



## 水稻减数分裂染色体分析方法

程新杰<sup>1</sup>, 于恒秀<sup>1</sup>, 程祝宽<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>扬州大学农学院, 扬州 225009; <sup>2</sup>中国科学院遗传与发育生物学研究所植物基因研究中心, 北京 100101

**摘要** 减数分裂粗线期染色体研究技术的发展, 很大程度上克服了水稻(*Oryza sativa*)细胞遗传研究中较小染色体所带来的研究困难。减数分裂染色体的制备与观察已经成为水稻细胞遗传学研究中的常规方法。该文详细描述了水稻中常用的减数分裂染色体制备、荧光原位杂交和免疫荧光染色的实验方法。

**关键词** 水稻, 减数分裂, 染色体, 荧光原位杂交, 免疫荧光染色

程新杰, 于恒秀, 程祝宽 (2019). 水稻减数分裂染色体分析方法. 植物学报 54, 503–508.

染色体是核基因组DNA的载体, 对于物种遗传与进化具有十分重要的作用。水稻(*Oryza sativa*)是重要的粮食作物, 其基因组较小, 仅为430 Mb (Arunmuganathan and Earle, 1991), 这在所有禾本科作物中属于最小的类型。随着基因组学及分子生物学研究的深入, 水稻已成为单子叶植物分子生物学的模式生物之一(Goff, 1999)。基因组大小与染色体大小有着十分密切的关系, 水稻染色体在禾本科作物中属于最小的类型之一。在现代染色体制备技术出现之前, 水稻核型分析几乎是不可能的。与小麦(*Triticum aestivum*)、大麦(*Hordeum vulgare*)或玉米(*Zea mays*)等染色体较大的作物相比, 水稻细胞遗传学研究一直进展缓慢。然而, 将减数分裂粗线期染色体引入水稻细胞学研究, 从根本上克服了其较小染色体带来的诸多困难。而且水稻染色体数量适中, 为粗线期染色体研究提供了有利条件。

水稻粗线期染色体染色的制备方法主要有2种类型: 一种是醋酸洋红染色法(Wu, 1967); 另一种是Giemsa染色法(Kurata et al., 1981)。这2种方法都能获得较好的粗线期染色体图片, 并能很好地区分染色质和常染色质, 对于不同染色体的鉴定有很大帮助。20世纪末, 随着分子生物学研究的发展, 将经典细胞遗传学与现代分子生物学相结合的荧光原位杂交技术, 堪称细胞遗传学研究方法的一场革命。这种显微技术的发展, 使得直接在染色体上观察DNA序列成为可能。随着水稻全基因组序列测定完成, 在水

稻基因组中已鉴定出许多类型的串联重复序列, 包括45S rDNA、5S rDNA、CentO (着丝粒重复序列)和Os48 (亚端粒重复序列) (Cheng et al., 2001b, 2002)。由于这些串联重复序列可以在特定染色体上产生不同的荧光杂交信号, 为水稻染色体的识别带来了很大便利。此外, 利用水稻基因组DNA构建的细菌人工染色体(BACs), 通过筛选染色体或染色体臂特异BAC克隆, 建立了2套染色体特异的细胞遗传学标记(Cheng et al., 2001a; Tang et al., 2007), 从根本上解决了水稻染色体识别的难题。

免疫荧光染色是另一种原位检测方法, 通过鉴定特异抗体-抗原的互作, 来检测特定蛋白质在细胞分裂过程中的时空变化规律(Pawlowski et al., 2004)。这项技术的核心是利用一种带有标签的抗体, 将抗原与不同颜色的荧光基团相结合, 在显微镜下观察不同荧光基团, 从而对相关抗原进行研究。由于大多数减数分裂相关蛋白质在染色体上出现和消失有特定时间, 因此可检测它们在减数分裂过程中存在的准确位置和阶段, 是研究其生物学功能的一种常见方法。

