

利用水稻 *Cot-1* DNA 和基因组 DNA 对栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻基因组的比较分析

蓝伟侦¹, 何光存², 吴士筠¹, 覃瑞^{1,2}

¹中南民族大学生命科学院国家民委生物技术重点实验室, 武汉 430074;

²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)

摘要:【目的】研究中高度重复序列在稻属不同物种基因组进化中的作用。【方法】用栽培稻 *Cot-1* DNA 和基因组 DNA (gDNA) 作为探针, 分别对栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻进行荧光原位杂交 (FISH) 和比较基因组杂交 (CGH)。【结果】*Cot-1* DNA 覆盖栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻基因组比例 (%) 和大小 (Mb) 分别为 47.10 ± 0.16 , 38.61 ± 0.13 , 44.38 ± 0.13 和 212.33 ± 1.21 , 269.42 ± 0.89 以及 532.56 ± 1.68 。栽培稻 gDNA 在药用野生稻和疣粒野生稻基因组中的覆盖率约为 91.0% 和 93.6%, 含量分别约为 634 Mb 和 1123 Mb, 各有 365 Mb 和 591 Mb 不属于源自栽培稻基因组的中高度重复序列, 未被栽培稻 gDNA 所覆盖的部分, 分别为 64 Mb 和 78 Mb 左右。此外, 以 *Cot-1* DNA 的组成为依据, 对这 3 个种核型进行了同源性聚类。【结论】稻属中度和高度重复序列和功能基因一样, 在不同种中也存在着高度同源性和保守性, 并在进化过程中得以保存下来。药用野生稻和疣粒野生稻基因组增大的重要原因之一, 可能是基因组中度和高度重复序列加倍的结果, 药用野生稻这种序列扩增相对疣粒野生稻要缓和得多。另外, 这两个野生种在长期进化过程中, 由于存在加倍、重排和基因选择性丢失等现象, 形成了具有自己种的特异性的基因组成分。

关键词: *Cot-1* DNA; CGH; 核型; 药用野生稻; 疣粒野生稻

Comparative Analysis of *Oryza sativa*, *O. officinalis* and *O. meyeriana* Genome with *Cot-1* DNA and Genomic DNA

LAN Wei-zhen¹, HE Guang-cun², WU Shi-jun¹, QIN Rui^{1,2}

(¹Key Laboratory of State Ethnic Affairs Commission for Biological Technology, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074; ²Key Laboratory of Ministry of Education for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract: 【Objective】The aim of the experiment is to study what the role of highly and moderately repetitive DNA sequences is play during the evolution process among different genomes in genus *Oryza*. 【Method】Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) procedure and comparative genomic hybridization (CGH) were adopted for genome analysis of *Oryza sativa*, *O. officinalis* and *O. meyeriana* with *Cot-1* DNA and genomic DNA from cultivated rice as probes. 【Result】The coverage percentage (%) and size (Mb) of *Cot-1* DNA in cultivated rice, *O. officinalis* and *O. meyeriana* were 47.10 ± 0.16 , 38.61 ± 0.13 , 44.38 ± 0.13 and 212.33 ± 1.21 , 269.42 ± 0.89 and 532.56 ± 1.68 , respectively. While the coverage percentage and size of genomic DNA from *O. sativa* in *O. officinalis* and *O. meyeriana* were 91.0%, 93.6% and 634 Mb, 1123 Mb respectively, in which there are 365 Mb and 591 Mb in *O. officinalis* and *O. meyeriana* which come from *O. sativa* genomic DNA not from repetitive sequences of *O. sativa*, and the uncoverage size in *O. officinalis* and *O. meyeriana* were 64 Mb and 78 Mb, respectively. In addition homologous category on karyotype analysis of these three species, *O. sativa*, *O. officinalis* and *O. meyeriana*, was made according to *Cot-1* DNA content.

收稿日期: 2005-06-28; 接受日期: 2006-02-15

基金项目: 国家高技术发展计划(863)(2004AA227120); 中国博士后科学基金(20040350574); 武汉市青年科技晨光计划(2004500607135)

作者简介: 蓝伟侦(1980-), 男, 畲族, 浙江武义人, 硕士研究生, 研究方向为植物分子细胞遗传学。Tel: 027-50164383; E-mail: lanwz@hotmail.com。
通讯作者覃瑞(1972-), 男, 土家族, 湖北来凤人, 副教授, 博士, 研究方向为植物分子细胞遗传学。Tel: 027-63015388; E-mail: qin_rui@hotmail.com

【Conclusion】The results showed that highly and moderately repetitive sequences in *Oryza* genus were conserved during evolution over millions of years in crop species as the functional genes. The repetitive sequences reduplication might be one of the important causes of the genome enlargement of *O. officinalis* and *O. meyeriana*. *O. officinalis* genome enlarged more slowly compared to *O. meyeriana*. Based on the above results, it is concluded that the duplication, recombination, and gene selective deletion formed the two species, *O. officinalis* and *O. meyeriana* during millions of years of evolution.

