

## 玉米和类玉米种间杂交后代细胞学鉴定

李从强<sup>1</sup>, 林刚<sup>1</sup>, 李克秀<sup>1</sup>, 宋运淳<sup>2</sup>, 熊志勇<sup>1</sup>, 何光源<sup>1\*</sup>

(1. 华中科技大学中英 HUST-RRes 基因工程和基因组学联合实验室, 武汉 430074;

2. 武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072)

**摘要:** 利用组成玉米异染色质钮的 180-bp 重复序列和 TR-1 元件以及 45S rDNA 对玉米自交系 F107、GB57、二倍体多年生类玉米及其远缘杂交后代的染色体进行荧光原位杂交, 确定了 3 种重复序列在亲本染色体上的分布; 同时对远缘杂交后代进行了细胞学鉴定, 通过荧光信号在染色体上的位置, 证实远缘杂交后代中异源种质的染色体来源; 讨论了异染色质钮重复序列对玉米和其野生种杂交后代外源染色体整合和染色体行为等方面研究的应用。

**关键词:** 玉米; 二倍体多年生类玉米; 异染色质钮; 荧光原位杂交; 重复序列

中图分类号: Q343.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2006)01-0001-05

## Cytological Identification on the Interspecific Hybrid of *Zea mays* and *Zea diploperennis*

LI Cong-Qiang<sup>1</sup>, LIN Gang<sup>1</sup>, LI Ke-Xiu<sup>1</sup>, SONG Yun-Chun<sup>2</sup>, XIONG Zhi-Yong<sup>1</sup>, HE Guang-Yuan<sup>1\*</sup>

(1. China-UK HUST-RRes Genetic Engineering and Genomics Joint Laboratory, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China; 2. Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was carried out on mitotic chromosomes of *Zea diploperennis* (DP), maize inbred lines F107, GB57 and their hybrids using knob-associated tandem repeats, 180-bp repeats and TR-1 elements, together with 45S rDNA as probes. The distribution patterns of the three repeated sequences were analyzed on parental chromosomes. The hybrids of maize and DP were identified by FISH. According to the hybridization signals on chromosome positions, the origin of foreign idioplasm was confirmed. The application using knob-associated tandem repeats as excellent chromosomal markers on detecting the integration of foreign chromosome and the chromosomal activity at meiosis was also discussed.

**Key words:** *Zea mays*; *Zea diploperennis*; Repetitive DNA sequence; Fluorescence *in situ* hybridization; Heterochromatic knob

玉米是我国的第二大粮饲兼用经济作物, 加强种质资源研究是玉米高产稳产的基础。然而玉米种质遗传基础狭窄, 大大影响了育种研究工作的进一步进行。为改善玉米品质, 增强其抗逆性, 迫切需要拓宽和创制新的基因源<sup>[1,2]</sup>。在玉米野生近缘植物中, 二倍体多年生类玉米 (*Zea diploperennis*, DP) 是一种重要的玉米近缘种植物, 在栽培玉米的起源和演化过程中起着重要作用<sup>[3]</sup>。由于 DP 具有许多优良的农艺性状, 如抗逆性和抗病虫害等, 把 DP 的种质引入到栽培玉米一直是遗传育种学家感兴趣的问题<sup>[4]</sup>。我国遗传育种学家郭乐群<sup>[5]</sup>、赵晓俊<sup>[6]</sup>、黄国中等已将 DP 种质通过杂交导入到不同遗传背景、不同生态型和不同基因型的玉米种质中, 并得到

了具优良农艺性状的新品种。

DP 染色体数目和染色体基数与玉米相同 ( $2n = 20, x = 5$ ), 染色体形态及大小与玉米相似<sup>[7]</sup>。同时, 基因组荧光原位杂交 (GISH) 证实玉米和 DP 有较高的 DNA 同源性<sup>[8]</sup>。因此, 用常规形态分析和 GISH 的方法准确辨认玉米和 DP 杂交后代染色体来源比较困难。异染色质钮是识别玉米染色体及其近缘种属的细胞学标记<sup>[4,7]</sup>, 大的异染色质钮通过常规的显带技术都可以显示出来。然而, 对于一些较小的异染色质钮用常规的显带技术往往不易识别<sup>[9,10]</sup>。最近研究表明, 玉米异染色质钮是由 180-bp 的序列和 TR-1 元件串联重复组成<sup>[11-13]</sup>。双色荧光原位杂交 (FISH) 结果证明, 玉米不同染色体