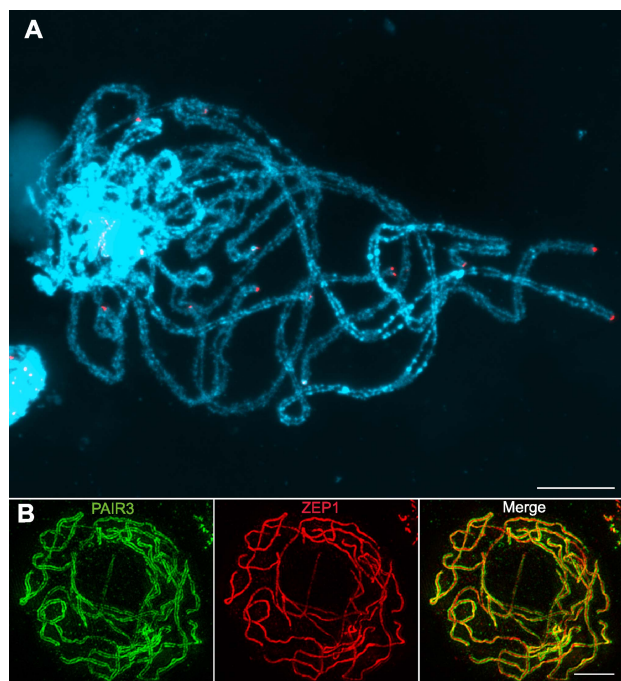
自水稻基因组序列测序完成以来, 以解析不同基因功能的功能基因组学研究已全面展开。以水稻为研究对象, 众多与水稻形态、发育和代谢相关的基因已逐渐被克隆, 并完成对其生物学功能的解析(Li et al., 2015; Ma et al., 2015; Wang et al., 2015)。同时, 利用水稻进行减数分裂调控分子机理研究也有很多优

收稿日期: 2019-05-12; 接受日期: 2019-06-14

\* 通讯作者。E-mail: zkcheng@genetics.ac.cn

势。例如,水稻是粮食作物中基因组最小的,加之已建立其成熟的遗传转化体系、拥有相对完善的基因组信息以及适中的染色体大小和数目,这些优势使得水稻成为继拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)之后,研究减数分裂调控分子机制的又一种模式植物。到目前为止,已在水稻中克隆了40多个调控减数分裂过程的基因(Nonomura et al., 2007; Wang et al., 2009, 2010; Yu et al., 2010; Che et al., 2011; Miao et al., 2013; Luo et al., 2014; Ji et al., 2016; Zhang et al., 2017; Li et al., 2018; Ren et al., 2018; Zhao et al., 2018)。

本文着重介绍近年来在水稻中开发并成功应用的减数分裂染色体制备、荧光原位杂交以及免疫荧光染色反应等方面的实验方法(图1)。



**图1** 水稻减数分裂粗线期染色体

(A) 水稻花粉母细胞减数分裂粗线期染色体的荧光原位杂交结果,红色为端粒探针pAtT4的杂交信号,蓝色为DAPI染色的粗线期染色体(普通荧光显微镜下观察);(B) 水稻花粉母细胞减数分裂粗线期染色体的免疫荧光染色结果,绿色为PAIR3荧光信号,红色为ZEP1荧光信号(超分辨荧光显微镜下观察)。Bars=5  $\mu\text{m}$

**Figure 1** Characterization of rice meiotic pachytene chromosomes

(A) Fluorescent *in situ* hybridization using rice pachytene chromosomes probed with the telomeric sequence pAtT4 (red); Chromosomes stained with DAPI (blue) (Images taken with a regular fluorescence microscope); (B) Immunodetection of PAIR3 (green) and ZEP1 (red) in rice pachytene chromosomes (Images taken with a super resolution microscope). Bars=5  $\mu\text{m}$