Key words: *Cot-1* DNA; CGH; Karyotype; *O. officinalis*; *O. meyeriana*

0 引言

【本研究的重要意义】水稻是世界上最重要的粮食作物之一，也是植物基因组研究的模式生物之一。由于现代水稻改良品种具有相同或相似的遗传来源^[1]，造成栽培稻遗传背景日益狭窄、基因流失和生物多样性严重下降的“瓶颈效应”^[2]。实践证明，野生稻种具有丰富的遗传多样性，在漫长的进化中，由于复杂的地理环境和各种生态因素的作用，形成了极其丰富的遗传多样性，分子生物学对遗传多样性研究也已证明。野生稻种的遗传多样性远较地方品种和现代改良品种丰富^[3,4]，通过有计划的考察、收集、筛选和鉴定，已从野生稻中发掘出了抗病、抗虫、耐冷、耐热、细胞雄性不育及其它许多优异基因^[5,6]，由于这些基因与产量性状密切相关，野生稻资源的研究正日益受到重视，并成为水稻育种学家和遗传学家改良水稻种质、培育水稻新品种最重要种质资源之一^[7-9]。【前人研究进展】分布于中国的药用野生稻和疣粒野生稻分别属 CC 和 GG 染色体组型，与栽培稻(AA)染色体组型不同，属于非 AA 组野生稻。研究表明，这两个非 AA 基因组野生稻具有更丰富的分子多态性，在水稻育种中具有更高的利用价值^[10,11]。但是由于非 AA 组野生稻与栽培稻染色体组型不同，稻属种间杂交常常遇到有性生殖障碍，严重阻碍了遗传物质转移交流。分子生物学已成为野生稻基因转移利用和研究的重要手段，并成功应用于野生稻杂种的鉴定、后代遗传组成的分析、外源 DNA 片段及其大小的检测、野生稻基因的标记定位和克隆^[9,12,13]。【本研究切入点】DNA 重复序列广泛存在真核生物基因组中，是真核生物基因组的重要特征和重要组成部分。高等植物的基因组重复序列通常达 50%以上^[14,15]，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%^[15,16]，占了高等植物基因组的绝大部分。由于重复 DNA 大部分属于非编码序列，这种大量不具编码功能序列在植物基因组中存在的意义及其在基因组中扮演什么样的角色，对生物学家来说一直是一

个难解的谜。近年来，随着 DNA 重复序列作为分子标记，如微卫星 DNA 在遗传图谱构建、品种鉴定、物种改良、目的基因的分离等方面的运用，重复序列的研究在植物基因组结构和功能、相关物种比较基因组学以及不同物种间进化关系等研究领域得到越来越多的重视，已经成为植物基因组学研究的重要内容^[17]。【拟解决的关键问题】本研究选用栽培稻“广陆矮 4 号”的中度和高度重复序列，即 *Cot-1* DNA，作为探针，对栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻进行比较原位杂交分析，来确定重复序列在 3 个种基因组中的分布情况。同时，利用该栽培稻基因组总 DNA (gDNA) 作为探针，对它们进行基因组原位杂交 (genomic *in situ* hybridization, GISH)，即比较基因组杂交 (comparative genomic hybridization, CGH) 作为对照。一方面研究稻属中栽培稻和野生种基因组结构和不同成分在基因组中排列的特点；另一方面，以栽培稻基因组组成成分为依据，通过与稻属不同基因组型间的同源性的对比研究，来进一步探讨栽培稻与这两个野生种在进化中的关系，从而为具有重要农艺性状的基因的分离、利用以及品种改良提供依据。

1 材料与方 法

1.1 植物材料和染色体制片

供试材料为栽培稻“广陆矮 4 号”(*O. sativa* L.)，由湖北省农业科学院曾左葵研究员提供；药用野生稻 (*O. officinalis* Wall) 稻株 1589 和疣粒野生稻 (*O. meyeriana* Baill) 分别由广东省国家野生稻圃和武汉大学遗传所提供。染色体制片分别参照 Yan 等^[18]和 Ren 等^[19]的方法。

1.2 *Cot-1* DNA 的制备

CTAB 法提取栽培稻“广陆矮 4 号”总 DNA，参照 Doyle 等^[20]的方法稍作修改。*Cot-1* DNA 制备参照 Zwick 等^[21]的方法并稍作修改，gDNA 于 0.14 Mpa 高压灭菌 3~15 min，使栽培稻 gDNA 打断成 800~1 500 bp 的长度，根据 *Cot-1* DNA 动力学公式 $Cot-1 = mol \cdot L^{-1} \times Ts$ ，计算 *Cot-1* DNA 完全复性所需的时