收稿日期: 2005-05-13, 修回日期: 2005-08-09。

基金项目: 国家 973 计划项目 (2002CB111302) 资助; 国家自然科学基金资助项目 (30370807); 湖北省自然科学基金重点项目资助 (2002AB088)。

作者简介: 李从强 (1981-), 男, 硕士, 研究方向为植物分子生物学。何光源 (1958-), 男, 教授。

\* 通讯作者 (E-mail: hegy@hust.edu.cn)。

的异染色质钮含有不同比例的这两种重复序列。并且不同来源的玉米和 DP 的异染色质钮的数量、染色体位置和组成存在较大差异<sup>[11,12]</sup>。因此,180-bp 的重复序列和 TR-1 元件是识别玉米及其近缘种属染色体的可靠的细胞学分子标记<sup>[12,13]</sup>,在玉米及其近缘种属的起源与进化<sup>[14]</sup>、染色体行为<sup>[15]</sup>等理论研究和在玉米与近缘种属杂交后代细胞学鉴定应用研究中有较大的意义。

本研究以组成玉米异染色质钮的180-bp重复序列和 TR-1 元件以及 45S rDNA 对玉米自交系 F107、GB57 与 DP 及其远缘杂交后代的有丝分裂中期染色体进行荧光原位杂交,以了解亲本的异染色质钮分布特点和进行杂交后代细胞学鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料和染色体制片

二倍体多年生类玉米(*Zea diploperennis*),玉米(*Zea mays*)自交系 F107、GB57 和它们的杂交后代由中国科学院遗传研究所郭乐群和谷明光研究员提供。染色体制片参照 Song 和 Gustafson 的方法<sup>[16]</sup>。取生长旺盛的根尖,在水饱和的 $\alpha$ -溴萘溶液中于25℃处理2.5 h,用新鲜固定液[甲醇:冰乙酸(V/V) = 3:1]固定,4℃过夜,ddH<sub>2</sub>O 充分洗净,1%的纤维素酶和1%的果胶酶(SERVA)在28℃条件下酶解约3 h,水洗并固定后采用火焰干燥法制片。

### 1.2 探针标记

180-bp 重复序列 ZmKR180-2 和 TR-1 元件 ZmKR350-1 由台湾大学植物系 C. C. Chen 博士提供<sup>[13]</sup>。45S rDNA 重复序列由美国 Nebraska 大学 K. Arumuganthan 教授提供<sup>[17]</sup>。用碱裂解法提取质粒 DNA<sup>[18]</sup>,180-bp 重复序列和 45S rDNA 用生物素标记,TR-1 重复元件用地高辛标记。

### 1.3 原位杂交及荧光信号检出

原位杂交及信号检出参照 Xiong 等<sup>[19]</sup>的程序。染色体制片用5  $\mu$ g/mL DAPI 复染,在 Olympus BX60 荧光显微镜下观察。用 Photometrics SenSys CCD 1400E 照相装置俘获图像,用 V++ Precision Digital Imaging System 和 Adobe Photoshop V 5.1 软件进行测量和图像处理。染色体的识别根据玉米标准核型<sup>[13]</sup>,45S rDNA 及 180 bp、350 bp 重复序列杂交信号的位置来确定。

## 2 结果

### 2.1 重复序列在亲本染色体上的分布特征

用 TR-1 和 45S rDNA 重复序列对玉米自交系

F107 的染色体进行了双色荧光原位杂交,结果表明,在自交系 F107 的一对染色体上同时检测到 TR-1 和 45S rDNA 重复序列的杂交信号(图 1:A)。根据 45S rDNA 在玉米染色体上的位置判断该染色体为玉米第 6 号染色体,绿色的 TR-1 信号位于第 6 号染色体长臂的近末端和短臂末端的随体上。另外,用 180-bp 重复序列和 TR-1 元件对玉米自交系 F107 进行了双色荧光原位杂交(图 1:B),在两对染色体上检测到 180-bp 重复序列的红色信号。其中的一对信号位于第 6 号染色体长臂的近末端,该信号与 TR-1 元件绿色信号共同组成第 6 号染色体长臂异染色质钮。在有丝分裂前中期,可以清楚看到两信号间没有发生重叠,TR-1 元件位于该染色质钮的近着丝粒端。另一对 180-bp 重复序列的信号位于第 7 号染色体短臂的末端。