## 1 材料和试剂

### 1.1 染色体制备

- (1) 卡诺固定液: 无水乙醇+冰醋酸按3:1 (v/v)配制。
- (2) 1%醋酸洋红染液: 将1.0 g洋红粉末和100 mL 45%醋酸加入到500 mL的烧杯中,在装有回流柱的酒精灯上煮沸8小时。然后转移至冰上快速冷却,室温保存。
- (3) 复染溶液: 将10 mg 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)溶解于10 mL去离子水中,制备成储存原液,分装并贮存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。吸取10  $\mu\text{L}$  DAPI储存原液加至1 mL Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA)抗淬灭剂中,制备成工作液,并在 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

### 1.2 荧光原位杂交

#### 1.2.1 探针制备

- (1) 10 $\times$ Nick-translation buffer: 0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH7.5)和50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ 。
- (2) dNTPs (A、C、G): 配制含有0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dATP、0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dGTP和0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dCTP的溶液。
- (3) 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地高辛标记的dUTP或生物素标记的dUTP (见注意事项1)。
- (4) Sheared salmon sperm DNA: 将10 mg Sheared salmon sperm DNA溶解在1 mL去离子水中。
- (5) 50% Dextran sulfate: 将0.5 g Dextran sulfate溶解于1 mL去离子水中。

#### 1.2.2 杂交、洗涤和免疫检测

- (1) 20 $\times$ SSC: 3.0  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl及0.3  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Sodium citrate溶液。配制1 L 20 $\times$ SSC: 将175.3 g NaCl和88.2 g Sodium citrate (含2H<sub>2</sub>O)溶于900 mL去离子水中,用10  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl将pH值调至7.0,再用去离子水定容至1 L。经高压灭菌后,室温保存。
- (2) 10 $\times$ PBS: 1.37  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl、27  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl、100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 及20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH7.4)。配制1 L 10 $\times$ PBS: 将80.0 g NaCl、2.0 g KCl、14.2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 和2.7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 溶于900 mL去离子水中,用5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl将pH值调至7.4,再用去离子水定容至1 L。经高压灭菌后,室温保存。
- (3) 5 $\times$ TNB: 0.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH7.5)、0.75

mol·L<sup>-1</sup> NaCl及2.5% blocking reagent (Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Germany)。配制10 mL 5×TNB: 将5 mL 1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH=7.4)、0.44 g NaCl及0.25 g blocking reagent混合, 再用去离子水定容至10 mL后于-20°C储存。

(4) 变性溶液: 将7 mL去离子化甲酰胺、1 mL 20×SSC和2 mL去离子水混合。4°C保存。

(5) 终止液: 0.2 mol·L<sup>-1</sup> EDTA。

(6) 抗体检测液: 对于每张载玻片, 用80 μL去离子水混合20 μL 5×TNB缓冲液, 然后添加1 μL抗体。现配现用。

### 1.3 免疫染色

4%多聚甲醛: 将4.0 g多聚甲醛溶于95 mL去离子水中, 在烧杯中搅拌混匀, 盖上烧杯, 均匀加热至70°C, 滴加1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH, 直至溶液澄清, 置于冰上降温。使用1 mol·L<sup>-1</sup> HCl将pH值调至7.0。用去离子水将体积定容至100 mL。4°C保存。

## 2 实验方法

### 2.1 减数分裂染色体制备

(1) 收集处于减数分裂阶段的水稻幼穗(见注意事项2), 在室温下用卡诺固定液固定24小时以上。固定的组织可在-20°C冰箱中储存数月。

(2) 从固定的稻穗中取出含有花粉母细胞的颖花(见注意事项3), 置于载玻片上。一手操作尖头镊子, 另一手操作解剖针, 从小穗上解剖出6枚花药。用解剖针将花药切成两半, 在花药上加1滴醋酸洋红(见注意事项4)。

