EE, BBCC和CCDD),是稻属中最大最复杂的群体^[7].对该群体中异源多倍体的起源研究,由于在进化史上频繁发生的杂交和多倍化,使得该研究困难重重.根据Ge等人^[3]通过多基因序列分析,推测BBCC染色体组由BB基因组物种作为母本杂交形成.宽叶野生稻、高秆野生稻应起源于单次杂交,它们均起源于二倍体,经过2个不同基因组型二倍体杂交形成异源杂种,再经多倍化形成异源四倍体^[52,53].Lim等人^[54]也曾利用秋水仙素诱导二倍体形成多倍体进行过研究.而在本研究中,宽叶野生稻、高秆野生稻和斑点野生稻均属于异源四倍体,本实验室的 F_1 植株(AC)和两个 BC_1 植株(AAC和ACC)虽然是人工选育,但可能再次模拟了早期野生稻中

异源多倍体的形成最初过程.因此本研究选用药用野生稻(CC)、 F_1 植株(AC)、 BC_1 植株(AAC和ACC)以及异源四倍体宽叶野生稻(CCDD)、高秆野生稻(CCDD)和斑点野生稻(BBCC)作为研究材料,来初步探讨稻属中异源多倍化形成的可能机制.由于 C_{ot-1} DNA具有很强种的特异性,在亲缘关系研究中应更能反映出不同染色体组间的关系远近,因为根据本研究,C基因组 C_{ot-1} DNA在D比B基因组的染色体要多,说明基因组C与D关系更为接近.此外,远缘杂种 F_1 植株(AC)、 BC_1 植株(AAC和ACC)是人工培育的,直接来源于栽培稻和药用野生稻,而野生稻的BBCC与CCDD则是长期进化过程中形成的稳定的异源四倍体,其中的C基因组与自然界中现存的药用野生稻的C基因组成分肯定不尽相同.从本研究的结果来看,药用野生稻C基因组 C_{ot-1} DNA在3个异源四倍体种的B, C和D组染色体上均有分布也说明了这一点,这也是为什么药用野生稻 C_{ot-1} DNA集中分布在 F_1 中的C组染色体上而A组染色体上几乎没有的原因之一.至于宽叶野生稻和高秆野生稻均为CCDD染色体组,为什么也存在种的差异,是否由于基因互作、变异积累所产生,还有待于进一步研究.自然界中存在二倍体BB染色体组斑点野生稻,推测四倍体BBCC染色体组野生稻起源于二倍体BB和CC染色体组的杂交和多倍化.但自然界中无DD二倍体染色体组野生稻的存在,CCDD染色体组的D基因组应当来源于与之亲缘关系很近的二倍体染色体组,我们从 C_{ot-1} DNA的FISH发现基因组C和D同源性不高,基因组B和C同源性则更低,而Li等人^[15]研究又表明基因组C与D关系近于基因组E与C和D,但基因组E与C关系近于基因组E与D,所以关于基因组D的最终起源还有待商榷,可利用基因组A, B, E, F, G等物种 C_{ot-1} DNA作进一步深入研究.

致谢 感谢华南农业大学卢永根院士、傅雪琳副教授和武汉大学遗传研究所提供的宝贵材料.在实验过程中,还得到了武汉大学宋运淳教授和美国 Wisconsin 大学金危危博士的指导和帮助,在此表示衷心感谢.本工作为国家高技术研究发展计划(批准号:2004AA227120)、教育部留学回国人员启动基金(批准号: BZY04003)、中国博士后科学基金(批准号:20040350574)以及武汉市青年科技晨光计划(批准号:2004500607135)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Lu B R. Taxonomy of the genus *Oryza* (Poaceae): A historical perspective and current status. Intern Rice Resour Notes, 1999, 24: 4—8
- 2 Aggarwal R K, Brar D S, Khush G S. Two new genomes in the *Oryza* complex identified on the basis of molecular divergence analysis using total genomic DNA hybridization. Mol Gen Genet, 1997, 254: 1—12[DOI]
- 3 Ge S, Sang T, Lu B R, et al. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 14400—14405[DOI]
- 4 卢宝荣, 葛颂, 桑涛, 等. 稻属分类的现状及其存在问题. 植物分类学报, 2001, 39: 373—388
- 5 Vaughan D A. The genus *Oryza* L. Current status of taxonomy. IRRI Res Paper Series, 1989, 138: 1—21
- 6 Vaughan D A, Morishima H, Kadowaki K. Diversity in the *Oryza* genus. Curr Opin Plant Biol, 2003, 6: 139—146[DOI]
- 7 Bao Y, Lu B R, Ge S. Identification of genomic constitutions of *Oryza* species with the B and C genomes by the PCR-RFLP method. Genet Resour Crop Ev, 2005, 52: 69—76[DOI]
- 8 Jena K K, Khush G S. Introgression of genes from *Oryza officinalis* Willd ex Watt to cultivated rice, *O. sativa* L. Theor Appl Genet, 1990, 80: 737—745
- 9 Kobayashi N, Ikeda R, Vaughan D A, et al. Resistance to Tungro in some wild relatives of rice. Rice Res Neusel, 1991, 16: 13
- 10 Multani D S, Khush G S, Reyes delos B G, et al. Alien genes introgression and development of monosomic alien addition lines from *Oryza latifolia* Desv. to rice, *Oryza sativa* L. Theor Appl Genet, 2003, 107: 395—405[DOI]
- 11 Liu L, Lafitte R, Guan D. Wild *Oryza* species as potential sources of drought-adaptive traits. Euphytica, 2004, 138: 149—161[DOI]
- 12 Fukui K, Shishido R, Kinoshita T. Identification of the rice D-genome chromosomes by genomic *in situ* hybridisation. Theor Appl Genet, 1997, 95: 1239—1245[DOI]
- 13 Shishido R, Apisitwanich S, Ohmido N, et al. Detection of specific chromosome reduction in rice somatic hybrids with the A, B, and C genomes by multi-color genomic *in situ* hybridization. Theor Appl Genet, 1998, 97: 1013—1018[DOI]
