

文章编号: 1674 - 7054(2015) 03 - 0246 - 04

巴西橡胶树热研7-33-97品种45S rDNA 的FISH分析及定位

唐冰霞^{1,2}, 王英¹, 高和琼¹, 庄南生¹

(1. 海南大学农学院/海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海南海口 570228;

2. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南儋州 571737)

摘要: 以小麦的45S rDNA为探针, 采用荧光原位杂交技术对巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)热研7-33-97的有丝分裂细胞进行了检测, 结果发现, 不同时期细胞内均能观察到4个信号位点, 且这4个信号的大小和强弱存在差异。核型分析结果表明, 这4个信号位点被分别定位在6号和7号染色体上, 其中, 信号较小较弱的1个位点位于6号染色体的1条同源染色体次缢痕处, 信号较大较强的位点位于6号染色体的另1条同源染色体的次缢痕及随体处, 其余的信号位点位于7号1对同源染色体的次缢痕及随体处, 信号大小和强度介于前两者之间。

关键词: 巴西橡胶树; 热研7-33-97; 荧光原位杂交; 45S rDNA

中图分类号: S 794.1

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.2015.03.004

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)为大戟科(Euphorbiaceae)橡胶树属(*Hevea*)双子叶多年生落叶乔木^[1],是唯一可进行大面积商业模式种植的天然橡胶品种。中国热带农业科学院橡胶研究所于1965年以生理指标均衡,生物合成能力活跃的高产无性系品种RRIM600为母本,以干胶含量高,抗性耐性优良的晚熟无性系品种PR107为父本,采用常规杂交授粉法选育出三生代优良无性系品种——热研7-33-97^[2-3]。该品种具有保苗率高,生长速度快,早熟高产,抗风、抗寒、耐割等优良性状,适应能力强,干胶理化性能好,经济效益高等优点^[4],自1995评定晋升为大规模推广级橡胶品种以来,已在海南省多地区大面积推广种植^[5]。核糖体是高等真核植物合成蛋白质的重要场所,主要成分是rRNA和蛋白质的复合物。45S rDNA主要负责编码rRNA前体,是一类具有转录活性且高度保守的重复序列,以串联排列的方式成簇状分布于一对或多对染色体上^[6]。采用45S rDNA探针对植物染色体进行荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)研究,可以测定出rDNA基因的相对物理位置和多拷贝基因位点数目,从而为染色体识别提供有效的细胞学标记,对构建物理图谱^[7]、研究多倍体起源和物种进化关系都具有重要意义^[8]。Leitch等^[9]曾对巴西橡胶树种子苗的根尖细胞进行了45S rDNA和5S rDNA的研究,但在巴西橡胶树热研7-33-97品种尚未见有关的报道。笔者对巴西橡胶树热研7-33-97品种进行45S rDNA定位及荧光原位杂交分析,以期阐明45S rDNA在热研7-33-97染色体上的分布特征及拷贝数差异,旨在为热研7-33-97染色体识别提供细胞学标记。

收稿日期: 2015-04-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360186); 国家天然橡胶产业技术体系(CARS-34); 海南省重大科技项目(ZDZX2013023)

作者简介: 唐冰霞(1990-),女,海南大学农学院2012级硕士研究生. E-mail: 1016028402@qq.com

通信作者: 庄南生,教授,博士,研究方向: 热带作物遗传育种. E-mail: zhuangns@163.com

1 材料与方法

1.1 实验材料 以巴西橡胶树热研7-33-97的古铜期幼叶为实验材料,采自海南大学儋州校区作物遗传育种实验基地。

1.2 染色体制片 取新鲜的热研7-33-97古铜期幼叶,参考高和琼^[10]的酶解去壁低渗法,稍作改进。将预处理过的叶片置于混合酶液(5%纤维素酶+4%果胶酶)中酶解7.5 h,经低渗、固定后取少许叶片边缘进行涂抹制片,再经Giemsa复染镜检,染色好的片子可在-20℃下干燥保存数月。

1.3 探针的制备 含有18S-5.8S-25S(45S) rDNA的克隆PTa71质粒来自小麦,片段长度约9 kb,载体为pUC8,由日本大阪教育大学向井康比己教授惠赠。采用Omega公司生产的Plasmid Mini Kit I试剂盒提取质粒,探针采用Roche公司的DIG切口平移试剂盒(DIG-Nick Translation Mix for in situ probes)进行标记,纯化后溶于去离子甲酰胺溶液中。