间。*Cot-1* DNA 完全复性后, S_1 核酸酶 ($2U \cdot \mu g^{-1}$ DNA, Promega) $37^\circ C$ 酶解 1 h, 平衡酚抽提, 无水乙醇沉淀过夜, 12 000 r/min 离心 10 min, 70% 的乙醇洗涤, 用 TE buffer 溶解, 得到所需 *Cot-1* DNA。

1.3 探针标记

Cot-1 DNA 和 gDNA 采用 Nick Translation Kit (Roche) 标记。20 μl 反应体系中含有 dATP、dCTP、dGTP、dTTP、biotin-11-dUTP、DNaseI、DNA 聚合酶 I、0.2~0.5 μg *Cot-1* DNA 或 gDNA, $15^\circ C$ 下标记 1.5~3 h 后加 1 μl $0.5 mol \cdot L^{-1}$ EDTA (pH 8.0) 终止反应, Sepharose CL-6B (Sigma) 纯化, 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。

1.4 原位杂交及检测

荧光原位杂交 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 和 CGH 方法分别参阅 Jiang 等^[22]和 Wei 等^[23]程序稍加修改。染色体制片于 $60^\circ C$ 烤片 1 h, RNase A / $2 \times SSC$ ($10 \mu g \cdot ml^{-1}$) $37^\circ C$ 处理 1 h, $2 \times SSC$ 室温漂洗 10 min, 胃蛋白酶 (Genview) / $10 mmol \cdot L^{-1}$ HCl ($5 \mu g \cdot ml^{-1}$) 处理 15 min, $2 \times SSC$ 室温漂洗 10 min, 70% 甲酰胺 $70^\circ C$ 变性 3.5~5 min, $-20^\circ C$ 70%、95% 和 100% 乙醇各洗脱 5 min, 室温晾干。每张片子杂交液含有 80 ng 标记的探针 DNA, 50% 去离子甲酰胺 (Sigma), 8% 硫酸葡聚糖 (Amresco), $2 \times SSC$, 0.5% SDS, 0.5 μg 鲑鱼精 DNA (DNA Salmon, Sigma), $37^\circ C$ 杂交过夜。杂交信号的荧光检测: $42^\circ C$ 20% 甲酰胺, $2 \times SSC$, $0.2 \times SSC$ 各洗脱 15 min, 室温 0.1% TritonX-100 (Sigma) 处理 5 min, 室温 $1 \times PBS$ 洗脱 10 min。依次加入 streptavidin-Cy3 (Rockland), Biotinylated Streptavidin (Vector), streptavidin-Cy3 (Rockland), $37^\circ C$ 各温育 1 h, $1 \times PBS$ 室温洗涤 3 次, 每次 5 min。10 $\mu g \cdot ml^{-1}$ DAPI (Sigma) 复染, Olympus BX61 荧光显微镜观察, 用 Case Data Manager Expo 2.1.1 图象系统控制的 Cool-1300QS CCD (VDS, Germany) 照相系统摄取图片。FISH View EXPO 2.0 软件图片处理和核

型分析, SPOT advanced 软件测量染色体长度和计算杂交信号区域面积。

2 结果与分析

2.1 *Cot-1* DNA 的荧光原位杂交

用 *Cot-1* DNA 作为探针分别对栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻进行荧光原位杂交, 其结果如图所示, A 和 B 为 *Cot-1* DNA 在栽培稻染色体上的 FISH 图像, D、E 和 G、H 分别为 *Cot-1* DNA 在药用野生稻和疣粒野生稻染色体上的 FISH 图像。

根据红色荧光结果来看, *Cot-1* DNA 主要分布在这 3 种染色体的着丝粒、近着丝粒和端粒区域, 染色体臂的中部相对要少的多。从信号分布来看, 这 3 个种所有染色体上均有信号分布, 但是一些染色体信号覆盖较多, 而另一些染色体上信号较少 (图-A、B、D、E、G、H)。根据 SPOT advanced 软件对 *Cot-1* DNA 红色信号覆盖面积的计算, 得到栽培稻 *Cot-1* DNA 在 3 个不同基因组中百分含量 (表 1), 栽培稻 *Cot-1* DNA 分别约占栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻基因组的 $47.17\% \pm 0.16$, $38.61\% \pm 0.13$ 和 $41.07\% \pm 0.04$ 。已经知道水稻、药用野生稻和疣粒野生稻基因组大小分别为 450 Mb, 697 Mb 和 1 201 Mb^[24], 通过计算得知 *Cot-1* DNA 在这 3 个种的含量分别为 (212.33 ± 1.21) Mb, (269.42 ± 0.89) Mb 和 (532.56 ± 1.78) Mb (表 1)。