- 14 Li C B, Zhang D M, Ge S, et al. Identification of genome constitution of *Oryza malampuzhaensis*, *O. minuta*, and *O. punctatata* by multicolor genomic *in situ* hybridization. Theor Appl Genet, 2001, 103: 204—211[DOI]
- 15 Li C B, Zhang D M, Ge S, et al. Differentiation and inter-genomic relationships among C, E and D genomes in the *Oryza officinalis* complex (Poaceae) as revealed by multicolor genomic *in situ* hybridization. Theor Appl Genet, 2001, 103: 197—203[DOI]
- 16 Rokka V M, Clark M S, Knudson D L, et al. Cytological and molecular characterization of repetitive DNA sequences of *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum*. Genome, 1998, 41: 487—494[DOI]
- 17 Ohmido N, Kijima K, Akiyama Y, et al. Quantification of total genomic DNA and selected repetitive sequences reveals concurrent changes in different DNA families in *indica* and *japonica* rice. Mol Gen Genet, 2000, 263: 388—394[DOI]
- 18 Flavell R B, Bennett M D, Smith J B, et al. Genome size and proportion of repeated sequence DNA in plant. Biochem Genet, 1974, 12: 257—269
- 19 Bennetzen J L, Jianxin M A, Devos K M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. Ann Bot-London, 2005, 95: 127—132[DOI]
- 20 McCouch S R, Tanksley S D. The world rice economy: Challenges ahead. In: Khush G S, Toenniessen G H, eds. Rice Biotechnology: Biotechnology in Agriculture Series, No. 6. Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureaux International Press, 1991
- 21 Galasso I, Schmidt T, Pignone D, et al. The molecular cytogenetics of *Vigna unguiculata* (L) Walp: The physical organization and characterization of 18s-58s-25s rRNA genes, 5s rRNA genes, telomere-like sequences, and a family of centromeric repetitive DNA sequences. Theor Appl Genet, 1995, 91: 928—935
- 22 Wang Z X, Kurata N, Saji S, et al. A chromosome 5-specific repetitive DNA sequence in rice (*Oryza sativa* L). Theor Appl Genet, 1995, 90: 907—913
- 23 Matyasek R, Gazdova B, Fajkus J, et al. NTRS, a new family of highly repetitive DNAs specific for the T1 chromosome of tobacco. Chromosoma, 1997, 106: 369—379[DOI]
- 24 Hall A E, Keith K C, Hall S E, et al. The rapidly evolving field of plant centromeres. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7: 108—114[DOI]
- 25 Linares C, Ferrer E, Fominaya A. Discrimination of the closely related A and D genomes of the hexaploid oat *Avena sativa* L. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 12450—12455[DOI]
- 26 Cheng Z K, Stupar R M, Gu M H, et al. A tandemly repeated DNA sequence is associated with both knob-like heterochromatin and a highly decondensed structure in the meiotic pachytene chromosomes of rice. Chromosoma, 2001, 110: 24—31
- 27 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]
- 28 Cheng Z K, Dong F G, Langdon T, et al. Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon. Plant Cell, 2002, 14: 1691—1704[DOI]
- 29 Yan H H, Liu G Q, Chen G Z K, et al. A genome-specific repetitive DNA sequence from *Oryza eichingeri*: Characterization, localization, and introgression to *O. sativa*. Theor Appl Genet, 2002, 104: 177—183[DOI]
- 30 Mishima M, Ohmido N, Fukui K, et al. Trends in site-number change of rDNA loci during polyploid evolution in *Sanguisorba* (Rosaceae). Chromosoma, 2002, 110: 550—558
- 31 Jin W W, Melo J R, Nagaki K, et al. Maize centromeres: Organization and functional adaptation in the genetic background of oat. Plant Cell, 2004, 16: 571—581[DOI]
- 32 Jin W W, Lamb J C, Vega J M, et al. Molecular and functional

