

谢文娟, 黄江, 马小军. 45S 和 5S rDNA 序列在 20 种葫芦科植物染色体上的定位 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(6): 74-81.
XIE Wenjuan, HUANG Jiang, MA Xiaojun. Localization of 45S and 5S rDNA sequences on chromosomes of 20 species of Cucurbitaceous plants[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(6): 74-81.

45S 和 5S rDNA 序列在 20 种葫芦科植物染色体上的定位

谢文娟^{1,2}, 黄江³, 马小军⁴

(1 广西大学 农学院, 广西南宁 530004; 2 桂林医学院 药学院, 广西 桂林 541001;
3 桂林医学院 生物技术学院, 广西 桂林 541001; 4 中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100193)

摘要:【目的】了解 45S 和 5S rDNA 序列在 20 种葫芦科 Cucurbitaceae 植物基因组中位点数目和分布特点, 为研究葫芦科植物核型、遗传育种和进化分类等提供依据。【方法】采用改进的荧光原位杂交 (FISH) 法, 在 45S rDNA 和 5S rDNA 的 5'端进行荧光修饰, 对 20 种葫芦科植物中期染色体进行 45S 和 5S rDNA 的物理定位, 在 Nikon 80i 荧光显微镜下观察, 冷 CCD 收集图像并分析。【结果】确定了金瓜 *Gymnopetalum chinense*、波棱瓜 *Herpetospermum pedunculosum*、葫芦 *Lagenaria siceraria*、木鳖子 *Momordica cochinchinensis*、云南木鳖 *Momordica dioica*、西葫芦 *Cucurbita pepo*、蛇瓜 *Trichosanthes anguina*、糙点栝楼 *Trichosanthes dunniana*、全缘栝楼 *Trichosanthes ovigera*、钮子瓜 *Zehneria maysorensis*、红瓜 *Coccinia grandis* 和佛手 *Sechium edule* 等 12 种植物 45S rDNA 和 5S rDNA 荧光位点在中期染色体上的数量、位置和特征, 在这些植物中分别检测到 3、7、2、4、2、5、3、3、5、1、2 和 2 对 45S rDNA, 检测到 2、1、1、1、1、2、1、1、1、1、1 和 1 对 5S rDNA。20 种植物中, 45S rDNA 和 5S rDNA 在染色体短臂、短臂顶端和着丝点等位置均有分布。【结论】FISH 是葫芦科植物构建精细核型的有效工具, 可帮助判断随体、鉴别染色体和鉴定同源染色体, 是核型分析的有力佐证。

关键词: 荧光原位杂交; 葫芦科; 45S rDNA; 5S rDNA; 中期染色体
中图分类号: Q37; S642 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2019)06-0074-08

Localization of 45S and 5S rDNA sequences on chromosomes of 20 species of Cucurbitaceous plants

XIE Wenjuan^{1,2}, HUANG Jiang³, MA Xiaojun⁴

(1 College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China;
2 College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541001, China;
3 College of Biotechnology, Guilin Medical University, Guilin 541001, China;
4 Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Objective】To study the number and distribution characteristics of 45S and 5S rDNA sequences in the genome of 20 species of Cucurbitaceae plants, and provide a basis for studying the karyotype, genetic breeding and evolutionary classification of Cucurbitaceae plants. 【Method】Using improved fluorescence in situ hybridization (FISH) method, the 45S and 5S rDNA probe sequences were modified by fluorescence at the 5' ends, and the physical locations of 45S and 5S rDNA in the metaphase chromosomes of 20 species of Cucurbitaceae plants were determined. The chromosomes were observed under the Nikon 80i fluorescence microscope, and

images were collected by cold CCD and then were analyzed. 【Result】 Numbers, locations and characteristics of 45S rDNA and 5S rDNA fluorescence sites on the metaphase chromosomes of 12 plants including *Gymnopetalum chinense*, *Herpetospermum pedunculatum*, *Lagenaria siceraria*, *Momordica cochinchinensis*, *Momordica dioica*, *Cucurbita pepo*, *Trichosanthes anguina*, *Trichosanthes dunniana*, *Trichosanthes ovigera*, *Zehneria maysorensis*, *Coccinia grandis* and *Sechium edule* were defined. We detected 3, 7, 2, 4, 2, 5, 3, 3, 5, 1, 2 and 2 pairs of 45S rDNA from these 12 plants respectively, and detected 2, 1, 1, 1, 1, 2, 1, 1, 1, 1 and 1 pairs of 5S rDNA respectively. The 45S rDNA and 5S rDNA of 20 plants were found to be located on short arms of chromosomes, terminal ends of short arms or centromeres. 【Conclusion】 FISH is an effective tool for building fine karyotypes of Cucurbitaceae plants. It can help to analyze the random body, differentiate chromosome and identify homologous chromosomes, and therefore provides strong evidence for karyotype analysis.

