

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.11.006

# 天然四倍体柑橘与二倍体 5S rDNA 荧光原位杂交分析<sup>①</sup>

赵倩<sup>1</sup>, 陈志<sup>1,2</sup>, 杨星<sup>1</sup>, 党江波<sup>1</sup>,  
汪卫星<sup>1</sup>, 孙海艳<sup>1</sup>, 梁国鲁<sup>1</sup>, 向素琼<sup>1</sup>

1. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 成都理工大学信息科学与技术学院, 成都 610059

**摘要:** 为探讨柑橘天然四倍体来源, 以 5S rDNA 作为探针, 运用荧光原位杂交技术比较柑橘属 3 个生物型的天然四倍体及其相应的二倍体的 5S rDNA 位点. 结果表明, 红江橙二倍体和化州橙二倍体的 5S rDNA 位点为 2 个, 其天然四倍体均有 4 个位点; 资阳香橙二倍体有 1 个 5S rDNA 位点, 其天然四倍体有 2 个位点. 供试天然四倍体柑橘的 5S rDNA 位点数目为二倍体的加倍, 而在染色体上的位置与相应二倍体处于相同序号染色体的相同位置, 只是信号亮度存在差异. 5S rDNA 位点数目和倍性有密切联系, 随着倍性的增加有成倍增加的趋势, 推测这些天然四倍体基因组的形成极有可能由二倍体直接加倍而来.

**关键词:** 荧光原位杂交(FISH); 柑橘; 多倍体; 染色体; 5s rDNA

**中图分类号:** S666

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2016)11-0034-06

柑橘是最具有经济价值的水果之一. 多倍化是柑橘进化过程中常见的自然现象, 这些天然多倍体在柑橘遗传育种上具有重要作用, 例如可以在培育无核三倍体<sup>[1]</sup>和抗病抗逆性砧木<sup>[2]</sup>方面发挥作用. 但由于其天然形成, 其遗传来源并不十分清楚. 而柑橘染色体很小, 长度仅在 1~4  $\mu\text{m}$ , 且同源染色体间差异不明显, 形态特征十分相似, 缺乏鉴别标记, 传统的核型分析很难提供准确的染色体组来源信息. 随着荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)的发展, 染色体相关研究的准确性得以提高, 在物种起源与演化分析、染色体结构分析、多倍体起源等方面应用越来越广泛<sup>[3]</sup>.

5S rDNA 编码细胞质中 5S rRNA, 是真核生物中一类高度保守的串联重复序列, 其编码区的碱基序列则相当保守, 长度约为 120 bp. 5S rDNA 作为研究比较物种进化和起源的理想分子标记<sup>[4]</sup>已在玉米<sup>[4]</sup>、山茶<sup>[5]</sup>、柑橘<sup>[6]</sup>、砂梨<sup>[7]</sup>等多种植物广泛应用, 主要体现在: 序列能够提供足够多的具有系统发育信息的核苷酸位点, 且该序列易于排序, 在植物分类、系统发育等方面应用前景广阔<sup>[8]</sup>. 利用荧光原位杂交技术将 DNA 序列在染色体进行定位, 可以为染色体核型分析提供稳定有效的标记, 成为染色体小而且形态相似的物种进行核型研究的很重要的工具<sup>[9]</sup>, 也可用来研究植物种属间的进化关系<sup>[10]</sup>. 利用 FISH 技术, Miranda 等<sup>[11]</sup>对长寿金柑 rDNA 进行定位, 在中期染色体观察到 4 个位点. 而在亲缘关系鉴定方面, 通过 5S

① 收稿日期: 2016-03-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272138); 国家科技支撑计划项目(2013BAD02B02); 中央高校基本业务费专项(XDJK2016E146).

作者简介: 赵倩(1991-), 女, 重庆合川人, 硕士研究生, 主要从事果树种质资源与遗传育种研究.