1.4 杂交液的配制 30 μL杂交液中包含50%去离子甲酰胺、10%硫酸葡聚糖、2×SSC、0.5 μg·μL⁻¹鲑鱼精DNA、100 ng探针。混合液于100℃水浴变性10 min,然后迅速冰浴5 min。

1.5 变性与杂交 染色体制片在70℃下烘烤2 h,37℃下用100 mg·μL⁻¹的RNase酶处理1 h,0.01N的HCl处理10 min,在70%的甲酰胺中70℃下变性4 min后,经-20℃预冷的70%、95%和100%酒精依次脱水。将已变性的杂交液30 μL滴加在风干的染色体标本上,加盖玻片密封。90℃共变性10 min后,37℃杂交过夜。

1.7 洗脱与信号放大 在室温下,经2×SSC溶液、20%甲酰胺溶液、2×SSC溶液、1×PBS溶液依次浸洗5~10 min后,加入20 mg·L⁻¹鼠抗地高辛-Alexa Fluor 488暗室孵育1 h,20 mg·L⁻¹兔抗鼠-Alexa Fluor 488暗室孵育1 h,20 mg·L⁻¹鼠抗兔-Alexa Fluor 488暗室孵育0.5 h。每次暗孵育后经1×PBS溶液洗脱3×7 min。滴加30 μL经抗淬灭剂DABCO稀释的2 μg·μL⁻¹的DAPI染液复染,封片。

1.8 图像检测及分析 在荧光显微镜BX51TR-32FA1-A03下进行观察,用Image-Pro Plus软件拍照。选择分散良好的有丝分裂中期分裂相,参照文献[11]的标准进行核型分析。后期图片用Photoshop CS6软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 热研7-33-97的45S rDNA荧光杂交分析 经DIG标记的45S rDNA检测时呈现绿色荧光,可在经DAPI染液染为蓝色的染色体或染色质上显示出清晰的杂交信号(图1)。从图1可知,在热研7-33-97有丝分裂不同时期(间期、前期、前中期、中期)细胞内均能检测到4个信号位点,其中1个信号位点较大较强,2个信号位点次之,1个信号位点较小较弱。

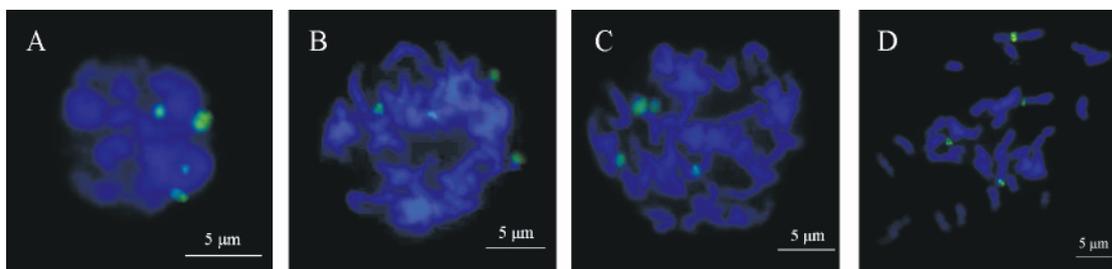


图1 45S rDNA在热研7-33-97有丝分裂不同时期染色体上FISH的结果

A: 间期; B: 前期; C: 前中期; D: 中期

Fig. 1 Fluorescence in situ hybridization with 45S rDNA on interphase, prophase, prometaphase and metaphase chromosomes of reyan-7-33-97

A: interphase; B: prophase; C: prometaphase; D: metaphase

2.2 45S rDNA 在热研 7-33-97 品种上的定位 根据荧光原位杂交结果,选择分散良好的有丝分裂中期细胞进行核型分析,建立热研 7-33-97 中期染色体 45S rDNA 信号的核型图(图 2),并结合高和琼^[11]发表的热研 7-33-97 的核型参数绘制出核型模式图(图 3)。结果表明,中期细胞内共有 4 个信号位点与随体数目一致,其中 1 个杂交信号位于 6 号染色体 1 条同源染色体次缢痕处,1 个杂交信号位于 6 号染色体另 1 条同源染色体的次缢痕及随体上;其余 2 个杂交信号分别位于 7 号染色体 2 条同源染色体的次缢痕及随体上。在 6 号染色体 1 条同源染色体次缢痕处的杂交信号较小较弱,在 6 号染色体另一条同源染色体随体上及次缢痕处的杂交信号较大较强,在 7 号染色体 2 条同源染色体上的 2 个杂交信号较相像,大小强度均介于 6 号染色体 2 个不同的信号强度之间。

