

田 敏, 蹇洪英, 张 婷, 等. 月季和香水月季不同变种的染色体荧光原位杂交研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 183-185.

月季和香水月季不同变种的染色体荧光原位杂交研究

田 敏, 蹇洪英, 张 婷, 莫锡君, 桂 敏, 张 颢, 唐开学

(云南省农业科学院花卉研究所/云南省花卉育种重点实验室, 云南昆明 650205)

摘要:以 45S rDNA 为探针对月季、香水月季不同变种进行了染色体荧光原位杂交, 结果表明: 月季、香水月季中, 不同变种 45S rDNA 杂交位点数与染色体倍性变化基本一致, 四倍体“大白花”有 4 个杂交位点, 三倍体“杏花村”、粉红香水月季“维西永春”有 3 个杂交位点, 二倍体紫月季、香水月季、大花香水月季和粉红香水月季“昆明富民”均有 2 个杂交位点; 月季和香水月季不同变种之间在 45S rDNA 杂交信号的强弱上存在差异, 说明不同变种之间在染色体结构及 45S rDNA 拷贝数上存在多样性。

关键词:蔷薇属; FISH; 45S rDNA; 月季; 香水月季

中图分类号: S685.120.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0183-03

月季(*Rosa chinensis*)和香水月季(*R. odorata*)属于蔷薇科蔷薇属月季组。月季种下包含月季原变种(*R. chinensis* var. *chinensis*)、单瓣月季(*R. chinensis* var. *spontanea*)和紫月季(*R. chinensis* var. *sempervlorens*), 香水月季种下包含香水月季原变种(*R. odorata* var. *odorata*)、大花香水月季(*R. odorata* var. *gigantea*)、粉红香水月季(*R. odorata* var. *erubescens*)和桔黄香水月季(*R. odorata* var. *pseudoinдика*)^[1]。月季和香水月季都原产于中国, 其中香水月季原产云南^[2]。月季和香水月季不仅是非常重要的园林植物^[3]和现代月季的重要原始亲本^[4], 也是现代月季最重要的两大性状即连续开花和芳香怡人(茶香)的来源^[5], 因此对其进行基础细胞遗传学研究具有重要意义。荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization, FISH)技术是一种非放射性原位杂交技术, 可以用于核酸研究的各个方面^[6]。用 FISH 进行核酸序列研究具有周期短、灵敏度高、分辨率高、直观可见等优点^[7]。Ma 等对月季原变种、香水月季原变种、大花香水月季、单瓣月季进行了原位杂交分析^[8-10], 但紫月季、粉红香水月季和桔黄香水月季还没有任何相关研究, 同时还缺乏把月季和香水月季作为一个整体对中国野生月季资源在现代月季形成过程中所起作用的系统研究。因此, 对月季和香水月季不同变种开展荧光原位杂交研究, 一方面为其遗传多样性和亲缘关系研究提供分子细胞遗传学方面的依据, 另一方面可为研究中国古老月季起源和现代月季形成提供基础信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料及相关信息见表 1, 均以嫁接苗形式保存在云

南省农业科学院花卉研究所月季资源圃中。

45S rDNA 克隆自番茄基因组, 由武汉大学生命科学院李立家教授提供。45S rDNA 片段长度为 9.1 kb, 包括 5.8S、18S、25S 亚单位和内转录间隔区(ITS); 克隆载体为 pUC18, 酶切位点为 *Kpn* I。

1.2 试验方法

靶染色体的制备方法参考 Ma 等的方法^[8], 并作适当修改。具体如下: 在天气晴朗的春季上午, 选取植株尚未形成花芽且生长旺盛的茎尖, 用 0.001 mol/L 8-羟基喹啉和 0.01% 秋水仙素混合液预处理 4 h; 0.075 mol/L KCl 溶液低渗 30 min, 再于卡诺固定液(无水乙醇: 冰乙酸 = 3: 1)中固定过夜; 分离出茎尖生长点, 在 0.25 mol/L HCl 溶液中解离 10~15 min, 置于 4% 纤维素酶(Yakult 或 Sigma)与 2% 果胶酶(Yakult 或 Sigma)1: 1 配制组成的混合液中 37℃ 酶解 3~4 h, 37℃ 无菌水低渗 90 min; 将无菌水去除, 加入卡诺固定液混匀为原生质体悬液, 滴于事先清洗并冰冻的防脱载玻片上, 并迅速置于乙醇灯上烘烤干燥。