Key words: fluorescence in situ hybridization; Cucurbitaceae; 45S rDNA; 5S rDNA; metaphase chromosome

荧光原位杂交技术 (Fluorescence in situ hybridization, FISH) 是 20 世纪 80 年代发展起来的非放射性原位杂交技术, 其原理是将 DNA 序列用 digoxigenin-11-dUTP 等非放射性标记物制备成探针, 与染色体标本杂交, 将探针直接定位到染色体上^[1-2]。多色荧光原位杂交技术在 FISH 的基础上发展, 建立于 1996 年, 可通过一次杂交同时鉴定多个探针位点, 具有安全、简便、灵敏度高等优点。

rDNA 是成簇分布于 1 个或数个位点、拷贝数为 500~40 000 的重复序列, 是植物基因组中研究最多的遗传单位, 它在染色体上的物理定位可为核型分析提供稳定有效的染色体标记, 是构建染色体分子核型以及研究基因组结构、功能和进化的重要手段^[3]。rDNA 已经在许多重要的模式作物和经济作物的基因组中进行了广泛的物理定位, 为物种染色体识别、基因组结构分析、物理图谱构建及物种亲缘关系研究提供了重要的信息^[4-8]。

葫芦科 Cucurbitaceae 植物具有重要的经济价值, 包括许多重要的蔬菜瓜果、药用植物和观赏植物。该科植物染色体多数为中小染色体, 且不易染色, 依靠传统的核型分析手段, 从外形和长度难以区分染色体。荧光原位杂交等技术可在小染色体上标记可识别的信号, 更好地区分染色体, 是研究中小染色体的良好手段^[9]。国内有关葫芦科植物分子细胞遗传学研究工作开展得较少, 只有少量报道^[10-12]。大部分葫芦科植物在分子细胞遗传学领域的研究, 至今仍是空白。

研究采用改进的 rDNA 双色荧光原位杂交法, 在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 45S rDNA 和 5S rDNA 的 5'端进行荧光修饰, 对 20 种葫芦科植

物中期染色体进行 45S、5S rDNA 的物理定位, 了解 rDNA 序列在这些植物上的信号位点的数目和分布模式, 积累该类群植物分化过程中染色体形态变化的分子遗传学资料, 为研究葫芦科植物核型、遗传育种、进化分类等分析提供更为准确的理论数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以 20 种葫芦科植物为试验材料, 这些植物包括冬瓜 *Benincasa hispida*、西瓜 *Citrullus lanatus*、甜瓜 *Cucumis melo*、金瓜 *Gymnopetalum chinense*、波棱瓜 *Herpetospermum pedunculatum*、葫芦 *Lagenaria siceraria*、丝瓜 *Luffa cylindrica*、苦瓜 *Momordica charantia*、木鳖子 *Momordica cochinchinensis*、云南木鳖 *Momordica dioica*、西葫芦 *Cucurbita pepo*、南瓜 *Cucurbita moschata*、蛇瓜 *Trichosanthes anguina*、瓜叶栝楼 *Trichosanthes cucumerina*、糙点栝楼 *Trichosanthes dunniana*、全缘栝楼 *Trichosanthes ovigera*、罗汉果 *Siraitia grosvenorii*、钮子瓜 *Zehneria maysorensis*、红瓜 *Coccinia grandis* 和佛手瓜 *Sechium edule*。植物材料经中国科学院药用植物研究所云南分所李海涛副研究员鉴定。植物分类名称参照《中国植物志》^[13]。凭证标本和染色体标本保存于南开大学生命科学学院染色体实验室。

1.2 荧光原位杂交 (FISH)

1.2.1 染色体标本制备和预处理 采用陈瑞阳等^[14]的去壁低渗法制备染色体标本。标本预处理包括以下步骤: 1) 标记, 在荧光显微镜下标记分裂相的坐标, 在载玻片背面用玻璃刀标记出分裂相的位置;

2) 褪色, 将染色体片子浸泡到体积分数为 45% 的冰乙酸溶液中 5 min, 空气干燥; 3) 固定, 滴加质量分数为 4% 的多聚甲醛溶液, 静置 10 min, 空气干燥; 4) 变性, 滴加 10 μ L 体积分数为 70% 的去离子甲酰胺溶液, 70 $^{\circ}$ C 处理 2 min; 5) 干燥, 甩掉盖片, 依次用-20 $^{\circ}$ C 的体积分数为 70%、85% 和 100% 的乙醇溶液梯度脱水, 每次 4 min, 空气干燥。

1.2.2 探针合成和制备 从拟南芥 5S rDNA 和 45S rDNA 序列中选取一段重复序列, 由上海生工生物公司合成探针, 在 5'端标记荧光信号, 5S rDNA 标记 TAMRA 红色荧光, 45S rDNA 标记 FAM 绿色荧光。

1.2.3 染色体荧光原位杂交过程 1) 杂交: 取 2 $\times$ SSC 溶液、5S 和 45S 探针配制成 5 ng/ μ L 的混合探针, 在标本滴加 7 μ L 的 5S 和 45S 混合探针, 盖上 18 mm $\times$ 18 mm 的盖玻片, 放入湿盒, 在 37 $^{\circ}$ C 杂交箱中黑暗杂交 1 h 以上。

2) 洗脱: 在 Tween-20 体积分数为 0.2% 的 4 $\times$ SSC 溶液中黑暗洗涤 10 min; 清水冲洗, 黑暗中空气干燥。

3) 信号检测: 每处滴加含有 DAPI 的防荧光淬灭剂 5 μ L, 盖上盖玻片, 在荧光显微镜下观察并拍照。在荧光显微镜下, 蓝色的分裂相在紫外光激发下观察, 红色的 5S 杂交信号在绿色光激发下观察, 绿色的 45S 荧光信号在蓝色光激发下观察。

4) 图像采集和处理: 在 Nikon 80i 荧光显微镜下观察, 冷 CCD 拍照。用 Spot 4.1 软件进行图像合成, 用 Adobe Photoshop CS6 软件调整图像, 将染色体分割, 再将图片导入 Karyotype 核型分析软件, 对染色体进行配对, 测量染色体相对长度、着丝点位置、长短臂比值, 根据相对长度对染色体进行排序编号后输出核型图。