通信作者: 向素琼, 研究员, 硕士研究生导师.

rDNA 和 SSR/ARLP 标记结合, Sisco 等<sup>[12]</sup>在遗传图谱上将欧洲板栗与美洲板栗和中国板栗相关联, 进一步明确了其遗传背景. 本研究选取红江橙、化州橙和资阳香橙及其相应的天然四倍体作为研究对象, 运用荧光原位杂交技术, 比较天然四倍体柑橘与二倍体 5S rDNA 位点信息的差异, 研究 5S rDNA 位点在不同倍性柑橘材料的多态性, 为探究柑橘多倍体起源与进化提供一定的依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

植物材料共 6 种, 即柑橘属的红江橙(*C. sinensis* Osbeck cv. Hongjiangcheng)、化州橙(*C. sinensis* Osbeck cv. Huazhoucheng)和资阳香橙(*C. junos* Sieb ex Tanaka)(ziyangxiangcheng)的二倍体材料( $2n=2x=18$ )及其相应的天然四倍体( $2n=4x=36$ ). 二倍体来自重庆柑橘种质资源圃, 天然四倍体从相应材料的天然种子萌发的实生苗中筛选获得.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 染色体标本制备

参考陈瑞阳等<sup>[13]</sup>的去壁低渗火焰干燥法略作修改: 用 8-羟基喹啉(0.002 mol/L)预处理 2~4 h, 卡诺氏固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)固定 2 h, 三级水清洗 30 min, 37 °C 酶解 2~3 h, 后低渗 10 min, 加入固定液. 用吸管吸出酶解好的根尖, 滴在干净载玻片上, 滴加几滴固定液, 倾斜载玻片, 小范围内用镊子均匀敲打材料, 之后再滴加固定液让刚敲出的类似细胞悬浮液扩散, 自然晾干. 5% Giemsa 染液染色 10~15 min, 冲洗自然晾干, 镜检. 如不能及时进行后续 FISH 试验, 染色体标本可保存于 -20 °C.

#### 1.2.2 5S rDNA 探针设计与标记

供试探针是从 5S rDNA 中挑选的一段长为 20 bp 的保守序列, 由上海生工生物工程公司合成, 并直接在 5'端用 TAMRA(四甲基罗丹明)(图 1A)或 6-FAM(羧基荧光素)(图 1B-F)标记成为探针.

#### 1.2.3 荧光原位杂交(FISH)流程

荧光原位杂交及其检测参考 Jiang J & Gill B S<sup>[14]</sup>的方法略加修改进行. 采取染色体与探针分别变性. 探针于 PCR 仪中 97 °C 10 min 变性, 然后立即冰浴 10 min 以免复性. 原位杂交仪中杂交 4 h, 杂交液含 50% 去离子甲酰胺, 2×SSC, 0.1% SDS, 10% 硫酸葡聚糖, 5 ng/μL 探针 5S rDNA. 漂洗完成后加 20 μL 含有 DAPI(4 ng/μL)的抗荧光衰减剂封片. Olympus BX53 荧光显微镜观察杂交信号. Olympus DP71 装置捕获图像, 利用 Cellsens Standard 和 Photoshop 软件进行图像处理.

## 2 结果与分析

6 种材料的 5S rDNA 杂交结果及核型图见图 1. 红江橙和化州橙同为柑橘属植物的甜橙类品种, 其二倍体体细胞中期染色体均有 2 个 5S rDNA 位点, 且位于一对同源染色体短臂的端部. 不同的是, 红江橙的 5S rDNA 位点位于第 8 对染色体(图 1A), 化州橙的位点位于第 9 对染色体(图 1C). 而资阳香橙二倍体体细胞中期染色体只有 1 个 5S rDNA 位点, 位于第 9 对同源染色体其中一条染色体短臂的端部(图 1E).