探针标记采用缺口平移法(Nick translation)^[13], 用地高辛(Digoxigenin-11-dUTP)标记该质粒, 标记试剂购自 Roche 公司(Dig-Nick Translation Mix, No. 11745816910), 按其说明书操作。

原位杂交: 染色体制片 60℃ 烘干 1~2 h; 10 μg/mL 胃蛋白酶液 37℃ 处理 40 min, 2×SSC 漂洗后, 于 75%→95%→100% 乙醇溶液中各级脱水 5 min; 再于 70% FAD 溶液中 70℃ 变性染色体, 然后立即用 75%→95%→100% 冰乙醇依次脱水 5 min; 将 50 μL 杂交混合液滴加到染色体制片上, 于 90℃ 共变性 10 min, 37℃ 杂交过夜。杂交混合液配制: 50% FAD, 10% DS, 3 μg/mL Probe DNA, 0.1 mg/mL 鲑鱼精 DNA、10% 20×SSC、0.1% SDS, 将杂交混合液于 75℃ 变性 10 min 后迅速冰浴 10~20 min。

信号检测: 2×SSC 37℃ 洗脱 2 次, 每次 5 min; 室温下分别用 2×SSC、1×PBS 洗脱 1 次, 每次 5 min。加入 50 μL 抗体(1% BSA/PBS), 于保湿皿中 37℃ 培育 30 min。1×PBS 洗脱 3 次, DAPI 复染 5 min, 1×PBS 漂洗后滴加抗荧光淬灭剂封片。在激光共聚焦显微镜(Olympus FV1000)观察荧光信

收稿日期: 2013-04-14

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31060267); 云南省自然科学基金面上项目(编号: 2008CD183); 云南省科技攻关项目(编号: 2011BB013)。