1.2.4 ITS2 序列扩增、回收、测序 提取瓜叶栝楼基因组 DNA 为模板, 扩增 ITS2 序列, 引物为通用引物, 正向引物: 5'-GCGATACTTGGTGTGAAT-3', 反向引物: 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'。反应体系 (50 μ L): 10 $\times$ PCR buffer 5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 引物-F 和引物-R 各 2 μ L, dNTPs 1 μ L, *Taq* 酶 0.4 μ L, 超纯水 37.6 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 循环 40 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。反应在 Eppendorf 50-60 HZ PCR 扩增仪 (德国 Eppendorf 公司) 上进行, 在 Syngene DYV6-EE 凝胶成像分析系统 (英国 Syngene 公司) 下观察、拍照。将扩增到

的 PCR 产物用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 试剂盒回收, 回收的 ITS2 片段与全式金克隆载体 Peasy Blunt Zero 连接, 转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* 感受态, 挑取单克隆, 送上海生工生物公司测序。

2 结果与分析

2.1 葫芦科植物 45S 和 5S rDNA 荧光原位杂交信号的位点数目

除瓜叶栝楼外, 45S rDNA 杂交信号数目为 1~7 对不等, 钮子瓜 45S rDNA 杂交信号 1 对, 冬瓜、西瓜、甜瓜、葫芦、丝瓜、苦瓜、云南木鳖子、红瓜、佛手瓜 45S rDNA 杂交信号 2 对, 金瓜、蛇瓜、糙点栝楼、罗汉果为 3 对, 木鳖子、南瓜为 4 对, 西葫芦、全缘栝楼为 5 对, 波棱瓜为 7 对。与 45S rDNA 杂交位信号相比, 5S rDNA 杂交信号位点数目较少, 为 1~2 对, 除金瓜、西葫芦、南瓜为 2 对杂交信号外, 其余 17 种植物均为 1 对杂交信号。

金瓜、波棱瓜、葫芦、木鳖子、云南木鳖、西葫芦、蛇瓜、糙点栝楼、全缘栝楼、钮子瓜、红瓜、佛手瓜等 12 种植物的 45S rDNA 和 5S rDNA 荧光原位杂交结果为新记录。瓜叶栝楼未检测到 45S rDNA 杂交信号, 需进一步试验检测。

2.2 瓜叶栝楼 ITS2 序列扩增结果

瓜叶栝楼仅检测到 1 对 5S rDNA 荧光位点, 未检测到 45S rDNA 杂交位点, 为进一步验证, 用瓜叶栝楼基因组 DNA 为模板扩增 ITS2 序列, 测序结果如下: CGCATCGCTGCCCCCACGCAACCCCCCTTCGGGTTGGTTGCGCAGGTGCGGGCACACGCTGGCCTCCCGTGCGCACCGTCGTGCGGATGGCTTAAATTCGAGTCCTCGGCGCCTGTCGTCGCGACACTACGGTGGTTGATCCAACCTCGGTACCGCGTCGCGACCTCAGTCCGCGCAACTCCTCCCCGCGAGCGAGCGAGGACTTCTATGTCGACCCTCTGAACGTCGTCCCCAAAGACGATGCTCTCGACG。此序列此前未曾在 GenBank 登记, 为新记录。ITS2 序列是 45S rDNA 的内转录间隔区, 其成功扩增说明 45S rDNA 在瓜叶栝楼中是存在的。

2.3 葫芦科植物 45S 和 5S rDNA 荧光杂交信号在染色体上的分布情况

葫芦科植物多为中小染色体, 荧光杂交信号的位置难以精确测量, 故将荧光杂交信号分布的位置大致分为短臂顶端、短臂/长臂、着丝点等部位来区分。20 种植物中, 45S 和 5S rDNA 在染色体短臂、

短臂顶端、着丝点等位置均有分布,分布在臂上的荧光杂交信号都位于短臂上。为叙述方便,将 20 种植物按染色体基数分组进行荧光杂交结果的分析。

2.3.1 染色体基数为 10 的葫芦科植物 由图 1 可知,波棱瓜、糙点栝楼、南瓜和西葫芦的染色体数分别为 20、20、40 和 40 条,染色体基数为 10。

波棱瓜(图 1a) 检出 45S rDNA 杂交信号 7 对,分别位于 2、3、5、7、8、9、10 号染色体,其中 2 号染色体的荧光信号位于短臂顶端,3、7、10 号染色体杂交信号在短臂上,5、8、9 号染色体的杂交信号在着丝点上;检出 5S rDNA 荧光信号 1 对,位于 2 号染色体短臂顶端。2 号染色体兼有 45S rDNA 和 5S rDNA 荧光信号,且都分布在染色体短臂顶端。

糙点栝楼(图 1b) 检出 45S rDNA 杂交信号 3 对,分别位于 7、8、10 号染色体上,均分布在短臂顶端;检出 5S rDNA 荧光信号 1 对,位于 7 号染色体短臂顶端。7 号染色体同时具有 45S rDNA 和 5S rDNA 荧光杂交信号,且都分布在短臂顶端。

南瓜(图 1c) 检出 45S rDNA 荧光信号 4 对,分别位于 2、5、8、9 号染色体短臂;检出 5S rDNA 2 对,分别位于 1、3 号染色体短臂。

西葫芦(图 1d) 检出 5 对 45S rDNA 荧光信号,分布位于 2、3、4、7、16 号染色体,其中,2、3、7、16 号染色体的荧光位点位于短臂上,4 号染色体的荧光位点在着丝点;检出 5S rDNA 杂交信号 2 对,分别位于 1 号染色体短臂和 11 号染色体短臂顶端。