- dissection of the maize B chromosome centromere. *Plant Cell*, 2005, 17: 1412—1423[DOI]
- 33 Zwick M S, Hanson R E, Mcknight T D, et al. A rapid procedure for the isolation of *Cot-1* DNA from plants. *Genome*, 1997, 40: 138—142[DOI]
- 34 Ren N, Song Y C, Bi X Z, et al. The physical location of genes *cdc2* and *prh1* in Maize (*Zea mays* L.). *Hereditas*, 1997, 126: 211—217[DOI]
- 35 Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, 12: 13—15
- 36 Jiang J M, Gill B S, Wang G L, et al. Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 4487—4491[DOI]
- 37 Uozu S, Ikehashin H, Ohmido N, et al. Repetitive sequences: Cause for variation in genome size and chromosome morphology in the genus *Oryza*. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 791—799[DOI]
- 38 Bennett M D, Leitch I J. Plant genome size research: A field in focus. *Ann Bot-London*, 2005, 95: 1—6[DOI]
- 39 Cheng Z K, Yan H H, Yu H X, et al. Development and applications of a complete set of rice telotrisomics. *Genetics*, 2001, 157: 161—168
- 40 Feng Q, Zhang Y, Hao P, et al. Sequence and analysis of rice chromosome 4. *Nature*, 2002, 420: 316—320[DOI]
- 41 Ren F G, Lu B R, Li S Q, et al. A comparative study of genetic relationships among the AA-genome *Oryza* species using RAPD and SSR markers. *Theor Appl Genet*, 2003, 108: 113—120[DOI]
- 42 Zhang Y, Huang Y C, Zhang L, et al. Structural features of the rice chromosome 4 centromere. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 2023—2030[DOI]
- 43 覃瑞, 魏文辉, 金危危, 等. 与 *Gm-6, Pi-5(t)* 连锁的栽培稻 BAC 克隆在药用野生稻中的 FISH 定位. *科学通报*, 2000, 45(22): 2427—2430
- 44 颜辉煌, 程祝宽, 刘国庆, 等. 栽培稻-药用野生稻杂种 F_1 及回交后代的基因组原位杂交鉴定. *遗传学报*, 1999, 26: 157—162
- 45 Feuillet C, Keller B. High gene density is conserved at syntenic loci of small and large grass genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 8265—8270[DOI]
- 46 Choi H K, Mun J H, Kim D J, et al. Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 15289—15294[DOI]
- 47 Schwarzacher T, Leitch A R, Bennett M D, et al. *In situ* hybridization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann Bot*, 1989, 64: 315—324
- 48 Ku H M, Vision T, Liu J P, et al. Comparing sequenced segments of the tomato and Arabidopsis genomes: Large-scale duplication followed by selective gene loss creates a network of synteny. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 9121—9126[DOI]
- 49 Multani D S, Khush G S, Reyes B G, et al. Alien genes introgression and development of monosomic alien addition lines from *Oryza latifolia* Desv to rice, *Oryza sativa* L. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 395—405[DOI]
- 50 Yin P, Hartemink A J. Theoretical and practical advances in genome halving. *Bioinformatics*, 2005, 21: 869—879[DOI]
- 51 Yogeewaran K, Frary A, York T L, et al. Comparative genome analyses of *Arabidopsis* spp.: Inferring chromosomal rearrangement events in the evolutionary history of *A. thaliana*. *Genome Res*, 2005, 15: 505—515[DOI]
- 52 Jena K K, Kochert G. Restriction fragment length polymorphism analysis of CCDD genome species of the genus *Oryza* L. *Plant Mol Biol*, 1991, 16: 831—839[DOI]
- 53 Wang Z Y, Second G, Tanksley S D. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. *Theor Appl Genet*, 1992, 83: 565—581
- 54 Lim K Y, Leitch I J, Leitch A R. Genomic characterization and the detection of raspberry chromatin in polyploid *Rubus*. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 1027—1033[DOI]

(2006-01-21 收稿, 2006-04-29 接受)