作者简介: 田 敏(1985—), 女, 云南红河人, 硕士, 研究实习员, 从事花卉种质资源细胞遗传学研究。E-mail: tminfl@yeah.net。

通信作者: 唐开学, 博士, 研究员。E-mail: kxtang@hotmail.com。

表 1 供试月季组资源的来源及已有染色体信息

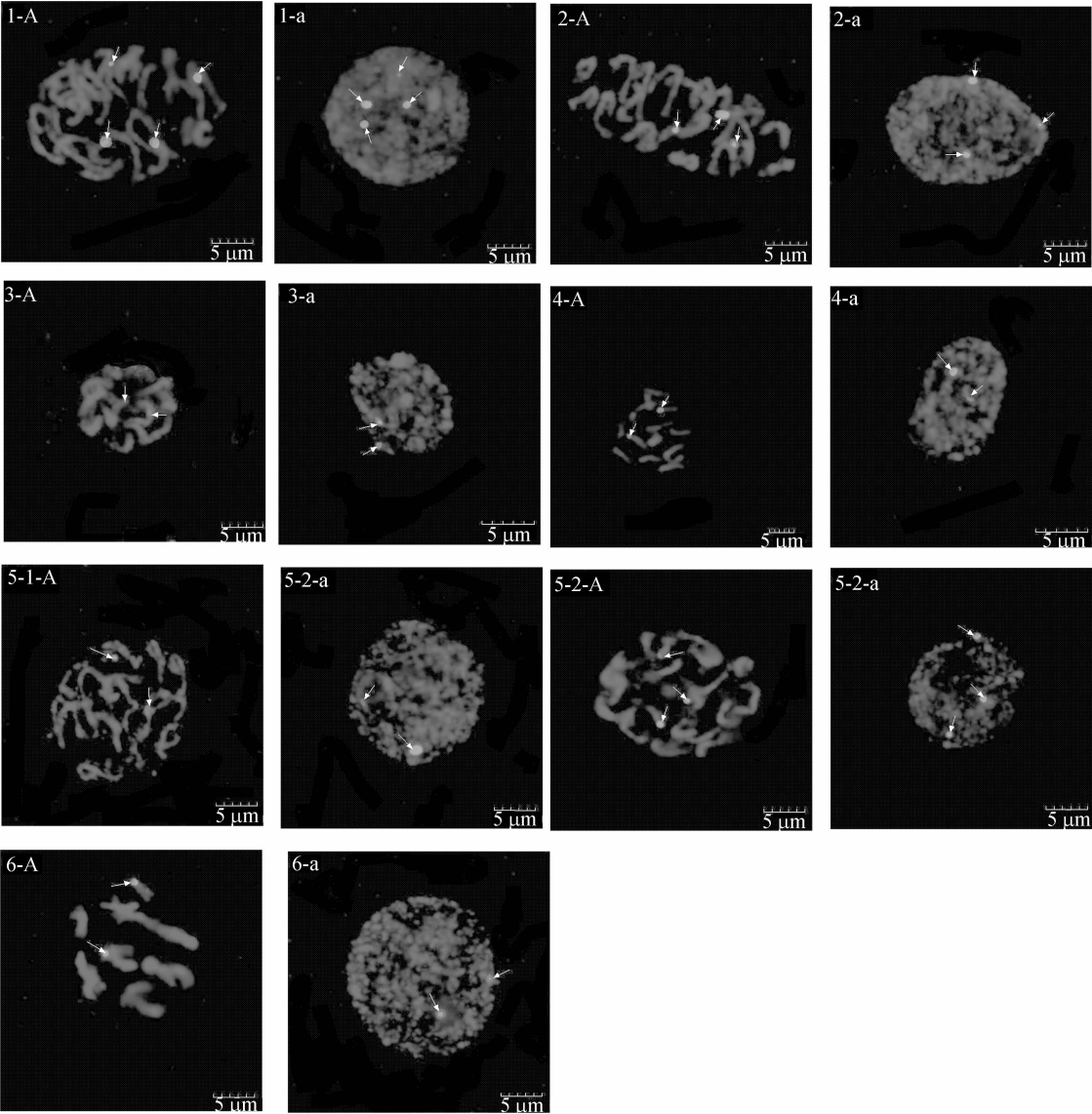
编号	类群	变种/品种	来源	染色体倍性
1	月季 <i>R. chinensis</i>	<i>R. chinensis</i> var. <i>chinensis</i> ‘Dabaihua’ 大白花	江苏南京	2n = 4x (unpublished data)
2	月季 <i>R. chinensis</i>	<i>R. chinensis</i> ‘Betty Prior’ 杏花村	中国农科院赠送	2n = 3x (unpublished data)
3	月季 <i>R. chinensis</i>	<i>R. chinensis</i> var. <i>semperflorens</i> 紫月季	云南昆明	2n = 2x ^[11]
4	香水月季 <i>R. odorata</i>	<i>R. odorata</i> var. <i>odorata</i> 香水月季(原变种)	云南昆明双龙	2n = 2x ^[12]
5-1	香水月季 <i>R. odorata</i>	<i>R. odorata</i> var. <i>erubescens</i> 粉红香水月季	云南昆明富民	2n = 2x ^[12]
5-2	香水月季 <i>R. odorata</i>	<i>R. odorata</i> var. <i>erubescens</i> 粉红香水月季	云南维西永春	2n = 3x ^[12]
6	香水月季 <i>R. odorata</i>	<i>R. odorata</i> var. <i>gigantea</i> 大花香水月季	云南玉溪新平	2n = 2x ^[12]

注:月季在中国栽培与应用历史悠久,经过长期的人工栽培和反复杂交,已难以清楚区分野生月季和栽培月季品种,在本研究中,用相似的“大白花”代替月季原变种;用丰花月季品种“杏花村”(单瓣)代替单瓣月季。桔黄香水月季由于移栽后长势较弱,在试验期间一直未采到适宜的材料。