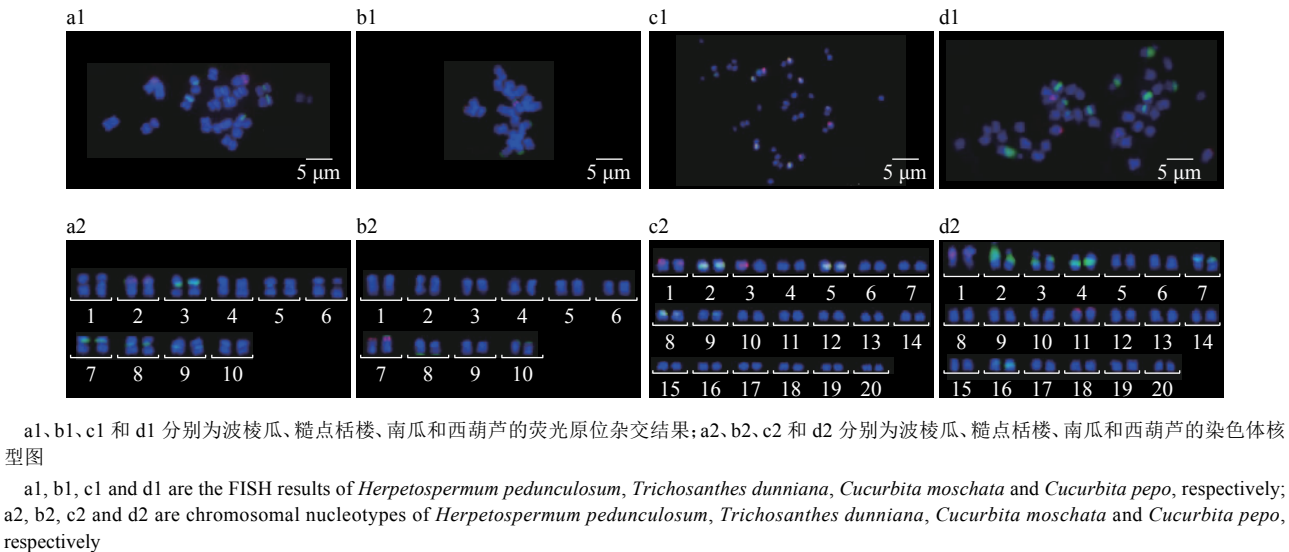


图 1 染色体基数为 10 的 4 种葫芦科植物 45S 和 5S rDNA 荧光原位杂交结果

Fig. 1 45S and 5S rDNA FISH results of four Cucurbitaceae plants with the basic chromosome number of 10

2.3.2 染色体基数为 11 的葫芦科植物 由图 2 可知,西瓜、金瓜、葫芦、苦瓜、蛇瓜、瓜叶栝楼和全缘栝楼的染色体数目均为 22 条,染色体基数为 11。

西瓜(图 2a) 检出 2 对 45S rDNA 信号,分别位于 3、10 号染色体短臂顶端;检出 1 对 5S rDNA,位于 10 号染色体短臂顶端。10 号染色体同时具有 45S rDNA、5S rDNA 荧光位点,均位于染色体短臂顶端。

金瓜(图 2b) 检出 3 对 45S rDNA 杂交信号,分别位于 5、9、10 号染色体上,且都分布在染色体短臂顶端;检出 2 对 5S rDNA 杂交信号,分别位于 8、9 号染色体,荧光位点分布在 8 号染色体的短臂和 9 号染色体短臂顶端。9 号染色体短臂顶端同时具有 45S rDNA、5S rDNA 杂交信号。

葫芦(图 2c) 检出 45S rDNA 杂交信号 2 对,位于 1、10 号染色体短臂顶端;检出 1 对 5S rDNA 杂交信号,位于 1 号染色体短臂顶端。1 号染色体短

臂顶端同时具有 45S rDNA、5S rDNA 杂交信号。

苦瓜(图 2d) 检出 45S rDNA 杂交信号 2 对,位于 8、9 号染色体短臂顶端;检出 5S rDNA 杂交信号 1 对,位于 11 号染色体短臂。

蛇瓜(图 2e) 检出 45S rDNA 杂交信号 3 对,分别位于 7、9、10 号染色体短臂顶端;检出 1 对 5S rDNA 杂交信号,位于 10 号染色体短臂顶端。10 号染色体短臂顶端同时具有 45S rDNA、5S rDNA 杂交信号。

瓜叶栝楼(图 2f) 检出 5S rDNA 信号 1 对,信号特别强烈,位于 6 号染色体短臂靠近着丝点处;未检出 45S rDNA 杂交信号,有待进一步试验检测。

全缘栝楼(图 2g) 检出 45S rDNA 杂交信号 5 对,分别位于 6、8、9、10、11 号染色体短臂顶端;检出 5S rDNA 杂交信号 1 对,位于 10 号染色体短臂顶端。10 号染色体短臂顶端同时具有 45S rDNA、5S rDNA 杂交信号。