红江橙和化州橙天然四倍体体细胞中期染色体都有 4 个 5S rDNA 位点, 且均位于一组同源染色体短臂的端部. 与相应的二倍体品种一样, 天然四倍体红江橙的 5S rDNA 位点位于第 8 号同源染色体(图 1B), 天然四倍体化州橙的位点则位于第 9 号同源染色体(图 1D). 天然四倍体资阳香橙体细胞中期染色体上有 2 个 5S rDNA 位点, 位于第 9 号同源染色体其中两条染色体短臂的端部(图 1F).

观察红江橙、化州橙和资阳香橙与其相应天然四倍体的 5S rDNA 位点信号的亮度发现, 红江橙天然四倍体与二倍体信号亮度接近, 化州橙和资阳香橙与其相应天然四倍体亮度有差异, 化州橙二倍体信号亮度高于其天然四倍体, 但资阳香橙天然四倍体亮度高于二倍体. 这可能是不同材料的 5S rDNA 拷贝数差异造成的.

比较红江橙、化州橙和资阳香橙与其相应天然四倍体的 5S rDNA 位点数目及位置, 天然四倍体的位点数目为二倍体的加倍, 在染色体的位置则与相应二倍体处于相同序号染色体的相同位置. 由此推测, 这些天然四倍体基因组的形成极有可能是二倍体的直接加倍. 因为红江橙、化州橙和资阳香橙 3 种材料其种子均为多胚, 这些多胚种子一般由珠心细胞发育而来, 那么这些天然四倍体胚很可能来自染色体加倍的珠心细胞, 因此与母本具有极高的遗传相似性, 5S rDNA 位点数目和倍性有密切联系, 位点数目随着倍性增加有增加趋势, 同时可以为多倍体来源途径提供信息. 而天然四倍体与二倍体 5S rDNA 信号亮度存在的差异则显示二者可能 5S rDNA 拷贝数并不相同.