2.2 CGH 分析

用标记栽培稻 gDNA 作为探针分别对栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻进行了比较基因组杂交 (CGH), 结果如图所示。其中 C、F 和 I 分别为栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻的 GISH 图像。从图中可以看出, 红色荧光覆盖了整个栽培稻染色体 (图-C), 在药用野生稻和疣粒野生稻染色体上也出现了大量荧光信号 (图-F、I)。SPOT advanced 软件计算出水稻 gDNA 在这 2 个种基因组中覆盖率分别为 $91.03\% \pm 0.12$ 和 $93.56\% \pm 0.10$, 其覆盖基因组大小分别为 (634.67 ± 1.07) Mb 和 ($1 123.56 \pm 1.12$) Mb (表 1)。

表 1 *Cot-1* DNA 和 gDNA 杂交信号在栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻染色体分布参数

Table 1 Distribution data of *Cot-1* DNA and genomic DNA hybridization signals in *O. sativa*, *O. officinalis* and *O. meyeriana*

种名 Species name	<i>Cot-1</i> DNA 信号覆盖百分率 Signal coverage percentage of <i>Cot-1</i> DNA (%)	gDNA 信号覆盖百分率 Signal coverage percentage of genomic DNA (%)	<i>Cot-1</i> DN 含量 <i>Cot-1</i> DNA content (Mb)	gDNA 含量 Genomic DNA content (Mb)
<i>O. sativa</i>	$47.17 \pm 0.16^{1)}$	100 ± 0.15	212.33 ± 1.21	450
<i>O. officinalis</i>	38.61 ± 0.13	91.03 ± 0.12	269.42 ± 0.89	634.67 ± 1.07
<i>O. meyeriana</i>	44.38 ± 0.11	93.56 ± 0.10	532.56 ± 1.78	$1 123.56 \pm 1.12$

¹⁾ 标准差 Standard deviation

A, B. 水稻 *C_{0t-1}* DNA 在栽培稻的 FISH 图像; C. 水稻基因组总 DNA(gDNA)在栽培稻的 GISH 图像; D, E. 水稻 *C_{0t-1}* DNA 在药用野生稻的 FISH 图像; F. 水稻 gDNA 在药用野生稻的 GISH 图像; G, H. 水稻 *C_{0t-1}* DNA 在疣粒野生稻的 FISH 图像; I. 水稻 gDNA 在疣粒野生稻的 GISH 图像; J. 基于 FISH 图像的栽培稻核型图; K. 药用野生稻核型图; L. 疣粒野生稻核型图. Bar=10 μ m

A, B. FISH images of rice *C_{0t-1}* DNA probe in *O. sativa*; C. GISH image of rice total genomic DNA probe in *O. sativa*; D, E. FISH images of rice *C_{0t-1}* DNA probe in *O. officinalis*; F. GISH image of rice total genomic DNA probe in *O. officinalis*; G, H. FISH images of rice *C_{0t-1}* DNA probe in *O. meyeriana*; I. GISH image of rice total genomic DNA probe in *O. meyeriana*; J. Karyotype image of *O. sativa*; K. Karyotype image of *O. officinalis*; L. Karyotype image of *O. meyeriana*. Bar=10 μ m

图 *C_{0t-1}* DNA 在栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻的 FISH 比较分析以及比较基因组杂交 (CGH)

Fig. Comparative analysis of *Oryza sativa*, *O. officinalis* and *O. meyeriana* genome with *C_{0t-1}* DNA and genomic DNA

2.3 基于 FISH 图像的核型分析

笔者以 FISH 图像为依据, 使用 FISH View EXPO 2.0 软件分别对栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻的染色体从长到短进行了配对排序 (图-J、K、L), K、L 分别为药用野生稻和疣粒野生稻核型图。每幅图中的上行为 FISH 结果合成图像, 下行红色荧光为其对应染色体的 *Cot-1* DNA 探针杂交信号图像。栽培稻核型分析依据国际水稻所标准核型, 药用野生稻和疣粒野生稻采用常规核型分析方法进行。根据 FISH 图像, 重复序

列在染色体上分布具有一定的带型, 具有两个相同的带型为同源染色体, 核型分析结果见表 2。

从图可以看出, 栽培稻的第 2、4、6、8、9 和 10 染色体 *Cot-1* DNA 分布较多, 第 1、3 和 12 染色体分布最少 (图-J), 而药用野生稻 *Cot-1* DNA 主要集中在第 5、6 和 10 染色体上, 第 1、2、3、7、9 和 11 很少分布 (图-K), 疣粒野生稻除了第 10、11 和 12 染色体 *Cot-1* DNA 分布较少外, 其它分布相对均匀 (图-L)。