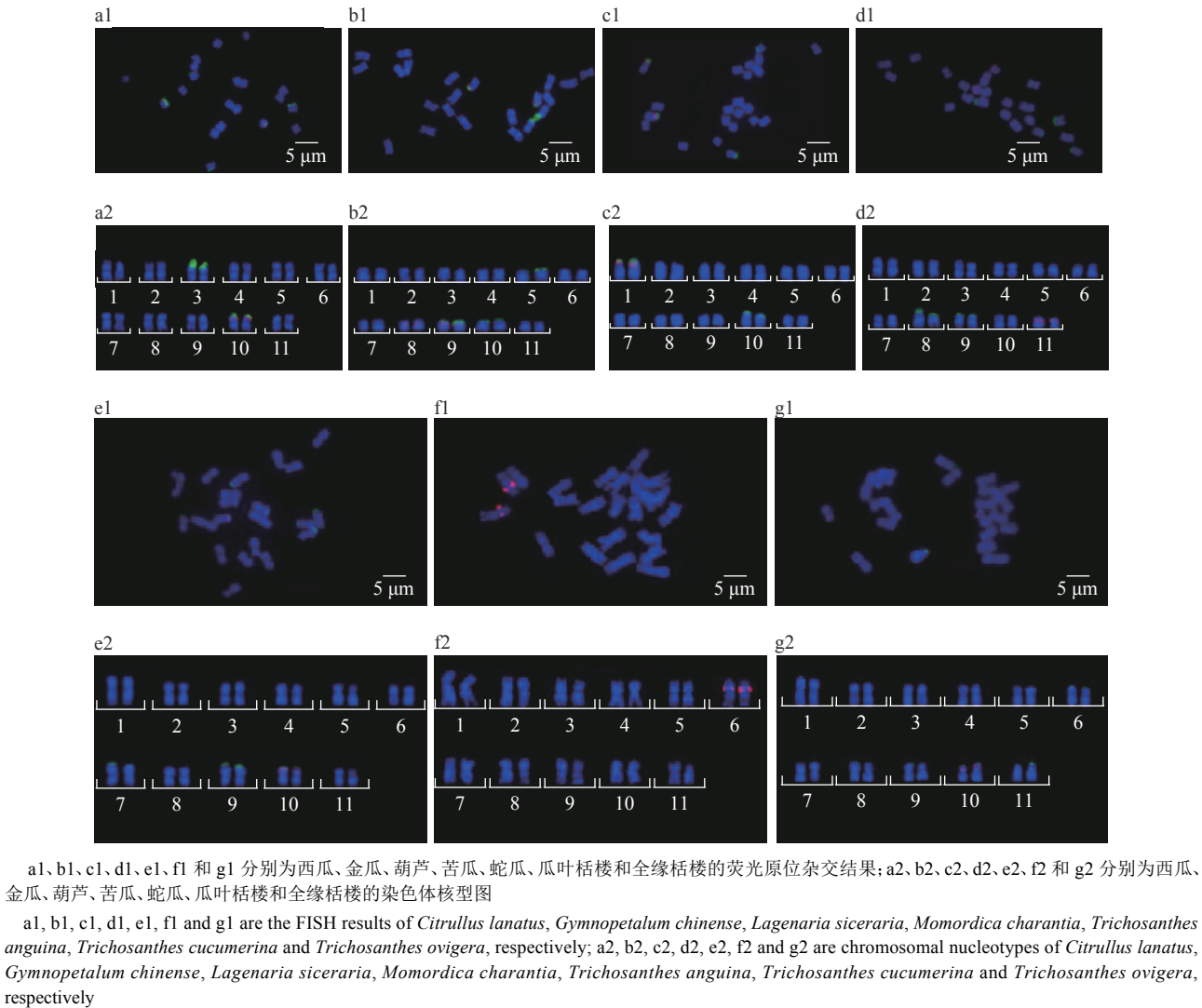


图 2 染色体基数为 11 的 7 种葫芦科植物 45S 和 5S rDNA 荧光原位杂交结果

Fig. 2 45S and 5S rDNA FISH results of seven Cucurbitaceae plants with the basic chromosome number of 11

2.3.3 染色体基数为 12 的葫芦科植物 由图 3 可知, 冬瓜、甜瓜、云南木鳖、钮子瓜和红瓜的染色体数目均为 24 条, 染色体基数为 12。

冬瓜 (图 3a) 检出 2 对 45S rDNA 杂交信号, 分别位于 3 号、8 号染色体短臂顶端; 检出 1 对 5S rDNA 信号, 位于 8 号染色体短臂顶端。8 号染色体短臂顶端同时具有 45S rDNA、5S rDNA 杂交信号。

甜瓜 (图 3b) 检出 45S rDNA 杂交信号 2 对, 位于 1、2 号染色体短臂顶端; 检出 1 对 5S rDNA 信号, 位于 7 号染色体短臂顶端。

云南木鳖 (图 3c) 检出 45S rDNA 杂交信号 2 对, 位于 2、5 号染色体短臂顶端; 检出 5S rDNA 信号 1 对, 位于 2 号染色体着丝点处。2 号染色体同时具有 45S rDNA 和 5S rDNA 杂交信号。

钮子瓜 (图 3d) 检出 45SrDNA 信号 1 对, 位于 10 号染色体短臂顶端; 检出 5SrDNA 信号 1 对, 位于 9 号染色体短臂顶端。

红瓜 (图 3e) 检出 45S rDNA 杂交信号 2 对, 位于 3、4 号染色体短臂顶端; 检出 5S rDNA 信号 1 对, 位于 4 号染色体短臂顶端。4 号染色体短臂顶端同时具有 45S rDNA、5S rDNA 杂交信号。

2.3.4 染色体基数为 13 或 14 的葫芦科植物 由图 4 可知, 丝瓜的染色体数目为 26 条, 染色体基数为 13。木鳖子、罗汉果和佛手瓜的染色体数目为 28 条, 染色体基数为 14。

丝瓜 (图 4a) 检出 45S rDNA 杂交信号 2 对, 位于 1、10 号染色体短臂顶端; 检出 5S rDNA 杂交信号 1 对, 位于 9 号染色体短臂。

木鳖子 (图 4b) 检出 45S rDNA 信号 4 对, 分别位于 7、8、9、10 号染色体短臂顶端; 检出 5S rDNA 染色体 1 对, 位于 14 号染色体着丝点处。

罗汉果 (图 4c) 检出 45SrDNA 信号 3 对, 分别位于 3、5、6 号染色体短臂顶端; 检出 5S rDNA 信号 1 对, 位于 12 号染色体短臂。