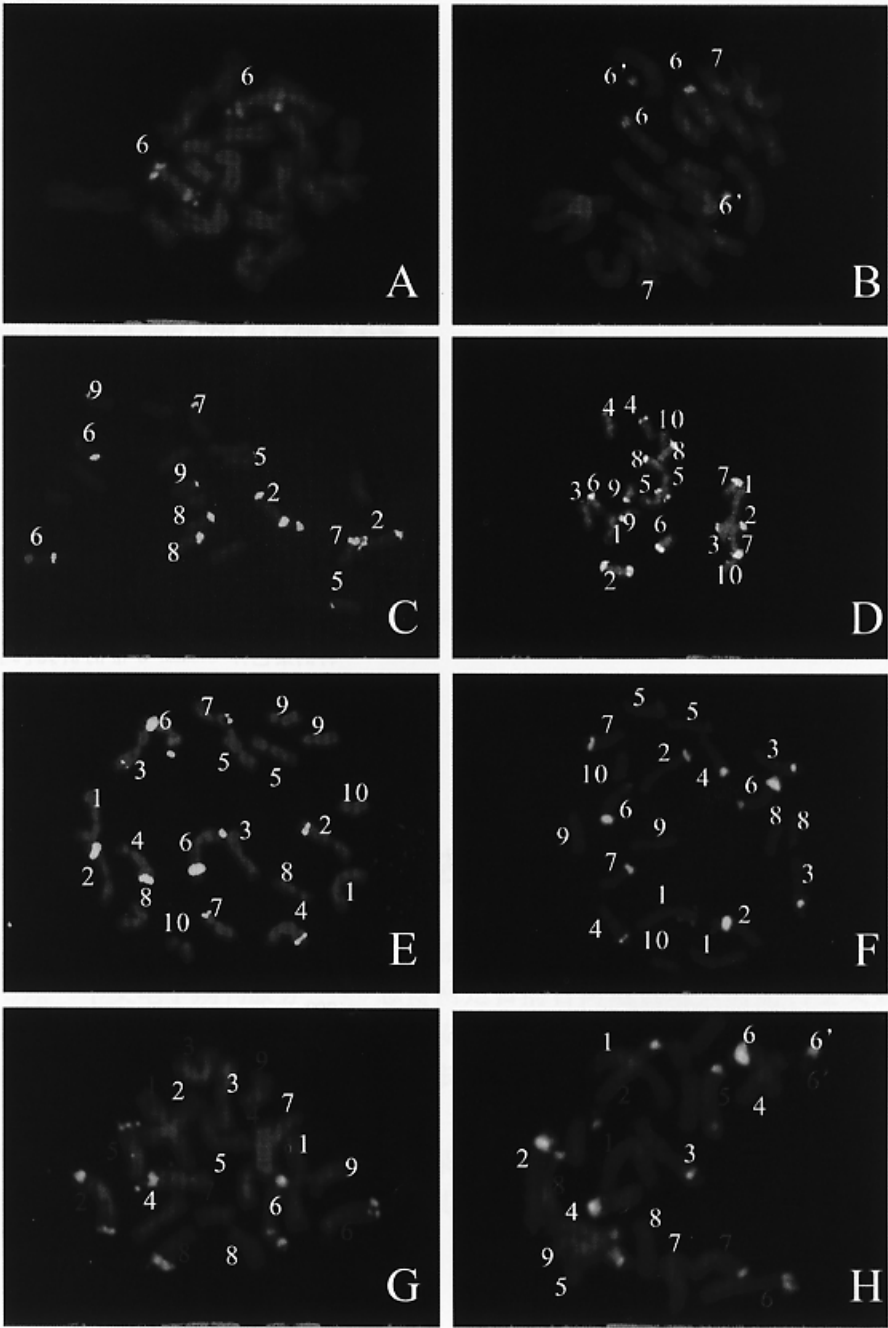
用 180-bp 重复序列和 TR-1 元件以及 45S rDNA 对 DP 有丝分裂中期染色体进行荧光原位杂交(图 1:C,D)发现,在 DP 的 6 对染色体上检测到 TR-1 元件的 7 对杂交信号位点,且不同位点杂交信号的强度有差异。核型分析表明,这些信号分别位于第 2、6、7、8 和 9 染色体的长臂末端以及第 2 和 5 染色体的短臂末端。180-bp 重复序列在 DP 定位于第 2、6、7、8 和 9 染色体的长臂末端以及第 1、4 和 5 染色体的短臂末端。在第 4、5 染色体的长臂和第 2 染色体短臂的末端,只在同源染色体对中的一条染色体上存在 180-bp 重复序列的红色杂交信号。