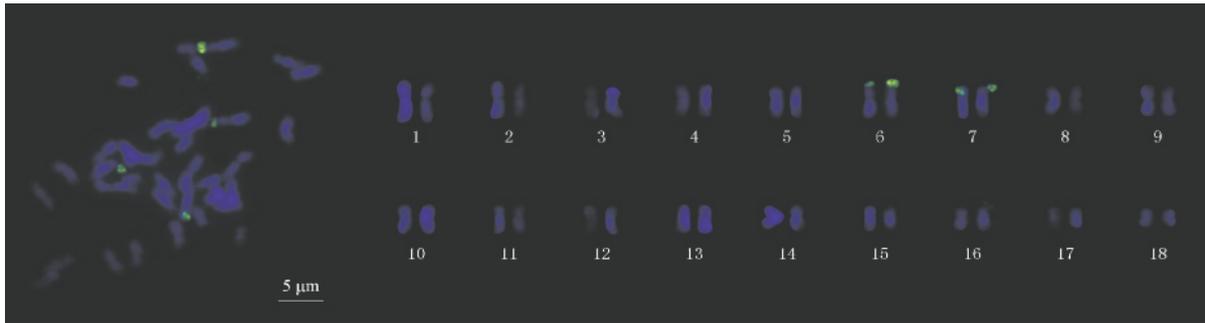


图 2 热研 7-33-97 的 45S rDNA 荧光原位杂交核型图

Fig. 2 The karyotypes of Reyan7-33-97 by fluorescence in situ hybridization for 45S rDNA