(3) 用解剖针快速而彻底地挤压花药(见注意事项5), 并用22 mm×22 mm的盖玻片盖住花药及醋酸洋红溶液。

(4) 将含有花药的载玻片, 在酒精灯火焰上方加热, 注意不能沸腾。使细胞质和染色体充分染色, 并使得细胞膨胀变大。

(5) 用吸管将45%醋酸滴入盖玻片左侧, 用滤纸从右侧吸出。重复此步骤, 直至盖玻片下红色的醋酸洋红溶液彻底褪色。

(6) 再次轻轻加热载玻片, 并倒置载玻片, 将含有盖玻片的一面放在滤纸上, 用左右两手的手指用力按压

载玻片。

(7) 将制备好的涂片置于相差显微镜下, 检查花粉母细胞减数分裂的分裂相是否完好。

(8) 为了继续荧光原位杂交的实验流程, 将含有盖玻片的载玻片浸泡在液氮中, 然后用锋利的刀片快速揭除盖玻片。将载玻片通过梯度(70%、90%和100%)乙醇溶液进行脱水, 每次5分钟(见注意事项6)。

(9) 滴加10 μL含有DAPI的Vectashield溶液, 并覆盖1张24 mm×32 mm的盖玻片。倒置载玻片于纸巾上(有盖玻片的一面朝下), 轻轻按压, 让黏稠的Vectashield溶液散开, 尽量减少气泡产生。

(10) 在荧光显微镜下观察染色体。由于水稻染色体很小, 应使用配备100×镜头的显微镜(如ZEISS, A2), 并配备适当滤光片的高分辨率/高灵敏度CCD相机(如ZEISS, Axiocam 506 mono)。

(11) 将制备好的涂片放入不透光的塑料盒中, 冷冻保存。涂片可在-20°C冰箱中保存数周。

## 2.2 荧光原位杂交法

### 2.2.1 探针标记

(1) 准备以下反应液: 5 μL 10×Nick-translation buffer; 5 μL 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP (A、C、G) solution; 5 μL 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> Digoxigenin-dUTP或Biotin-dUTP; 1 μg Probe DNA; 12 units DNA Polymerase I; 1 unit (见注意事项7) DNase I。

(2) 用去离子水将反应液总量调至50 μL, 在每次添加溶液之后, 仔细混合, 最后将液体离心至管底。

(3) 在15°C恒温水浴中孵育2小时。

(4) 添加5 μL终止液, 停止反应。

### 2.2.2 探针与染色体杂交

(1) 按以下配方制备杂交混合液: 2 μL Sheared salmon sperm DNA (10 mg·mL<sup>-1</sup>); 2 μL Probe DNA; 10 μL Deionized formamide; 2 μL 20×SSC; 4 μL 50% Dextran sulfate。

(2) 将混合液置于80°C加热器上加热5分钟, 使其变性, 然后立即将混合液置于冰上冷却。低速离心, 使液体沉至管底。

(3) 将100 μL 70%甲酰胺滴加至载玻片上(继续2.1节第(8)步操作), 覆盖1张24 mm×32 mm的盖玻片。将载玻片放在80°C烘箱内加热2.5分钟。

(4) 快速甩动载玻片, 让盖玻片脱落后, 立即将载玻

片依次浸入预冷的乙醇(70%、95%和100%)染色杯中,浸泡5分钟。结束后晾干载玻片。

(5) 准备湿盒(如带盖的塑料盒)。在盒子底部放几张纸巾,在纸巾上放一个塑料架,并用少量双蒸水使纸巾湿润。

(6) 将20  $\mu\text{L}$ 杂交混合液滴加到每张载玻片上,覆盖1张24 mm $\times$ 32 mm盖玻片,置于湿盒中。

(7) 将湿盒放入37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育6小时以上,或者过夜。

(8) 将载玻片浸入含有2 $\times$ SSC的染色杯中,缓慢摇动染色杯,直至载玻片上的盖玻片滑落。

(9) 按照以下步骤清洗载玻片: 2 $\times$ SSC, 42 $^{\circ}\text{C}$ 10分钟; 2 $\times$ SSC, 室温5分钟; 1 $\times$ PBS, 室温5分钟。

(10) 用1 $\times$ PBS冲洗后晾干。在每张载玻片上滴加100  $\mu\text{L}$ 抗体检测液,并覆盖1张24 mm $\times$ 32 mm盖玻片。将载玻片置于湿盒中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育30分钟。