表 2 基于 FISH 图像对栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻的核型分析

Table 2 Karyotype analysis of *O. sativa*, *O. officinalis* and *O. meyeriana* based on FISH images

编号 Chromosomal order number	栽培稻 <i>O. sativa</i>			药用野生稻 <i>O. officinalis</i>			疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>		
	臂比 AR±SD ¹⁾	相对长度 RL±SD ²⁾	着丝粒位置 PC	臂比 AR±SD	相对长度 RL±SD	着丝粒位置 PC ³⁾	臂比 AR±SD	相对长度 RL±SD	着丝粒位置 PC
1	1.22±0.13	12.53±0.43	m	1.33±0.23	12.57±0.40	m	1.25±0.27	13.01±0.47	m
2	1.13±0.48	11.92±0.29	m	1.47±0.36	10.66±0.11	m	1.49±0.49	12.01±0.14	m
3	1.80±0.32	10.21±0.32	sm	2.25±0.67	10.49±0.53	sm	1.46±0.16	10.26±0.24	m
4	1.25±0.17	8.86±0.55	m	1.23±0.24	9.07±0.21	m	1.15±0.31	9.33±0.55	m
5	1.40±0.27	8.50±0.48	m	2.21±0.37	8.83±0.32	sm	1.22±0.51	9.02±0.19	m
6	1.10±0.47	7.73±0.31	m	1.31±0.45	7.91±0.28	m	1.13±0.27	8.73±0.22	m
7	2.81±0.43	7.57±0.27	sm	1.90±0.49	7.41±0.50	sm	1.33±0.24	7.31±0.36	m
8	1.73±0.44	6.94±0.31	sm	1.20±0.49	7.39±0.11	m	1.24±0.41	7.01±0.11	m
9	1.26±0.29	6.68±0.48	m	1.32±0.25	7.31±0.57	m	1.77±0.17	6.55±0.46	sm
10	1.28±0.31	6.51±0.37	m	1.27±0.46	6.23±0.44	m	1.90±0.33	6.34±0.53	sm
11	1.82±0.38	6.36±0.17	sm	1.21±0.39	6.14±0.39	m	1.11±0.49	5.46±0.17	m
12	1.15±0.33	6.24±0.54	m	2.22±0.21	6.06±0.48	sm	1.32±0.14	5.07±0.20	m

¹⁾AR: arm ratio±SD, ²⁾RL: relative length±SD, ³⁾PC: position of centromere

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^[25]。根据重复序列在基因组的拷贝数, 可将重复序列分为低度重复序列, 中度重复序列和高度重复序列, *Cot-1* DNA 主要为中度和高度重复序列^[21]。在过去, 对植物基因组研究主要集中在特异重复序列和转座子等低拷贝重复序列以及简单重复序列^[25-28]。利用荧光原位杂交对重复序列的分析多集中于低拷贝重复序列^[29,30]。对中度重复序列和高度重复序列的分析多集中于人和动物, 植物中仅有 Zwick 等不多的报道^[21], 尤其是利用荧光原位杂交对中高度重复序列在不同物种的定量分析还未见有关报道。在此之前, 笔者利用 BAC-FISH 对抗性基因 *Pi-5(t)* 和 *Gm-6* 在栽培稻和药用野生稻的比较物理定位中就发现, 不用 *Cot-1* DNA 封阻时, 水稻 BAC 克隆在药用野生稻染色体上出现大量杂交信号, 这证明了水稻中高度重

复序列在药用野生稻基因组中也同样存在^[31]。因此, 本研究选用水稻 *Cot-1* DNA 作为探针, 对栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻进行了比较分析。从图-A、B、D、E、G 和 H 以及表 1 的结果来看, 栽培稻中度和高度重复序列在栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻基因组中大量存在, 其覆盖基因组比例 (%) 和大小 (Mb) 分别为 47.10 ± 0.16 , 38.61 ± 0.13 , 44.38 ± 0.13 和 212.33 ± 1.21 , 269.42 ± 0.89 以及 532.56 ± 1.68 。说明稻属中度和高度重复序列和功能基因一样, 在不同种中也存在着高度同源性和保守性, 并在进化过程中得以保存下来。