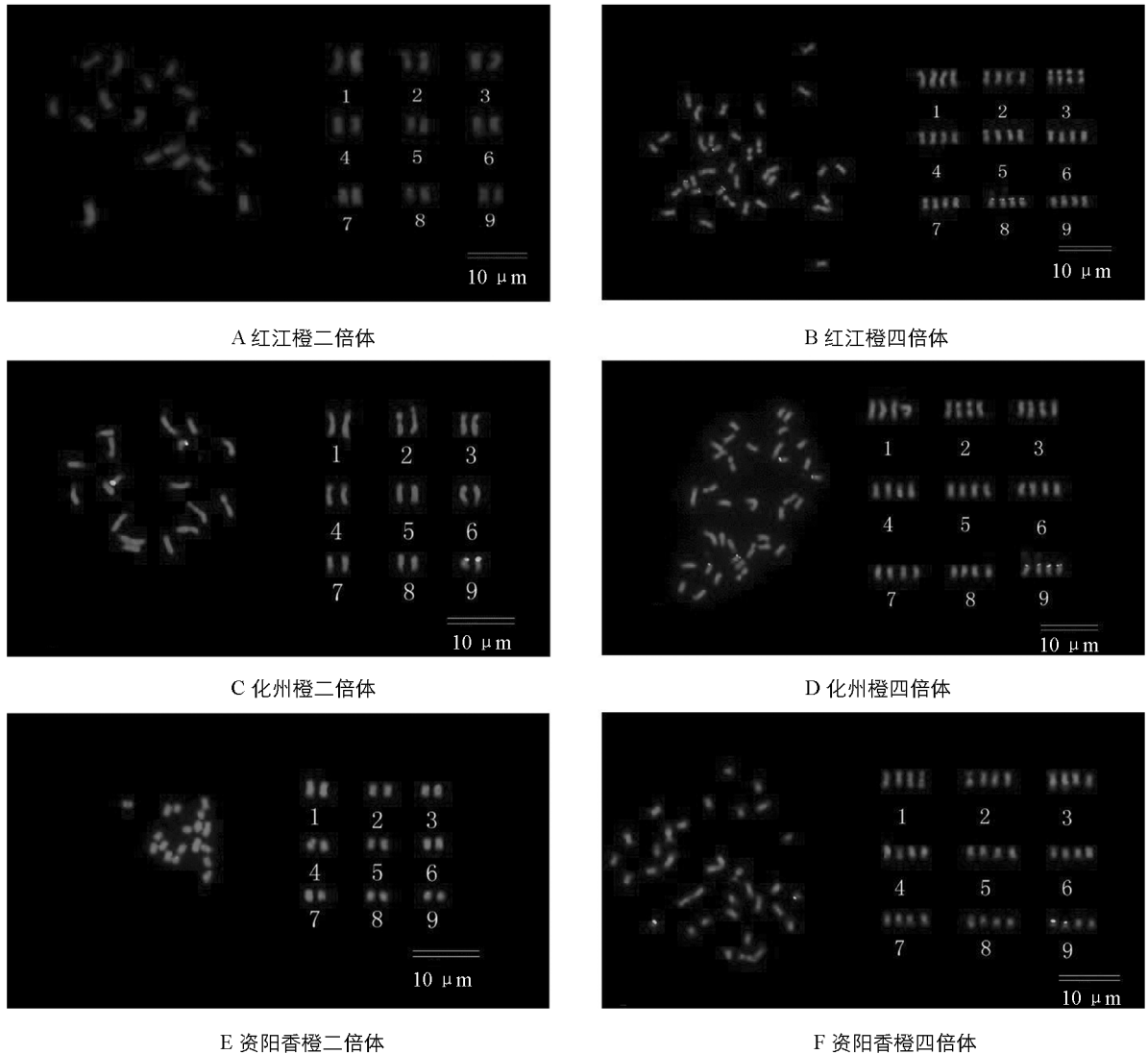


图 1 天然四倍体柑橘与二倍体 5S rDNA 荧光原位杂交

## 3 讨论

### 3.1 柑橘天然四倍体来源

多倍化是植物进化过程中的自然现象, 大部分植物种类都具有多倍体, 借此与传统核型特征相结合, rDNA 位点数目与位置成为判断多倍体来源的参考依据之一<sup>[15]</sup>. Longley(1925)第一个报道了自然发生的四倍体金豆, 之后在柑橘、枳、金柑属实生树中都有四倍体发现. 尽管彭祝春等<sup>[16]</sup>报道单胚清见与多胚椪柑杂交产生高比例多胚种子, 这些多胚种子形成实生苗的叶片形态和 SSR 分析表明, 多胚苗可能由同一合子胚分裂而来, 也可能来源于多卵受精形成的不同合子胚, 因此形成了有性多胚. 梁武军等<sup>[17-18]</sup>利用 SSR

对柑橘多倍体的遗传背景进行研究也发现,早金甜橙、日辉橘、Ortanique 橘橙、默科特橘橙、Flame 葡萄柚、华农本地早橘、朱红橘和卡特夏橙等 8 种材料从饱满种籽获得的四倍体均为同源四倍体;枳、早实枳、枳橙和香橙 4 种材料的四倍体与其二倍体亲本的带型完全相同,也认定是由珠心组织发育而来的同源四倍体. 向素琼等<sup>[19]</sup>应用 FISH 技术在不同倍性沙田柚染色体上进行 45S rDNA 定位研究也发现,45S rDNA 位点数目大多随倍性成倍增加,同时也体现出明显的多态性和杂合性. 本研究对红江橙、化州橙和资阳香橙的天然四倍体与二倍体的 5S rDNA 位点的 FISH 分析也证实 5S rDNA 位点会随倍性成倍增加,并且在染色体上的分布位置基本相同,只是信号亮度有所差异,推测这些天然四倍体基因组的形成极有可能是二倍体的直接加倍,即来源于珠心胚形成过程中细胞染色体加倍产生的同源四倍体.