(11) 通过倾斜载玻片,或将其放入装有1 $\times$ PBS的染色杯中浸泡,即可移除盖玻片。

(12) 载玻片用1 $\times$ PBS在室温下冲洗3次。

(13) 用纸巾将载玻片吸干。加入10  $\mu\text{L}$ 含有DAPI的Vectashield溶液,并覆盖1张24 mm $\times$ 32 mm盖玻片。

(14) 将载玻片倒置于纸巾上(有盖玻片的一面朝下),轻轻按压,使黏稠的Vectashield溶液散开,尽量减少气泡产生。

(15) 用荧光显微镜检查杂交结果。FITC (fluorescein isothiocyanate)标记的探针会发出绿色荧光,罗丹明标记的探针会发出红色荧光。

## 2.3 免疫荧光染色

### 2.3.1 染色体制备

(1) 采集减数分裂期的新鲜水稻幼穗,在室温下用4% (w/v)多聚甲醛固定10–30分钟。在室温下用1 $\times$ PBS冲洗3次。

(2) 在滴加少量1 $\times$ PBS的载玻片上,解剖和挤压处于适宜减数分裂时期的花药,用盖玻片盖住花药。

(3) 将载玻片放在滤纸上,有盖玻片的一面朝下,用左右两手的两根手指按压载玻片。

(4) 将含有盖玻片的载玻片浸泡在液氮中,然后用锋利的刀片揭除盖玻片。在免疫染色之前,将载玻片插入梯度(70%、90%和100%)乙醇溶液的染色杯中,进行脱水。

### 2.3.2 免疫检测

(1) 用1 $\times$ TNB缓冲液按1:200 (v/v)比例稀释所需的一抗溶液。

(2) 将100  $\mu\text{L}$ 稀释好的抗体,加在脱水后的染色体制片上,覆盖1张24 mm $\times$ 32 mm盖玻片。将载玻片放入湿盒,在37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育2小时。

(3) 通过倾斜载玻片或将其放入装有1 $\times$ PBS的染色杯中浸泡,让盖玻片自动从载玻片上滑落。

(4) 用1 $\times$ PBS在室温下浸洗3次,每次5分钟。

(5) 用1 $\times$ TNB缓冲液按1:200 (v/v)比例稀释所需的二抗溶液。

(6) 将100  $\mu\text{L}$ 稀释好的二抗溶液滴加在载玻片上,覆盖1张24 mm $\times$ 32 mm盖玻片。将载玻片放入湿盒,在37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育0.5小时。

(7) 按照前述步骤(3)的方法,去除盖玻片。

(8) 用1 $\times$ PBS在室温下浸洗3次,每次5分钟。

(9) 用含有DAPI的Vectashield溶液对染色体进行复染,再覆盖1张24 mm $\times$ 32 mm盖玻片。

(10) 将载玻片(有盖玻片的一面朝下)放在纸巾上,让黏稠的Vectashield溶液散开,尽量减少气泡产生。

(11) 在荧光显微镜下检查免疫荧光染色结果。

## 3 注意事项

(1) 为节约使用地高辛标记的dUTP或生物素标记的dUTP,将0.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  dTTP和0.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 地高辛标记的dUTP或生物素标记的dUTP按2:1的体积比进行混合,从而节省三分之二不同标记的dUTP。

(2) 根据形态特征来判断水稻幼穗中花药所处的减数分裂时期。通常在减数分裂期,幼穗长约5–10 cm,剑叶与倒二叶叶鞘连接处的跨度在 $\pm 3$  cm左右。

(3) 总体而言,稻穗上部颖花比下部颖花发育早。但是在特定枝梗上,最上面的颖花发育最早,而第2朵颖花发育最迟。例如,如果一个枝梗上有5朵颖花,编号1是最上面的颖花,编号5是最下面的颖花,颖花发育的先后顺序将是1、5、4、3、2。而对于只有3朵颖花的枝梗,颖花发育先后顺序将是1、3、2。