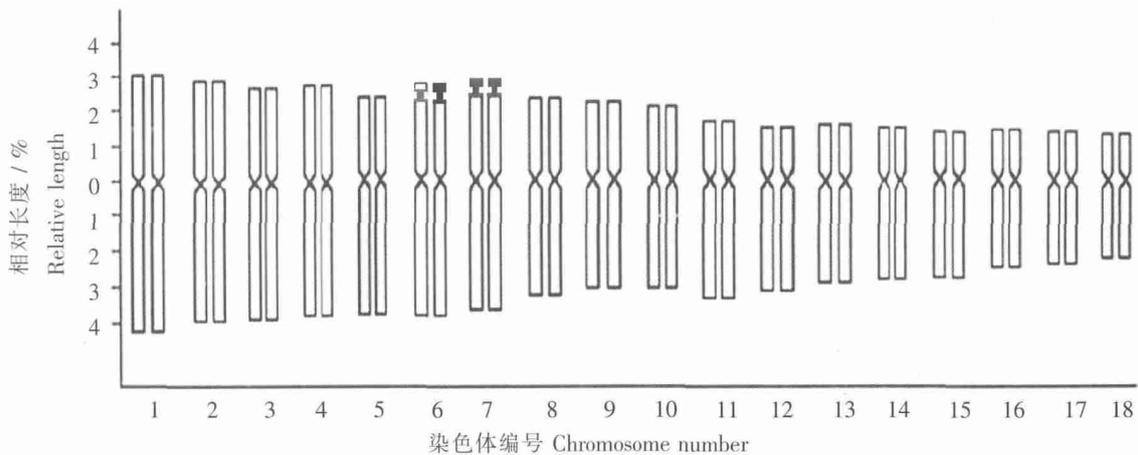


图 3 热研 7-33-97 中期染色体 FISH 核型模式图

Fig. 3 FISH-aimed karyo-idiogram on metaphase chromosomes of Reyan7-33-97

3 讨论

次缢痕是主缢痕(即着丝粒)之外的染色体缢缩部位,在玉米中早已证实染色体次缢痕部分与核仁的形成有关^[12]。45S rDNA 位点一般参与核仁的形成,故常被称为核仁组织者区(nucleolus organizer region, NOR),在多种植物的有丝分裂细胞中,45S rDNA 位点主要被定位在次缢痕处或随体染色体上^[13-14]。本实验中 4 个 45S rDNA 信号位点均定位于次缢痕处或随体上,结果与前人的研究^[13-14]相符,且 45S rDNA 信号位点数目与随体数目一致的结论也与张寿洲等^[15]关于栽培稻的研究结果相符。但 Leitch^[9]将巴西橡胶树的 4 个 45S rDNA 信号定位于染色体随体上及次缢痕处或染色体短臂末端,且 4 个杂交信号大小强度较一致,与笔者的结果略有差异,其原因可能与供试种质不同有关。巴西橡胶树属于常异花授粉植物,其有性生殖的后代会发生遗传变异,所以巴西橡胶树品种一般通过芽接等方式进行无性繁殖。由于巴西橡胶树种子根尖的遗传组成与其亲本品种的遗传组成不同,因此,前人用种子根尖制备染色体标本来进

行研究得出的结果并不能代表某一特定的品种。本研究是使用幼叶组织制备染色体标本来进行 FISH 分析的,其结果可表明热研7-33-97品种45S rDNA的分布特点。

45S rDNA是植物基因组中高度保守的重复序列,其杂交信号的强度能够间接反映出基因拷贝数的多寡。本研究所得的4个杂交信号强度和大小均有所差异,表明各45S rDNA位点的45S rDNA重复序列拷贝数存在着差异。6号染色体2个同源染色体上的45S rDNA杂交信号的分布位置及强度相差较大,其中1条同源染色体仅在次缢痕处存在信号,信号较弱,而另1条同源染色体则在次缢痕和整个随体存在信号,且信号较强,说明6号2条同源染色体间的45S rDNA重复序列的拷贝数存在较大的差异,且橡胶树遗传组成是杂合的。因热研7-33-97是由亲本RRIM600和PR107杂交选育而成,由此推测亲本RRIM600与PR107品种的6号染色体间的45S rDNA可能存在差异。7号染色体上的1对45S rDNA杂交信号较一致,其强度和大小均介于6号染色体上2个杂交信号强度之间,由此可推测7号染色体每个45S rDNA位点重复序列拷贝数介于6号染色体2个45S rDNA位点的重复序列拷贝数之间。由于45S rDNA杂交信号在染色体上的差异可作为一种特异性分子标记来研究种间关系,能有效地反映种属间的分化程度^[16],为研究基因组分子和染色体水平上的进化提供线索^[17]。因此,本研究中所获得的45S rDNA位点信息可为巴西橡胶树热研7-33-97染色体识别提供新的标记,一定程度上提高鉴别同源染色体的准确性,使得核型分析的结果更加精准可靠。

参考文献:

- [1] 李扬汉. 植物学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1989.
- [2] 黄华孙,梁茂寰,吴云通等. 中规模推广级橡胶树优良品种热研7-33-97的选育[J]. 热带作物学报,1994,15(2):1-6.
- [3] 魏芳,校现周. 巴西橡胶树热研7-33-97、PR107、RRIM600生理特性比较[J]. 安徽农业科学,2008,36(18):7561-7563.
- [4] 王少明,徐扬川,罗世巧等. 橡胶树优良品种热研7-33-97在海南中部山区适应性研究[J]. 热带农业科学,2009,29(6):1-4.
- [5] 吴明,罗世巧,校现周. 橡胶树新品种热研7-33-97早刺激产量和生理效应研究初报[J]. 云南热作科技,2000,23(3):1-4,12.
- [6] PEDERSEN C, LINDE-LAURSEN I. Chromosomal locations of four minor rDNA loci and a marker microsatellite sequence in barley[J]. Chromosome Res.,1994,2(1):65-71.
- [7] SHE C W, SONG Y C. Progress of plant FISH technique and its applications in the analysis of plant genome[J]. Wuhan Bot. Res.,2006,24(4):365-376.
- [8] 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.
- [9] LEITCH A R, LIM K Y, LEITCH I J, et al. Molecular cytogenetic studies in rubber, *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. (Euphorbiaceae)[J]. Genome,1998,41:464-467.
- [10] 高和琼,庄南生,王英等. 橡胶树两个品种的核型分析[J]. 武汉植物学研究,2009,27(5):537-540.
- [11] 高和琼. 巴西橡胶树 *HbMybl* 基因和 OPV-40390 连锁标记原位 PCR 定位研究[D]. 海口:海南大学,2008.
- [12] MCCLINTOCK B. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays* [J]. Zeitschrift für Zellforschung and Mikroskopische Anatomie,1934,21(2):294-326.
- [13] FUKUI K, OHMIDO N, KHUSH G S. Variability in rDNA loci in the genus *Oryza* detected through fluorescence in situ hybridization[J]. Genet,1994,87(8):893-899.
- [14] 余朝文,宋运淳. 植物45S rDNA的染色体位置的CPD染色和FISH分析[J]. 广西植物,2008,28(4):515-520.
- [15] 张寿洲,卢宝荣,洪德元. 原位杂交技术在稻属研究中的应用[J]. 植物分类学报,1998,36(1):87-96.
- [16] THOMAS H M, HARPER J A, MORGAN W G. Gross chromosome rearrangements are occurring in an accession of the grass *Lolium rigidum* [J]. Chromosome Research,2001,9(7):585-590.
- [17] TAKETA S, HARRISON G E, HESLOP-HARRISON J S. Comparative physical mapping of the 5S and 18S-25S rDNA in nine wild *Hordeum* species and cytotypes [J]. Theoretical and Applied Genetics,1999,98(1):1-9.

(下转第268页)

The Functional Study of a Type III Effector Protein *XopR* in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

ZHANG Qiaoling , RONG Wei , LI Huiping , LIN Daozhe , HE Chaozu

(Hainan Key Laboratory of Sustainable Utilization of Tropical bioresources , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*(*Xcc*) is the causal agent of black rot disease on cruciferous plants. *Xcc* deliver many effector proteins into host plant cells via the type III secretion system to help its infection and multiplication. In this study , the expression and regulation of *XopR* gene were analyzed through qRT-PCR. The results showed that the *XopR* gene transcription was regulated by the type III regulator of HrpG and HrpX , and the *XopR* protein secretion was type III secretion system dependent , indicating that *XopR* was a type III effector protein of *Xcc8004*. In addition , a *XopR* gene deletion mutant (*Xcc8004* Δ *XopR*) was generated , and the disease symptoms caused by Δ *XopR* strain were decreased on Zhonggan15 , Zhonggan21 , Zhongbai83 in contrast with WT *Xcc8004* , suggesting that *XopR* was required for the full virulence of *Xcc8004* on Cabbage host plants. Furthermore , *XopR* was proved to located in plant plasma membrane in Arabidopsis protoplasts cells by *XopR*-GFP fusion assay. The expression of PTI marker gene *FRK1* :: *LUC* was inhibited by *XopR* protein , which was consistent with the *XopR* function in *Xoo* strains.

Key words: *Xcc8004*; type III secretion system; *XopR* gene

(上接第 249 页)

Chromosomal Localization and FISH Analysis of 45S rDNA on *Hevea* Clone Reyan 7-33-97

TANG Bingxia^{1,2} , WANG Ying¹ , GAO Heqiong¹ , ZHUANG Nansheng¹

(1. College of Agronomy , Hainan University / Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresource , Haikou 570228 , China;

2. Rubber Research Institute , Chinese Academy of Topical Agricultural Sciences , Danzhou 571737 , China)

Abstract: The position and number of 45S rDNA on mitotic chromosomes of the young leaf collected from the rubber tree of Clone Reyan7-33-97 (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) at the bronze leaf stage were detected by using fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis with 45S rDNA from wheat as a probe. Four hybridization signals with different sizes and strength were found in different mitotic phases. According to the karyotype analysis , the loci of 4 signals were found on chromosomes pairs 6 and 7. A small faint signal was detected at the secondary constriction of one member of chromosome pair 6 , and a large strong signal was detected at the secondary constriction and satellite of another member of chromosome pair 6. The other two signals with their sizes and strength between those of the members of chromosome pair 6 were all detected at the secondary constriction and satellite of chromosome pair 7.

Key words: *Hevea brasiliensis*; Reyan7-33-97; fluorescence in situ hybridization; 45S rDNA