此外, 药用野生稻基因组为 697 Mb, 约为栽培稻 (450 Mb) 的 1.5 倍, 疣粒野生稻为 1 201 Mb, 约为栽培稻的 2.7 倍^[24]。在本研究中, 从表 1 可以看出, 栽培稻 *Cot-1* DNA 在药用野生稻和疣粒野生稻基因组中含量分别为 269 Mb 和 532 Mb 左右, 约为栽培稻基因组中的 *Cot-1* DNA 含量 (212 Mb) 的 1.3 和 2.5 倍。

说明在进化过程中,基因组增大的重要原因之一,可能是基因组中度和高度重复序列加倍的结果,这从栽培稻基因组与药用野生稻、疣粒野生稻基因组倍数比和栽培稻与药用野生稻、疣粒野生稻基因组 *Cot-1* DNA 含量的倍数比接近可以做出如此推测。疣粒野生稻基因组 *Cot-1* DNA 含量如此之大(532 Mb)(表 1),而从图-L 来看, *Cot-1* DNA 在疣粒野生稻染色体中大多均匀分布,可以推测在进化过程中原始祖先基因组可能发生了更为广泛的序列跃进式扩增,使基因组急剧加大,最终形成了现在的疣粒野生稻。而药用野生稻的这种扩增相对要缓和得多, *Cot-1* DNA 覆盖染色体 269 Mb 左右,仅仅比栽培稻 212 Mb 多了 57 Mb,从图-K 来看, *Cot-1* DNA 主要集中在第 5、6 和 10 染色体上,可能是中高度重复序列加倍只发生于基因组某些区段中。

通过对栽培稻、药用野生稻和疣粒野生稻的 CGH 分析结果表明(表 1),栽培稻 gDNA 在药用野生稻和疣粒野生稻基因组中的覆盖率约为 91.0%和 93.6%,呈现出很高的同源性,这进一步反映了稻属中各个种彼此相近的亲缘关系。其次,根据 gDNA 在药用野生稻和疣粒野生稻中的含量来看, gDNA 分别约为 634 Mb 和 1 123 Mb,这些同源成分无疑还包含了相应的 *Cot-1* DNA,而 *Cot-1* DNA 在这 2 个种中含量分别为 269 Mb 和 532 Mb,那么各有 365 Mb 和 591 Mb 不属于源自栽培稻基因组的中高度重复序列,而应该是栽培稻基因组中单和低拷贝序列。这些序列可能是基因,或者是非编码序列,因为已有的研究表明,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^[32,33],笔者的结果正好与之相互印证,说明利用荧光原位杂交进行的比较基因组定量分析的这一新方法切实可行。此外,药用野生稻和疣粒野生稻基因组中还有未被栽培稻基因组 DNA 所覆盖的部分,分别约为 64 Mb 和 78 Mb,这有可能是这 2 个种在长期进化过程中形成的具有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的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^[17,34-36]。从本研究来看,疣粒野生稻与栽培稻在基因组组成成分的差异比药用野生稻与栽培稻的差异要大(表 1),这或许是

导致不同野生稻和栽培稻亲和性不同的原因之一,也可以在一定程度上解释为什么药用野生稻与栽培稻比疣粒野生稻与栽培稻更容易杂交^[9]。

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,笔者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 号染色体进行了类似的比较染色体核型分析^[30],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。这种结合基因组的组成来进行染色体核型分析,一方面弥补了传统分析法的不足,另一方面能更加快速、准确地进行同源染色体配对,其核型结果更为准确可靠。目前,对药用野生稻和疣粒野生稻其它的染色体比较核型分析正在进行当中。在本研究中,从 *Cot-1* DNA 在 3 个种上的 FISH 结果来看,重复序列在 3 个种染色体分布具有一定的杂交带型(图-J、K、L),对这 3 个种同源染色体的识别就是依据相似带型进行的。与常规的染色体核型分析方法不同,这是根据水稻基因组 *Cot-1* DNA 的组成为依据,对 3 个种核型进行的同源性聚类,突破了传统的分析方法。毫无疑问,本研究的 *Cot-1* DNA 同源性带型聚类与前述的 BAC-FISH 比较染色体核型研究有机的结合,将进一步提高稻属染色体识别的准确性。由于这是基于比较基因组学进行的,其结果不仅为研究稻属不同种染色体进化过程中结构的变化特点提供依据,而且还可以研究进化过程中重复序列在染色体构建中所起的作用,从而大大促进稻属和禾本科大遗传体系的发展。

4 结 论

稻属中度和高度重复序列和功能基因一样,在不同种中也存在着高度同源性和保守性,并在进化过程中得以保存下来。药用野生稻和疣粒野生稻基因组增大的重要原因之一,可能是基因组中度和高度重复序列加倍的结果,而药用野生稻这种序列扩增相对疣粒野生稻要缓和得多,则导致了疣粒野生稻基因组比药用野生稻基因组要大得多。另外,这两个野生种在长期进化过程中,由于存在加倍、重排和基因选择性丢失等现象的存在,也形成了具有自己种的特异性的基因组成分。