用 180-bp 重复序列和 45S rDNA 以及 TR1 元件对玉米自交系 GB57 有丝分裂中期染色体进行双色荧光原位杂交(图 1:E,F)发现,在 GB57 四对染色体上同时存在 180-bp 重复序列和 TR1 元件的杂交信号。核型分析表明在第 1、2、3、4、5、6、8 染色体长臂亚末端存在 180-bp 重复序列的红色杂交信号。在第 2、3、4、6 染色体长臂亚末端,第 7 染色体短臂和第 6 染色体短臂末端随体上检测到 TR1 元件的绿色信号。不同位点杂交信号的强度存在差别。

### 2.2 重复序列在杂交后代染色体上的分布特征

郭乐群等<sup>[5]</sup>将玉米与 DP 进行杂交,把 DP 的种质引入到玉米的基因组中。为了证实远缘杂交后代的真实性,我们用 180-bp 重复序列和 TR-1 元件以及 45S rDNA 对其进行了细胞学鉴定。

对玉米自交系 F107 和 DP 杂交后代 FISH 分析表明,含有 45S rDNA 信号的一对染色体分别具有亲本玉米 F107 和 DP 第 6 号染色体的 TR-1 元件信号特征(图 1:G),即 TR-1 信号位于玉米 F107 第 6



图中数字6'标识第6号染色体的随体,杂交后代图片(G,H)中白色数字标识玉米染色体,红色数字标识DP染色体。A:用TR-1元件(绿色信号)和45S rDNA(红色信号)做探针针对玉米自交系F107染色体的杂交;B:用TR-1元件(绿色信号)和180-bp重复序列(红色信号)做探针针对玉米自交系F107染色体的杂交;C:用TR-1元件(绿色信号)和45S rDNA(红色信号)做探针针对DP染色体的杂交;D:用TR-1元件(绿色信号)和180-bp重复序列(红色信号)做探针针对DP染色体的杂交;E:用TR-1元件(绿色信号)和45S rDNA(红色信号)做探针针对玉米自交系GB57染色体的杂交;F:用TR-1元件(绿色信号)和180-bp重复序列(红色信号)做探针针对玉米自交系GB57染色体的杂交;G:用TR-1元件(绿色信号)和45S rDNA(红色信号)做探针针对F107和DP的杂交后代染色体的荧光原位杂交;H:用TR-1元件(绿色信号)和180-bp重复序列(红色信号)做探针针对GB57和DP的杂交后代染色体的荧光原位杂交

A:Chromosomes of maize F107 detected with TR-1 elements (green) and 45S rDNA sequence (red); B:Chromosomes of maize F107 detected with 180-bp repeats (red) and TR-1 elements (green); C:DP chromosomes detected with TR-1 elements (green) and 45S rDNA sequence (red); D:DP chromosomes detected with 180-bp repeats (red) and TR-1 elements (green); E:Chromosomes of maize GB57 detected with TR-1 elements (green) and 45S rDNA sequence (red); F:Chromosomes of maize GB57 detected with 180-bp repeats (red) and TR-1 elements (green); G:Chromosomes of the hybrid of maize F107 and DP detected with TR-1 elements (green) and 45S rDNA sequence (red); H:Chromosomes of the hybrid of maize GB57 and DP detected with TR-1 elements (green) and 180-bp repeats (red)