(4) 如果仅使用相差显微镜对染色体进行观察,则应将微量的 $\text{FeCl}_3$ 添加到卡诺固定液中,并将微量的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 添加到1%醋酸洋红溶液中。添加铁离子可促进异染色质与常染色质的分化,特别是粗线期染色

体。

(5) 如果此步骤耗时太长, 可能会导致染色过度。

(6) 如果所制染色体涂片用于荧光原位杂交分析, 步骤(9)–(11)应被省略。而用于荧光原位杂交的涂片, 可在系列乙醇脱水之前, 在4%多聚甲醛溶液中浸泡5分钟, 进行二次固定。

(7) 最终获得合适长度的Nick-translation标记产物, 是探针标记实验的最关键步骤。当标记探针长度在200–600 bp时, 能获得最佳的原位杂交结果。由于DNase I在储存过程中会逐渐失去活性, 因此每次实验前需要确定DNase I的最佳剂量, 以获得所需的探针片段大小。

## 参考文献

- Arumuganathan K, Earle ED (1991). Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol Biol Rep* **9**, 229–241.
- Che L, Tang D, Wang K, Wang M, Zhu K, Yu H, Gu M, Cheng Z (2011). OsAM1 is required for leptotene transition in rice. *Cell Res* **21**, 654–665.
- Cheng Z, Buell CR, Wing RA, Gu M, Jiang J (2001a). Toward a cytological characterization of the rice genome. *Genome Res* **11**, 2133–2141.
- Cheng Z, Dong F, Langdon T, Ouyang S, Buell CR, Gu M, Blattner FR, Jiang J (2002). Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon. *Plant Cell* **14**, 1691–1704.
- Cheng Z, Stupar RM, Gu M, Jiang J (2001b). 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* **110**, 24–31.
- Goff SA (1999). Rice as a model for cereal genomics. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 86–89.
- Ji JH, Tang D, Shen Y, Xue ZH, Wang HJ, Shi WQ, Zhang C, Du GJ, Li YF, Cheng ZK (2016). P31<sup>comet</sup>, a member of the synaptonemal complex, participates in meiotic DSB formation in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, 10577–10582.
- Kurata N, Omura T, Iwata N (1981). Studies on centromere, chromomere and nucleolus in pachytene nuclei of rice, *Oryza sativa*, microsporocytes. *Cytologia* **46**, 791–800.
- Li X, Chao D, Wu Y, Huang X, Chen K, Cui L, Su L, Ye W, Chen H, Chen H, Dong N, Guo T, Shi M, Feng Q, Zhang P, Han B, Shan J, Gao J, Lin H (2015). Natural alleles of a proteasome  $\alpha 2$  subunit gene contribute to thermo-tolerance and adaptation of African rice. *Nat Genet* **47**, 827–833.
- Li YF, Qin BX, Shen Y, Zhang FF, Liu CZ, You HL, Du GJ, Tang D, Cheng ZK (2018). HEIP1 regulates crossover formation during meiosis in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**, 10810–10815.
- Luo Q, Li YF, Shen Y, Cheng ZK (2014). Ten years of gene discovery for meiotic event control in rice. *J Genet Genomics* **41**, 125–137.
- Ma Y, Dai X, Xu Y, Luo W, Zheng X, Zeng D, Pan Y, Lin X, Liu H, Zhang D, Xiao J, Guo X, Xu S, Niu Y, Jin J, Zhang H, Xu X, Li L, Wang W, Qian Q, Ge S, Chong K (2015). *COLD1* confers chilling tolerance in rice. *Cell* **160**, 1209–1221.
- Miao CB, Tang D, Zhang HG, Wang M, Li YF, Tang SZ, Yu HX, Gu MH, Cheng ZK (2013). CENTRAL REGION COMPONENT 1, a novel synaptonemal complex component, is essential for meiotic recombination initiation in rice. *Plant Cell* **25**, 2998–3009.
- Nonomura K, Morohoshi A, Nakano M, Eiguchi M, Miyao A, Hirochika H, Kurata N (2007). A germ cell specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. *Plant Cell* **19**, 2583–2594.
- Pawlowski WP, Golubovskaya IN, Timofejeva L, Meeley RB, Sheridan WF, Cande WZ (2004). Coordination of meiotic recombination, pairing, and synapsis by PHS1. *Science* **303**, 89–92.
- Ren LJ, Tang D, Zhao TT, Zhang FF, Liu CZ, Xue ZH, Shi WQ, Du GJ, Shen Y, Li YF, Cheng ZK (2018). OsSPL regulates meiotic fate acquisition in rice. *New Phytol* **218**, 789–803.
- Tang X, Bao W, Zhang W, Cheng Z (2007). Identification of chromosomes from multiple rice genomes using a universal molecular cytogenetic marker system. *J Integr Plant Biol* **49**, 953–960.
- Wang K, Tang D, Wang M, Lu J, Yu H, Liu J, Qian B, Gong Z, Wang X, Chen J, Gu M, Cheng Z (2009). MER3 is required for normal meiotic crossover formation, but not for presynaptic alignment in rice. *J Cell Sci* **122**, 2055–2063.
- Wang M, Wang K, Tang D, Wei C, Li M, Shen Y, Chi Z, Gu M, Cheng Z (2010). The central element protein ZEP1 of the synaptonemal complex regulates the number of crossovers during meiosis in rice. *Plant Cell* **22**, 417–430.
- Wang Y, Xiong G, Hu J, Jiang L, Yu H, Xu J, Fang Y, Zeng