号,去除背景后拍照得到染色体物理图谱。用 FV10 - ASW 2.0 成像系统软件进行原位杂交图像的摄取、采集和加工;并用 Adobe Photoshop 软件进行图片处理。用于各类杂交信号统计的细胞数目在 10 个以上。

2 结果与分析

图 1 中显示了 7 份试验材料的 45S rDNA 荧光原位杂交结果,其中信号点为罗丹明染成的红色,染色体或染色质被



1、2、3、4、5-1、5-2、6—供试材料编号; A—前期/早中期45S rDNA FISH定位; a—间期45S rDNA FISH定位; 白色箭头指示杂交位点位置

图1 月季和香水月季不同变种前期/早中期和间期的45S rDNA FISH定位

DAPI 染为蓝色。

四倍体的“大白花”在间期染色质和前期的染色体上都显示出 4 个 45S rDNA 杂交位点(图 1 中 1-A、1-a), 4 个杂交信号都位于染色体末端(图 1 中 1-A)。在间期核和分裂前期中, 都表现出其中有 3 个信号较强, 而另 1 个杂交信号较弱(图 1 中 1-A、1-a)。

三倍体的“杏花村”在分裂前期有 3 个 45S rDNA 杂交位点(图 1 中 2-A), 在间期核中也表现出同样的数量(图 1 中 2-a)。杂交点在强度和大小上都比较一致(图 1 中 2-A、2-a)。

二倍体的紫月季在间期染色质和前期的染色体上都显示出 2 个 45S rDNA 杂交位点(图 1 中 3-A、3-a), 2 个杂交信号都位于染色体末端(图 1 中 3-A)。杂交点在强度和大小上都比较一致(图 1 中 3-A、3-a)。

二倍体的香水月季在分裂前期有 2 个 45S rDNA 杂交位点(图 1 中 4-A), 在间期核中也表现出同样数量的位点(图 1 中 4-a), 2 个杂交信号都位于染色体末端(图 4-A)。在间期核和分裂前期中, 都表现出其中有 1 个信号较强, 而另 1 个杂交信号较弱(图 1 中 4-A、4-a)。

二倍体的粉红香水月季在间期染色质和前期的染色体上都显示出 2 个 45S rDNA 杂交位点, 在间期核和分裂前期中, 都表现出其中有 1 个信号较强, 而另 1 个杂交信号较弱(图 1 中 5-1-A、5-1-a)。

三倍体的粉红香水月季在间期染色质和前期的染色体上都显示出 3 个 45S rDNA 杂交位点(图 1 中 5-2-A、5-2-a), 3 个杂交信号都位于染色体末端(图 1 中 5-2-A)。在前期 3 个杂交信号中 2 个信号较强, 而另 1 个杂交信号较弱(图 1 中 5-2-A); 在间期中, 信号大小和强弱没有明显差别(图 1 中 5-2-a)。

二倍体的大花香水月季在分裂前期有 2 个 45S rDNA 杂交位点(图 1 中 6-A), 在间期核中也表现出同样的数量(图 1 中 6-a)。在间期核和分裂前期中, 都表现出其中有 1 个信号较强, 而另 1 个杂交信号较弱(图 1 中 6-A、6-a)。

3 小结与讨论

45S rDNA 在细胞分裂间期大量转录表达形成特殊的区域, 成为核仁。在染色体上含有此串联重复单位的部位称为核仁组织区(Nucleolus organizing regions, NORs)。核仁组织区是细胞分裂不可缺少的结构, 通常 1 个物种至少要有 1 对同源染色体具有核仁组织区; 核仁组织区一旦缺失, 植物细胞将分裂异常, 植物体将不能生存^[14]。rDNA 位点数通常与物种多倍化过程紧密相关^[15], 而多倍化过程中 45S rDNA 位点倾向于被保留, 具有相对保守的数量^[16], 即 1 个染色体组有 1 个 45S rDNA 杂交位点。月季和香水月季及其种下变种也具备上述特征, 45S rDNA 位点数与染色体组数即倍性成对应关系, 也就是二倍体变种有 2 个杂交位点, 三倍体变种有 3 个杂交位点, 四倍体变种有 4 个杂交位点, 这与 Ma 等的研究结果^[8-10]一致, 也与蔷薇科地榆属(*Sanguisorba* L.)的研究结果一致。因此, 45S rDNA 为探针的分裂间期 FISH 可以作为一种检测蔷薇属种及种下单位倍性的方法。