图1 探针同DP、F107、GB57以及DP与F107、GB57杂交后代的染色体的荧光原位杂交  
Fig.1 Fluorescence in situ hybridization of probes to mitotic chromosomes of DP  
(*Z. diploperennis*), maize (*Z. mays*) inbred line F107, GB57 and theirs hybrid

号染色体长臂的近末端和随体上,而DP的该条染色体只在长臂的末端检测到TR-1信号。同样,对杂交后代进行180-bp重复序列和TR-1元件双色FISH,结果显示杂交后代带有双亲的异染色质钮的分布特征。我们的FISH分析结果证明,杂交后代获得了来自亲本玉米F107和DP各自一半的染色体。

同时,我们对玉米自交系GB57和DP杂交后代进行了FISH分析(图1:H)。根据染色质钮在染色体端部或亚端部位置、重复序列在染色体上的组成和杂交信号分布特点,可以对分别来自玉米自交系GB57的8条和DP的8条染色体准确无误地辨认出来。结合染色体的长度和臂比分析,除了杂交后代的第10号染色体不能分辨其亲本来源外,其它染色体都能判断出亲本来源,证实了杂交后代的真实性。

### 3 讨论

FISH分析结果表明,玉米所显现的异染色质钮的180-bp重复序列和TR-1元件主要位于染色体的近末端,二倍体多年生类玉米异染色质钮位于染色体的末端。在所有供试材料的染色体着丝粒区都没有观察到180-bp重复序列和TR-1元件杂交信号。这一结果与颜春洪等<sup>[1]</sup>用Giemsa C-带和韩永华等<sup>[6]</sup>用比较基因组原位杂交的方法对异染色质钮的观察结果一致。然而,由于Giemsa C-带和基因组原位杂交荧光带的方法存在技术上的局限性,带型分析只能辨认带的有无,不能区分异染色质钮的DNA序列的组成。如DP的第4和5号染色体的同源染色体的长臂存在异染色质钮的异态性,用C-带和基因组原位杂交荧光带方法进行DP的核型分析就可能产生4、5号染色体间的误配,而用特异的重复序列进行FISH分析避免了这一困难。因此,180-bp重复序列和TR-1元件是识别玉米及其近缘种属染色体的可靠的细胞学分子标记。

玉米野生近缘种是玉米遗传改良的主要种质资源,将野生近缘种的优良种质引入栽培种,培育出高产、优质、抗逆性及抗病虫能力强的稳定纯系是玉米种质改良的重要课题<sup>[20,21]</sup>。为了得到可靠的优良种质和分子遗传资源,有必要对外源种质在杂交后代的渗入进行鉴定,虽然其它分子遗传学手段与方法如利用RFLP、SSR和AFLP标记技术也可以达到同样的目的,利用重复序列对杂交后代进行FISH分析有其独特的优越性,是其它方法的有力补充。首先,FISH技术可直观地观察到是亲本的哪条染色体和染色体片段渗入到杂交后代中;其次,由于亲本

的同源染色体存在重复序列的异态性(重复序列有无以及组成的差异),因此,利用FISH技术甚至能够追溯杂交后代中部分染色体亲本的同源染色体的来源。此外,玉米与其野生近缘种的部分同源染色体(homoeologous)并非完全相同,杂交后代基因分离不单纯是基因重组,还存在染色体异常造成的效应,FISH技术可以观察杂交后代染色体行为。