### 3.2 rDNA 荧光原位杂交定位在柑橘上的应用

rDNA 即核糖体 DNA,是编码 rRNA 的基因,分为 45S 和 5S 两种,都是真核生物中中度重复的串联重复序列. 45S rDNA 主要定位于核仁组织区,参与核仁形成,一般在染色体的次缢痕部位与随体相连,因此 45S rDNA 的杂交位点数目一般即为随体染色体的数目<sup>[15]</sup>. 而 5S rDNA 与其他核糖体 DNA 在染色体上是彼此独立的,与核仁形成无关. 很多研究显示,45S rDNA 无论是位点数目和在染色体上的位置,还是拷贝数都具有多样性<sup>[20-21]</sup>. 而 5S rDNA 位点信息相对于 45S rDNA 来说,无论是染色体上的分布位置还是拷贝数都更为保守. 在已报道的各种植物的 rDNA 位点研究中,绝大部分的 45S rDNA 位点数目都要多于 5S rDNA<sup>[22]</sup>. 在柑橘上,Roose 等<sup>[23]</sup>通过 FISH 技术,对枳、甜橙、枳橙的 rDNA 位点数目进行分析,得出 45S rDNA 位点枳有 7 个、甜橙有 5 个、不同的枳橙杂种中含有 5~6 个 45S rDNA 位点,但这些材料的 5S rDNA 位点都为 4 个,证实了不同材料 rDNA 的变异,同时在这几种材料中观察到染色体的高度杂合性. 而 Pedrosa 等<sup>[24]</sup>定位的甜橙 rDNA 位点数目与前者不同,为 3 个 45S rDNA 和 2 个 5S rDNA 位点. 陈春丽<sup>[25]</sup>对 rDNA 染色体定位发现,枳存在 6 个 45S rDNA 位点和 2 个 5S rDNA 位点. Olitrault 等<sup>[26]</sup>检测到的 45S rDNA 位点为柚和柠檬有 2 个,甜橙和酸橙为 3 个,日本金柑为 4 个,枳为 6 个. Carvalho 等<sup>[27]</sup>利用 CMA +/DAPI - 带型模式以及 5S 和 45S rDNA 定位研究了来檬 (*C. aurantifolia*)、柠檬 (*C. limon*)、枸橼 (*C. medica*) 的亲缘关系,认为枸橼的 rDNA 位点完全同源,是一个真正的种,来檬与柠檬的位点杂合,应为杂种. Moraes 等<sup>[28]</sup>以 45S rDNA 和 24 个 BAC 克隆为探针,结合 CMA 带型,成功识别枳的全部 9 对染色体. Mendes 等<sup>[29]</sup>通过 CMA 带型以及将来自枳属基因组文库的 25 个 BAC 克隆和 5S rDNA 作为探针,在枸橼染色体上定位,成功识别枸橼的全部 9 对染色体. Silva 等<sup>[30]</sup>用来自枳属的 BACs 以及 45S rDNA 在宽皮柑橘 Cravo 的染色体上进行定位,结合 CMA 带型,构建细胞遗传图谱,与之前已构建的枳属细胞遗传图谱进行比较,研究枳属和柑橘属染色体的同源性及亲缘关系. 由此看来, rDNA 尤其是 5S rDNA 在染色体上的数目十分有限,如要作为染色体的标记准确识别染色体只能起到一定作用,还需要结合其他特异探针,如 SSR 标记、BAC 克隆等,才可以在染色体识别或染色体来源分析上发挥更好作用.