FISH 是一种半定量技术, 尽管其结果不能直接显示基因的实际拷贝数, 但通过杂交信号的大小和强弱, 可以间接反映

基因拷贝数的多少^[17]。45S rDNA 是一个串联的高度重复序列, 在植物进化的过程中相当保守, 在许多物种中不仅存在于随体染色体上, 也存在于某些非随体染色体上, 但拷贝数一般较少。本研究中, 紫月季、大花香水月季和香水月季都为二倍体, 均有 2 个 45S rDNA 位点, 但杂交信号强弱有差异: 紫月季的 2 个杂交位点都较弱, 香水月季和大花香水月季则 1 个信号较强另 1 个信号较弱, 表明它们在分子水平上存在显著遗传差异。供试的 7 个变种 45S rDNA 在染色体上表达量的差异, 表明其在染色体结构及 45S rDNA 拷贝数量上存在多样性。

致谢: 感谢武汉大学生命科学院李立家教授指导蔷薇属荧光原位杂交体系的建立, 并提供杂交所用探针。

参考文献:

- [1] 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, 1985: 360-455.
- [2] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志: 第十二卷[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 570-600.
- [3] 白锦荣, 张启翔, 潘会堂. 云南滇西北地区蔷薇属(*Rosa* L.)植物资源调查与评价[J]. 植物资源学报, 2009, 10(2): 218-223.
- [4] 张佐双, 朱秀珍. 中国月季[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006: 19-20.
- [5] Wylie A P. The history of garden roses; pt. 1[M]. London: Journal of the Royal Horticultural Society, 1954.
- [6] Levisky J M, Singer R H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future[J]. Journal of Cell Science, 2003, 116(14): 2833-2838.
- [7] Heiskanen M, Peltonen L, Palotif A. Visual mapping by high resolution FISH[J]. Trends in Genetics, 1996, 12(10): 379-382.
- [8] Ma Y, Islam - Faridi M N, Crane C F, et al. In situ hybridization of ribosomal DNA to rose chromosomes[J]. Journal of Heredity, 1997, 88(2): 158-161.
- [9] Fernández - Romero M D, Torres A M, Millán T, et al. Physical mapping of ribosomal DNA on several species of the subgenus *Rosa*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(6): 835-838.
- [10] Akasaka M, Yoshihiro U, Koba T. Karyotype analyses of five wild rose species belonging to septet A by fluorescence in situ hybridization[J]. Chromosome Science, 2002, 6(1): 17-26.
- [11] 唐开学. 云南蔷薇属种质资源研究[D]. 昆明: 云南大学, 2009.
- [12] 蹇洪英, 张 颢, 张 婷, 等. 香水月季不同变种的染色体及核型分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(4): 457-461.
- [13] Schwarzscher T, Heslop - Harriott J S. In situ hybridization[M]. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000: 27-50.
- [14] 刘大钧. 细胞生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 9-10.
- [15] Calderini O, Pupilli F, Cluster P D, et al. Cytological studies of the nucleolus organizing regions in the *Medicago* complex: sativa - coerulea - falcata[J]. Genome, 1996, 39(5): 914-920.
- [16] Mishima M, Ohmido N, Fukui K, et al. Trends in site - number change of rDNA loci during polyploid evolution in *Sanguisorba* (Rosaceae)[J]. Chromosoma, 2002, 110(8): 550-558.
- [17] Appels R, Gerlach W L, Dennis E S, et al. Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals[J]. Chromosoma, 1980, 78(3): 293-311.