### 参考文献:

- [1] 颜春洪,宋运淳,谷明光,何德洁.远缘杂种孤雌生殖系Giemsa C-带的遗传稳定性分析[J].遗传学报,1997,24(2):170-177.
- [2] 赵晓俊,李得森,张玉玲.野生玉米种质导入栽培玉米的进展[J].作物杂志,1996(6):1-3.
- [3] Nault L R, Findley W R. Primitive relative offer new traits for maize improvement[J]. *Crops Soils Mag*, 1982, 34(6):10-13.
- [4] 谷明光,丁玉澄,张雪琴.二倍体多年生类玉米及其与玉米杂种的染色体Giemsa C-带的研究[J].遗传学报,1984,11:276-280.
- [5] 郭乐群,谷明光,张雪琴.药物诱导玉米远缘杂种孤雌生殖获得异源种质纯系及其育种研究[J].遗传学报,1997,24(6):537-543.
- [6] 韩永华,郭乐群,李冬郁,谷明光,宋运淳.玉米和类玉米杂交后代异染色质钮的遗传稳定性分析[J].武汉大学学报(自然科学版),2003,49(4):528-532.
- [7] Mastenbroek I, de Wet M J. Chromosome C-banding in *Zea mays* and its closest relatives[J]. *Can J Genet Cytol*, 1983, 25:203-209.
- [8] Takahashi C, Marshall J A, Bennett M D, Leitch I J. Genomic relationships between maize and its wild relatives[J]. *Genome*, 42:1201-1207.
- [9] Ward E J. Banding patterns in maize mitotic chromosomes[J]. *Can J Genet Cytol*, 1980, 22:61-67.
- [10] Jutta F Z, Yi Y, Reinhold G H, Uwe H. Comparative genomic *in situ* hybridization (cGISH) analysis on plant chromosomes revealed by labeled arabidopsis DNA[J]. *Chrom Res*, 2001, 9:357-375.
- [11] Peacock W J, Dennis E S, Rhoades M M, Pryor A J. Highly repeated DNA sequence limited to knob heterochromatin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78:4490-4494.
- [12] Ananiev E V, Phillips R L, Rines H W. A knob associated tandem repeat in maize capable of forming fold-back DNA segments: are chromosome knobs megatransposons? [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:10785-10790.
- [13] Chen C C, Chen C M, Hsu F C, Wang C J, Yang J T, Kao Y Y. The pachytene chromosomes of maize as revealed by fluorescence *in situ* hybridization with repetitive DNA sequences[J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 101:30-36.
- [14] Hsu F C, Wang C J, Chen C M, Hu H Y, Chen C C. Molecular characterization of a family of tandemly repeated DNA sequences, TR-1, in heterochromatic knobs of maize and its relatives[J]. *Ge-*

- netics, 2003, **164**: 1087 - 1097.
- [15] Hiatt E N, Kentner E K, Dawe R K. Independently regulated neo-centromere activity of two classes of tandem repeat arrays [J]. *Plant Cell*, 2002, **14**: 407 - 420.
- [16] Song Y C, Gustafson J P. The physical location of fourteen RFLP markers in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, **90**: 113 - 119.
- [17] Arumuganthan K, Martin G B, Tanksley S D, Bonnema G, Lindhout P. Chromosome 2-specific DNA clone from flow sorted chromosomes of tomato [J]. *Mol Gen Genet*, 1994, **22**: 551 - 558.
- [18] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1998. 25 - 27.
- [19] Xiong Z Y, Tan G X, You A Q, He G Y, She C W, Li L, Song Y C. Comparative physical mapping of rice BAC clones linked to resistance genes *Gdh*, *Bph-3* and *xa-5* in *Oryza sativa* L. and *O. granulata* Nees et Arn. ex Watt [J]. *Chin Sci Bull*, 2004, **49**: 1 - 6.
- [20] 黎裕, 王天宇, 石云素, 宋燕春. 基因组学方法在玉米种质资源研究中的应用 [J]. 植物遗传资源学报, 2003, **4**(3): 256 - 260.

## 《武汉植物学研究》加入台湾华艺 CEPS 中文电子期刊服务声明

《武汉植物学研究》,从 2005 年 3 月起,加入中国台湾“中文电子期刊服务”——思博网(CEPS)。“中文电子期刊服务”——思博网是目前台湾地区最大的期刊全文数据库,其访问地址为: <http://www.ceps.com.tw>。读者可以通过这一网址检索《武汉植物学研究》从 2005 年起各期的全文,以后数据库逐步录入过刊后,还可以回溯检索 2005 年以前历年的期刊全文。

此外,因《武汉植物学研究》被 CEPS 收录,故凡向本刊投稿者,均视为其文稿刊登后可供思博网(CEPS)收录、转载并上网发行;其作者文章著作权使用费与稿酬一次付清,本刊不再另付其它报酬。

请广大读者和作者继续支持本刊,谢谢!

《武汉植物学研究》编辑部

2006 年 2 月