### 参考文献:

- [1] ALI S, KHAN A S, RAZA S A, REHMAN R N U. Innovative Breeding Methods to Develop Seedless Citrus Cultivars [J]. International Journal of Biosciences, 2013, 3(8): 191-201.
- [2] 石庆华,刘平,刘孟军. 果树倍性育种研究进展 [J]. 园艺学报, 2012, 39(9): 1639-1654.
- [3] JIANG J, GILL B S. Current Status and the Future of Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) in Plant Genome Research [J]. Genome, 2006, 49(9): 1057-1068.
- [4] 马卉. 几个栽培玉米亚种 5S rDNA 序列分析及 FISH 定位 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2007.
- [5] SINGH D, AHUJA P S. 5S rDNA Gene Diversity in Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and Its Use for Variety Identification [J]. Genome, 2006, 49(1): 91-96.



- [6] BRASILEIRO-VIDAL A C, dos SANTOS-SEREJO J A, SOARES FILHO W S, et al. A Simple Chromosomal Marker Can Reliably Distinguishes Poncirus from Citrus Species [J]. *Genetica*, 2007, 129(3): 273–279.
- [7] 杨光绪, 刁 英. 砂梨 45 S rDNA 和 5 S rDNA 的染色体定位研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2007, 29(7): 135–138.
- [8] 李玉泉, 何 平, 邓洪平, 等. rDNA 片断序列分析技术及其在植物系统与进化研究中的应用 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2005, 30(1): 145–149.
- [9] 刘 博, 陈成彬, 李秀兰, 等. 豆科三属八种植物的核型及 rDNA 定位研究 [J]. *云南植物学研究*, 2005, 27(3): 261–268.
- [10] VAIO M, SPERANZA P, VALLS J F, et al. Localization of the 5S and 45S rDNA Sites and cPDNA Sequence Analysis in Species of the Quadrifaria Group of Paspalum (Poaceae, Paniceae) [J]. *Ann Bot(Lond)*, 2005, 96(2): 191–200.
- [11] MIRANDA M, IKEDA F, ENDO T, et al. rDNA Sites and Heterochromatin in Meiwa Kumquat (*Fortunella Crassifolia* Swing.) Chromosomes Revealed by FISH and CMA/DAPI Staining [J]. *Caryologia*, 2014, 50(3): 333–340.
- [12] SISCO P H, KUBISIAK T L, CASASOLI M, et al. An Improved Genetic Map for *Castanea Mollissima*/*Castanea Dentata* and Its Relationship to the Genetic Map of *Castanea Sativa* [J]. *Acta Horticulturae*, 2005, 693: 491–495.
- [13] 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰. 植物有丝分裂染色体标本制作的新方法 [J]. *植物学报*, 1979, 21(3): 297–298.
- [14] JIANG J, GILL B S. Sequential Chromosome Banding and in Situ Hybridization Analysis [J]. *Genome*, 1993, 36(4): 792–795.
- [15] 王 燕, 南 红, 王小蓉, 等. 45S 和 5S rDNA 在果树染色体上的比较定位及在系统进化研究中的应用 [J]. *果树学报*, 2012, 29(2): 253–261.
- [16] 彭祝春, 龚桂芝, 马喜军, 等. 单胚椴橘×多胚岩溪晚芦椴柑多胚种子的胚分离培养及后代的叶形态和 SSR 鉴定 [J]. *果树学报*, 2012, 29(1): 1–5.
- [17] 梁武军, 解凯东, 郭大勇, 等. 10 个柑橘砧木类型同源四倍体的发掘与 SSR 鉴定 [J]. *果树学报*, 2014, 31(1): 1–6.
- [18] 梁武军, 解凯东, 郭大勇, 等. 柑橘 10 个品种实生后代多倍体的发掘及 SSR 鉴定 [J]. *园艺学报*, 2014, 41(3): 409–416.
- [19] 向素琼, 汪卫星, 梁国鲁. 45S rDNA 在不同倍性沙田柚染色体上的荧光原位杂交分析 [J]. *园艺学报*, 2007, 34(1): 75–80.
- [20] LIU Z L, ZHANG D, HONG D Y, et al. Chromosomal Localization of 5S and 18S-5. 8S-25S Ribosomal DNA Sites in Five Asian Pines Using Fluorescence in Situ Hybridization [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106(2): 198–204.
- [21] 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.
- [22] SHENG M Y, WANG L J. Chromosomal Localization of 45S and 5S rDNA in 14 Species and the Implications for Genome Evolution of Genus *Epimedium* [J]. *Pl Syst Evol*, 2010, 290(4): 65–73.
- [23] ROOSE M L, SHWARZACHER T, HESLOP-HARRISON J S. The Chromosomes of Citrus and Poncirus Species and Hybrids: Identification of Characteristic Chromosomes and Physical Mapping of rDNA Loci Using in Situ Hybridization and Fluorochrome Banding [J]. *Journal of Heredity*, 1998, 89(1): 83–86.
- [24] PEDROSA A, SCHWEIZER D, GUERRA M. Cytological Heterozygosity and the Hybrid Origin of Sweet Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100(3): 361–367.
- [25] 陈春丽. 柑橘体细胞杂种细胞遗传学及抗 CTV 等基因对枳的 FISH 分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.
- [26] OLLITRAULT P, TREANTON K, DAMBIER D, et al. In Situ Hybridization for Polyploid Citrus Genome Analysis [J]. *Proc Int Soc Citriculture*, 2000, 9: 189–190.
- [27] CARVALHO R, SOARES FILHO W S, BRASILEIRO-VIDAL A C, et al. The Relationships Among Lemons, Limes and Citron: a Chromosomal Comparison [J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2005, 109(1–3): 276–282.
- [28] MORAES A P, MIRKOV T E, GUERRA M. Mapping the Chromosomes of *Poncirus trifoliata* Raf. by BAC-FISH [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2008, 121(3–4): 277–281.