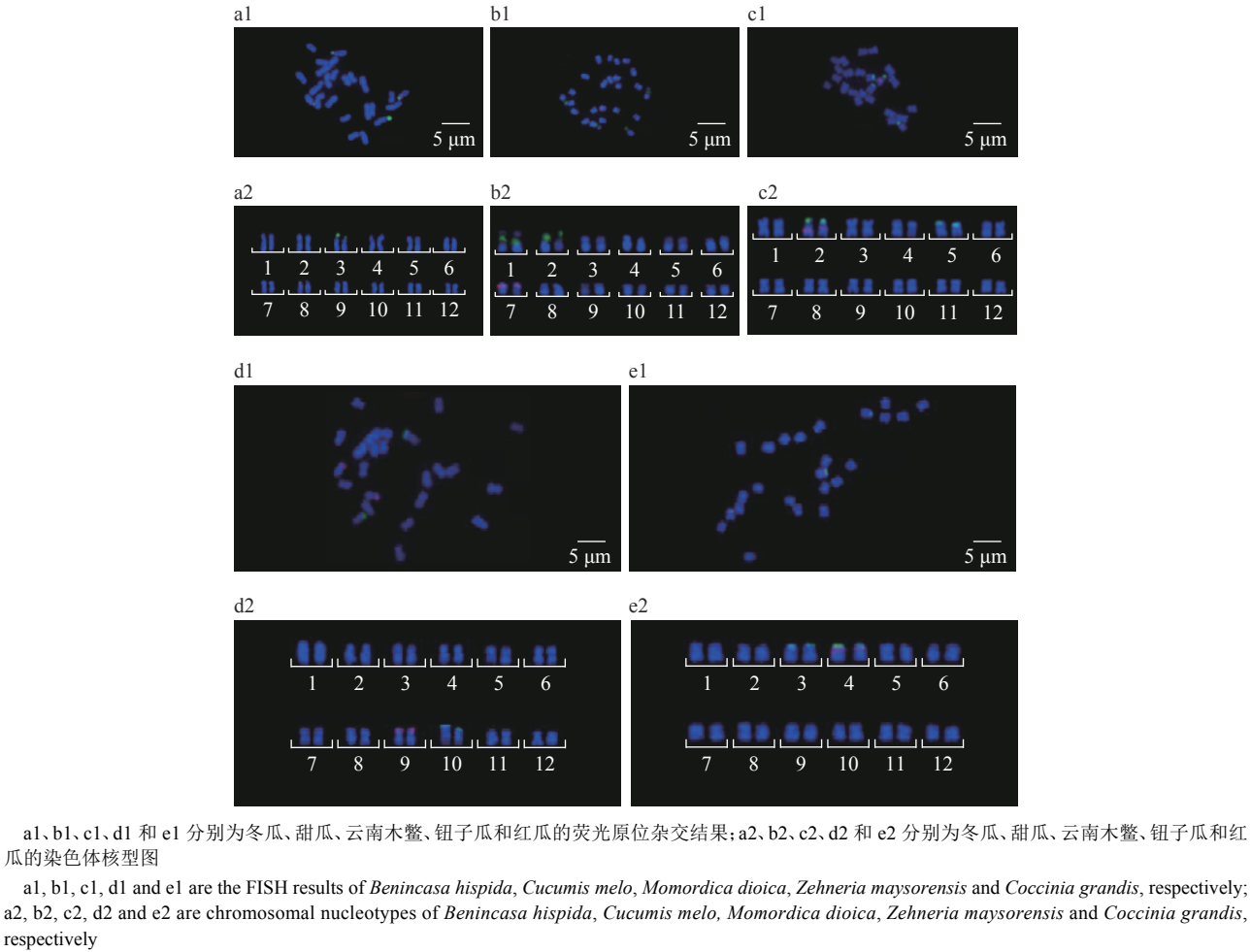


图 3 染色体基数为 12 的 4 种葫芦科植物 45S 和 5S rDNA 荧光原位杂交结果

Fig. 3 45S and 5S rDNA FISH results of four Cucurbitaceae plants with the basic chromosome number of 12