致谢:感谢湖北省农业科学院曾左葵研究员、广东省国

家野生稻圃和武汉大学遗传所提供的宝贵材料。在实验过程中, 何光存教授、李刚博士、戈岩同学等给予了大力帮助, 在此表示衷心感谢。

References

- [1] Chang T T. Conservation of rice genetic resources: luxury or necessity? *Science*, 1984: 251-256.
- [2] Tanksley S D, McCouch S R. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 1997, 227: 1063-1066.
- [3] 董玉琛. 作物野生种质资源及其利用. 中国野生稻研究与利用. 第一届全国野生稻大会论文集. 2003: 3-7.
Dong Y C. Applications of wild germ plasm of crop. *Studies and Applications of Wild Rice in China*. Proceeding of the first national conference on wild rice in China. 2003: 3-7. (in Chinese)
- [4] 孙传清, 王象坤, 吉村淳, 岩田申夫. 普通野生稻和亚洲栽培稻遗传多样性的研究. *遗传学报*, 2000, 27: 227-234.
Sun C Q, Wang X K, Atsushi Y, Nobuo I. A study of the genetic diversity of common wild rice (*O. rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*O. sativa* L.) by RFLP Analysis. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27: 227-234. (in Chinese)
- [5] Khush G S, Bacalangco E, Ogawa T. A new gene for resistance to bacterial blight from *O. longistaminata*. *Rice Genetics Newsletters*, 1990, 7: 121-122.
- [6] Xiao J H, Grandillo S, Ahn S N. Genes from wild rice improve yield. *Nature*, 1996, 384: 223-224.
- [7] 卢宝荣. 稻种遗传多样性的开发利用及保护. *生物多样性*, 1998, 6: 63-72.
Lu B R. Diversity of rice genetic resources and its utilization and conservation. *Chinese Biodiversity*, 1998, 6: 63-72. (in Chinese)
- [8] 何光存. 细胞工程与分子生物学结合——野生稻优异种质资源的有效途径. *生物工程进展*, 1998, 18(2): 41-45.
He G C. Combination of cell project and molecular biology—the efficacious way of utilization for wild rice resource. *Bulletin of Biology*, 1998, 18(2): 41-45. (in Chinese)
- [9] 何光存, 舒理慧. 野生稻遗传基础研究与有利基因的发掘和利用. 中国野生稻研究与利用. 第一届全国野生稻大会论文集. 2003: 193-201.
He G C, Shu L H. Studies on genetic background of and applications of genes of wild rice. *Studies and Applications of Wild Rice in China*. Proceeding of the first national conference on wild rice in China. 2003: 193-201. (in Chinese)
- [10] 吴强, 廖兰杰, 杨代常, 何光存, 舒理慧. 野生稻基因组随机扩增多态性 DNA(RAPD)分析. *热带亚热带植物学报*, 1998, 6: 260-266.
Wu Q, Liao L J, Yang D C, He G C, Shu L H. RAPD analysis of wild rice genomes. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 1998, 6: 260-266. (in Chinese)
- [11] Jena K K, Khush G S. Introgression of genes from *Oryza officinalis* Wall ex Watt to cultivated rice, *O. sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 1990, 80: 737-745.
- [12] 张寿洲, 卢宝荣, 洪德元. 原位杂交在稻属研究中的应用. *植物分类学报*, 1998, (1): 87-96.
Zhang S Z, Lu B R, Hong D Y. *In situ* hybridization and its application in studies on *Oryza*. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1998, (1): 87-96. (in Chinese)
- [13] Qin R, Wei W H, Ning S B, Jin W W, He G C, Song Y C. The physical location of rice *Gm-2* and *Gm-6* in *O. officinalis* with BAC-FISH based on comparative RFLP map of wild rice, *O. officinalis* and cultivated rice. *Agricultural Sciences in China*, 2002, 1: 1-4.
- [14] Flavell R B, Bennett M D, Smith J B, Smith D B. Genome size and proportion of repeated sequence DNA in plant. *Biochemistry Genetics*, 1974, 12(4): 257-269.
- [15] Bennetzen J L, Jianxin M A, Devos K M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Annals of Botany*, 2005, 95(1): 127-132.
- [16] McCouch S R, Tanksley S D. The world rice economy: Challenges ahead. In: Khush G S and Toenniessen G H. *Rice Biotechnology: Biotechnology in Agriculture Series, No.6*. Commonwealth Agricultural Bureaux International Press, Wallingford, U.K. 1991.
- [17] Yin P, Hartemink A J. Theoretical and practical advances in genome halving. *Bioinformatics*, 2005, 21: 869-879.
- [18] Yan H M, Song Y C, Li L J, Bi X Z, Fu B Y. Physical location of rice *Pi-5(t)*, *Glh* and *RTSV* genes by FISH of BAC clones. *Wuhan University Journal of Nation Science*, 1998, 3: 226-230.
- [19] Ren N, Song Y C, Bi X Z, Ding Y, Liu L H. The physical location of genes *cdc2* and *prh1* in Maize (*Zea mays* L.). *Hereditas*, 1997, 126: 211-217.
- [20] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, 12: 13-15.
- [21] Zwick M S, Hanson R E, Mcknight T D, Islam-Faridi M H, Stelly D M, Wing R A, Price H J. A rapid procedure for the isolation of *Cot-1* DNA from plants. *Genome*, 1997, 40: 138-142.
- [22] Jiang J M, Gill B S, Wang G L, Ronald P C, Ward D C. Metaphase