- [29] MENDES S, MORAES A P, MIRKOV T E, et al. Chromosome Homeologies and High Variation in Heterochromatin Distribution Between *Citrus* L. and *Poncirus* Raf. as Evidenced by Comparative Cytogenetic Mapping [J]. *Chromosome Res*, 2011, 19(4): 521–530.
- [30] SILVA S, MENDES S, SOARES FILHO W S, et al. Chromosome Homologies Between *Citrus* and *Poncirus*—the Comparative Cytogenetic Map of Mandarin (*Citrus reticulata*) [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2014, 11(1): 1–9.

## Chromosome Localization of 5S rDNA of Natural Tetraploids and Their Corresponding Diploids in Citrus by Fluorescence *in Situ* Hybridization

ZHAO Qian<sup>1</sup>, CHEN Zhi<sup>1,2</sup>, YANY Xing<sup>1</sup>, DANG Jiang-bo<sup>1</sup>,  
WANG Wei-xing<sup>1</sup>, SUN Hai-yan<sup>1</sup>, LIANG Guo-lu<sup>1</sup>, XIANG Su-qiong<sup>1</sup>

1. College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. College of Information Science & Technology, Chengdu University of Technology, Chengdu 610059, China

**Abstract:** In order to study the origin of the natural tetraploids in *Citrus*, the 5SrDNA was used as a probe and we compared the 5S rDNA sites among 3 natural tetraploids belonging to *Citrus* L. and their corresponding diploids by the technique of fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The results showed that 2 sites were found in diploid of *C. sinensis* (Hongjiangcheng) and *C. sinensis* (Huazhoucheng) while 4 sites in theirs tetraploids. Moreover, 1 site was detected in the diploid of *C. junos* Sieb. ex Tanaka while 2 sites in its tetraploids. The number of the natural tetraploid citrus were twice as their corresponding diploids and the location of the natural tetraploid citrus in the chromosome were the same as their corresponding diploids though their signal intensity were different. Those 5S rDNA sites imply that the natural tetraploids in this study are likely to be doubled directly from their corresponding diploids.

**Key words:** fluorescence *in situ* hybridization (FISH); citrus; polyploidy; chromosome; 5S rDNA

责任编辑 欧 宾