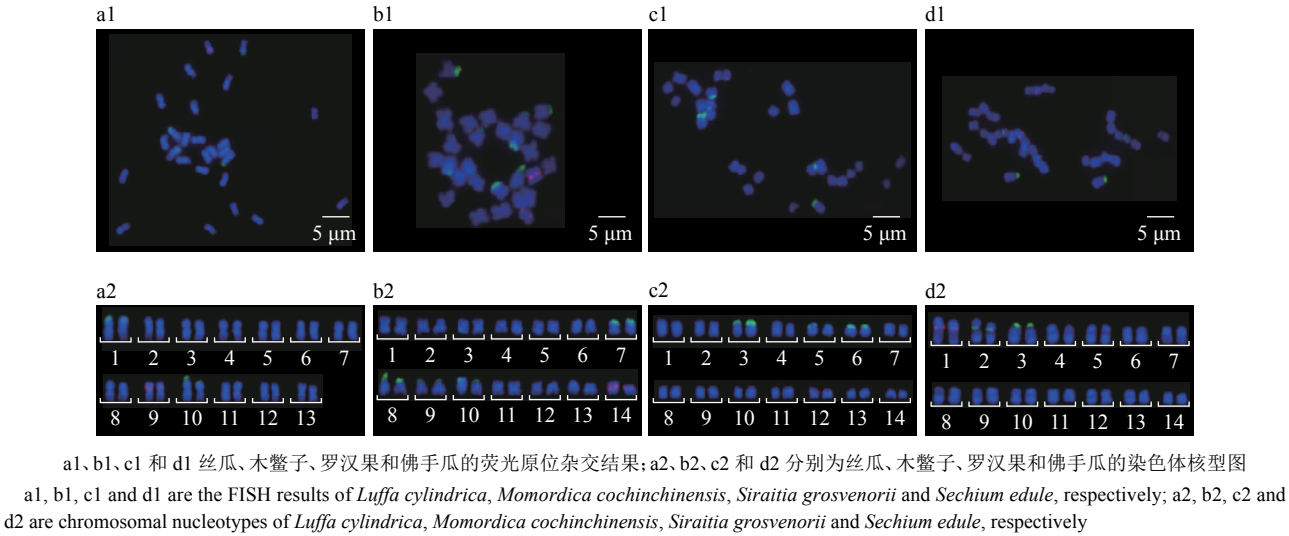


图 4 染色体基数为 13 或 14 的 4 种葫芦科植物 45S 和 5S rDNA 荧光原位杂交结果

Fig. 4 45S and 5S rDNA FISH results of four Cucurbitaceae plants with the basic chromosome number of 13 or 14

佛手瓜 (图 4d) 检出 45S rDNA 信号 2 对, 分别位于 2 号染色体短臂和 3 号染色体短臂顶端; 检出 5S rDNA 信号 1 对, 位于 1 号染色体短臂。

3 讨论与结论

冬瓜、西瓜、甜瓜、南瓜、丝瓜、苦瓜、罗汉果等 7 种植物 45S rDNA 和 5S rDNA 荧光原位杂交国内

已有报道^[10-11]。试验结果表明, 苦瓜检出 2 对 45S rDNA 信号 2 对, 1 对 5S rDNA、罗汉果检出 45S rDNA 信号 3 对, 5S rDNA 信号 1 对, 试验结果和李琦等^[10]报道的一致。冬瓜检出 45S rDNA 荧光信号 2 对, 5S rDNA 信号 1 对, 与徐延浩等^[11]的研究结果一致。西瓜检出 2 对 45S rDNA 位点信号, 1 对 5S rDNA 位点信号, 其中 1 对 45S rDNA 和 1 对 5S rDNA 位点位于同一对染色体上, 试验结果与李琦等^[10]的报道不一致。李琦等^[10]用 45S rDNA 和 5S rDNA 探针杂交西瓜, 观察到 2 对 45S rDNA 信号, 1 对 5S rDNA 信号, 但 45S rDNA 信号和 5S rDNA 信号不在同一对染色体上。甜瓜检出 45S rDNA 信号 2 对, 5S rDNA 信号 1 对; 丝瓜检出 45S rDNA 信号 2 对, 5S rDNA 信号 1 对; 南瓜检出 45S rDNA 信号 4 对, 检出 5S rDNA 信号 2 对。试验结果和徐延浩等^[11]报道的甜瓜有 1 对 45S rDNA 杂交信号、没有 5S rDNA 杂交信号; 丝瓜有 5 对 45S rDNA 信号、1 对 5S rDNA 信号; 南瓜有 5 对 45S rDNA 信号、2 对 5S rDNA 信号的结果不一致。试验结果的差异和试验材料的品种有关系, 也与杂交过程的操作、rDNA 在基因组中的大小有关系, 有待于进一步试验验证。

瓜叶栝楼原位杂交试验检测到 1 对 5S rDNA 杂交信号, 没有检测到 45S rDNA 杂交信号。由于瓜叶栝楼的种子很难再获得, 尚未能再进行荧光原位杂交的重复试验。为进一步检验, 作者以瓜叶栝楼基因组 DNA 为模板, 通用引物为引物扩增瓜叶栝楼的 ITS2 序列并测序成功。ITS2 是 45SrDNA 的内转录间隔区, 是 rDNA 序列的一部分, ITS2 的扩增成功说明 45S rDNA 是存在的。荧光原位杂交试验未能检测到 45S rDNA 杂交信号是因为试验操作导致试验结果的偏差。

在核型分析中, 次缢痕、核仁组成区 (Nucleolar organizer region, NOR) 和随体的数目、位置、形态和大小常常是区分种的重要特征, 但相对着丝点, 次缢痕和随体的识别和判断更为困难。目前, 大部分文献描述植物核型特征时, 仍沿用随体一词表述端部 NOR^[15]。葫芦科植物多为中小染色体, 染色体难以染色和识别。Chen 等^[16]首先将 45S rDNA 定位在黄瓜染色体上, 检测到 4 对信号, 位于着丝粒处。徐延浩等^[11]通过把 45S rDNA 和 5S rDNA 定位在染色体上, 鉴定了南瓜、丝瓜、冬瓜的同源染色体, 对这 3 种植物和黄瓜的亲缘关系也做了简单的推测, 这是传统核型分析难以做到的。李琦等^[10]对西瓜、苦瓜和罗汉果做了类似的研究。本文研究 20 种

葫芦科植物, 其中冬瓜、西瓜、金瓜、葫芦、木鳖子、蛇瓜等 6 种植物在核型分析中观察到了随体 (未发表)。而在本文中, 除瓜叶栝楼外, 19 种植物观察到了 45S rDNA 荧光信号, 准确地显示了 NOR 的位置, 其中冬瓜、西瓜、甜瓜、金瓜、波棱瓜、葫芦、丝瓜、苦瓜、木鳖子、云南木鳖、蛇瓜、糙点栝楼、全缘栝楼、罗汉果、钮子瓜、佛手瓜等 17 种植物的染色体顶端有 45S rDNA 荧光信号, 为随体染色体。可见, 荧光原位杂交技术是研究中小染色体的有力工具, 可为染色体的识别和分析提供稳定、特定的标记。染色体标记结合传统的核型分析技术, 是细胞遗传学发展的新阶段, 是构建分子核型的必要手段。