- and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosome. *The Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 1995, 92: 4487-4491.
- [23] Wei W H, Qin R, Song Y C, Guo L Q, Gu M G. Comparative analyses to diseases resistant and nonresistant lines from maize \times *Zea diploperennis* by GISH. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 2001, 42: 109-114.
- [24] Uozu S, Ikehashin H, Ohmido N, Ohtsubo H, Ohtsubo E, Fukui K. Repetitive sequences: cause for variation in genome size and chromosome morphology in the genus *Oryza*. *Plant Molecular Biology*, 1997, 35: 791-799.
- [25] Bennett M D, Leitch I J. Plant genome size research: a field in focus. *Annals of Botany*, 2005, 95: 1-6.
- [26] 王金发, 李一琨, 何海琼, 陈中健, 刘良式. 水稻重复序列 *RRD-3* 在转基因植物中的启动子功能. *植物学报*, 2000, 42: 1057-1061.
- Wang J F, Li Y K, He H Q, Chen Z J, Liu L S. Promoter function of a rice repetitive DNA sequence *RRD-3* in transgenic plants. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42: 1057-1061. (in Chinese)
- [27] Quiroz H C. Plant genomics: an overview. *Biological Research*, 2002, 35: 385-399.
- [28] 余 艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件优化与筛选. *热带亚热带植物学报*, 2003, 11(1): 15-19.
- Yu Y, Chen H S, Ge X J. Optimization of experiment conditions and primer screening with ISSR markers. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2003, 11(1): 15-19. (in Chinese)
- [29] 赵丽娟, 李立家, 覃 瑞, 熊怀阳, 宋运淳. 大麦 45S 和 5S rDNA 定位及 5S rDNA 伸展纤维的 FISH 分析. *武汉植物学研究*, 2005, 23(1): 15-19.
- Zhao L J, Li L J, Qin R, Xiong H Y, Song Y C. Location of 45S and 5S rDNA on barley chromosome and FISH analysis for 5S rDNA on extended DNA fibers. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2005, 23(1): 15-19. (in Chinese)
- [30] Cheng Z K, Yan H H, Yu H X, Tang S C, Jiang J M, Gu M H, Zhu L H. Development and applications of a complete set of rice telotrisomics. *Genetics*, 2001, 157: 361-368.
- [31] Qin R, Wei W H, Jin W W, He G C, Ning S B, Yu S W, Song Y C. Physical location of rice *Gm-6*, *Pi-5(t)* genes in *O. officinalis* with BAC-FISH. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46: 2427-2430.
- [32] Choi H K, Mun J H, Kim D J, Zhu H Y, Baek J M, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss G B, Young N D, Cook D R. Estimating genome conservation between crop and model legume species. *The Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 2004, 101: 15289-15294.
- [33] Feuillet C, Keller B. High gene density is conserved at syntenic loci of small and large grass genomes. *The Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 1999, 96: 8265-8270.
- [34] Ku H M, Vision T, Liu J P, Tanksley S D. Comparing sequenced segments of the tomato and Arabidopsis genomes: large-scale duplication followed by selective gene loss creates a network of synteny. *The Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 2000, 97: 9121-9126.
- [35] Yogeewaran K, Frary A, York T L, Amenta A, Lesser A H, Nasrallah J B, Tanksley S D, Nasrallah M E. Comparative genome analyses of *Arabidopsis* spp.: Inferring chromosomal rearrangement events in the evolutionary history of *A. thaliana*. *Genome Research*, 2005, 15: 505-515.
- [36] Multani D S, Khush G S, Reyes B G, Brar D S. Alien genes introgression and development of monosomic alien addition lines from *Oryza latifolia* Desv. to rice, *Oryza sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107: 395-405.

(责任编辑 于 竞, 孙雷心)