- L, Xu E, Xu J, Ye W, Meng X, Liu R, Chen H, Jing Y, Wang Y, Zhu X, Li J, Qian Q (2015). Copy number variation at the *GL7* locus contributes to grain size diversity in rice. *Nat Genet* **47**, 944–948.
- Wu HK (1967). Note on preparing of pachytene chromosomes by double mordant. *Sci Agric* **15**, 40–44.
- Yu H, Wang M, Tang D, Wang K, Chen F, Gong Z, Gu M, Cheng Z (2010). OsSPO11-1 is essential for both homologous chromosome pairing and crossover formation in rice. *Chromosoma* **119**, 625–636.
- Zhang F, Tang D, Shen Y, Xue ZH, Shi WQ, Ren LJ, Du GJ, Li Y, Cheng ZK (2017). The F-box protein ZYGO1 mediates bouquet formation to promote homologous pairing, synapsis, and recombination in rice meiosis. *Plant Cell* **29**, 2597–2609.
- Zhao TT, Ren LJ, Chen XJ, Yu HX, Liu CJ, Shen Y, Shi WQ, Tang D, Du GJ, Li YF, Ma BJ, Cheng ZK (2018). The OsRR24/LEPTO1 type-B response regulator is essential for the organization of leptotene chromosomes in rice meiosis. *Plant Cell* **30**, 3024–3037.

## Protocols for Analyzing Rice Meiotic Chromosomes

Xinjie Cheng<sup>1</sup>, Hengxiu Yu<sup>1</sup>, Zhukuan Cheng<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Agriculture College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; <sup>2</sup> Center for Plant Gene Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract** The development of techniques to analyze pachytene chromosomes has greatly overcome most of the difficulties in cytological studies of rice chromosomes caused by their small size. Visualization of meiotic chromosomes has now become routine in cytogenetic studies of this species. This chapter provides protocols on basic meiotic chromosome preparation, FISH analysis and immunocytology in rice.

**Key words** rice, meiosis, chromosome, FISH, immunostaining

Cheng XJ, Yu HX, Cheng ZK (2019). Protocols for analyzing rice meiotic chromosomes. *Chin Bull Bot* **54**, 503–508.

---

\* Author for correspondence. E-mail: zkcheng@genetics.ac.cn

(责任编辑: 白羽红)