除瓜叶栝楼外, 供试的 19 种葫芦科植物, 45S rDNA 在各基因组中数目的变化从 1 对到 7 对, 荧光位点在染色体上的分布位置相对固定, 大多数分布在染色体特别是短臂的端部。45S rDNA 数目的变化已经在多种植物中被发现和证实, 这种多态性的起因是多样的, 包括染色体重排、不等交换、转座子引起的隐蔽 rDNA 拷贝数扩增等原因。45S rDNA 参与构成 NOR, NOR 通常被认为是随体染色体的次缢痕。李懋学等^[15]认为, 绝大部分的植物随体, 其实是端部的 NOR, 在植物中, 次缢痕区即 NOR, 两者几乎可作为同义词, 在核型分析时, 使用次缢痕, 讨论功能时, 使用 NOR。植物的随体, 有着广泛的变异, 这样的差异不仅存在于种间, 也存在于种内, 其大小、长短不一, 有些难以辨认。因此光学显微镜观察并不能完全鉴别染色体有没有随体。45S rDNA 杂交的结果, 对于随体的判断、染色体的鉴别、同源染色体的鉴定, 是有力的证据。FISH 技术能识别核型分析观察不到的随体, 明确标记出 NOR, 是构建植物精细核型的关键。

与 45S rDNA 相比, 5S rDNA 在基因组中的数目则相对稳定, 20 种葫芦科植物有 1~2 对 5S rDNA, 但其分布模式变化很大, 从端部到近着丝点都有。Mantovani 等^[17]发现大部分已进行 5S rDNA 定位的植物中, 数目以 1 对或 2 对为主, 但在染色体上没有固定的分布模式。我们的研究结果与前人对 5S rDNA 的描述相符合。

随体染色体是植物分类进化的一个重要依据。染色体经过了漫长的进化, 在内外压力下不断变化, 随体数目越多, 就意味着 rDNA 基因在基因组中经历了广泛的进化, 从而发生了变化, 其数目、大小、位置都有很高的多样性。45S rDNA 和 5S rDNA 进化模式不一样, 前者是数目大小的变化, 后者更主要的是分布模式的变化。我们的试验进一步

验证了这个观点。

rDNA 在葫芦科植物上的定位可为构建葫芦科作物物理图谱、在细胞和分子水平对葫芦科进行系统研究提供依据。此外, 研究结果为这 20 种植物的核型分析提供了稳定有效的标记, 为构建精细核型以及进一步的遗传、基因组结构分析研究奠定了基础。

参考文献:

[1] LALEV A I, NAZAR R N. Conserved core structure in the internal transcribed spacer 1 of the *Schizosaccharomyces pombe* precursor ribosomal RNA[J]. *J Mol Bio*, 1998, 284: 1341-1351.

[2] PILLAY M, HILU K W. Chloroplast DNA restriction site analysis in the genus *Bromus* (Poaceae)[J]. *Amer J Bot*, 1995, 83: 239-250.

[3] FRELLO S, HESLOP-HARRISON J S. Chromosomal variation in *Crocus vernus* hill (Iridaceae) investigated by in situ hybridization of rDNA and a tandemly repeated sequence[J]. *Ann Bot*, 2000, 86(2): 317-322.

[4] SANG Y, LIANG G H. Comparative physical mapping of the 18S-5. 8S-26S rDNA in three *Sorghum* species[J]. *Genome*, 2000, 43(5): 22-28.

[5] HAN Y H, LI L J, SONG Y C, et al. Physical mapping of the 5S and 45S rDNA in teosintes[J]. *Hereditas*, 2002, 137(1): 16-19.

[6] TAKETA S, ANDO H, TAKEDA K, et al. Ancestry of American polyploid *Hordeum* species with the I genome inferred from SS and 18S-25S rDNA[J]. *Ann Bot*, 2005, 96(1): 23-33.

[7] HASTEROK R, WOLNY E, HOSIAWA M, et al. Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes

of various species of Brassicaceae[J]. *Ann Bot*, 2006, 97(4): 205-216.

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

[9] 利容千. 中国蔬菜植物核型研究[M]. 武汉: 武汉大学出版社. 1989: 8-9, 97-100.

[10] 李琦, 马璐, 黄婧, 等. 西瓜、苦瓜与罗汉果染色体的 rDNA 定位及其核型分析[J]. *武汉大学学报 (理学版)*, 2007, 53(4): 449-456.

[11] 徐延浩, 杨飞, 程有林, 等. 45S rDNA 和 5S rDNA 在南瓜、丝瓜和冬瓜染色体上的比较定位[J]. *遗传*, 2007, 29(5): 614-620.

[12] 牛凯, 陈成彬, 刘慧静. rDNA 序列在多种蔬果类植物染色体上的定位[J]. *南开大学学报 (自然科学版)*, 2017, 50(5): 67-75.

[13] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2004.

[14] 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰, 等. 植物有丝分裂染色体标本制作的新方法[J]. *植物学报*, 1979, 21: 297-298.

[15] 李懋学, 张赞平. 作物染色体及其研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.

[16] CHEN J F, STAUB J E, ADELBERG J W, et al. Physical mapping of 45S rRNA genes in *Cucumis* species by fluorescence in situ hybridization[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1999, 77(3): 389-393.

[17] MANTOVANI M, DOS L D, ABEL S, et al. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae)[J]. *Genetica*, 2005, 123(3): 211-216.

【责任编辑 庄 延】