

# 利用 45S rDNA 探针对宽叶野生稻 和高秆野生稻基因组的 FISH 分析

周会<sup>1</sup> 蓝伟侦<sup>1,2</sup> 覃瑞<sup>1</sup> 刘虹<sup>1</sup> 李刚<sup>1</sup>

1. 中南民族大学生命科学院/武陵山区特色资源植物保护与利用湖北省重点实验室, 武汉 430074;

2. 浙江省武义县第三中学, 金华 321000

**摘要** 利用 45S rDNA 作为探针, 通过荧光原位杂交(FISH)技术对同样含有 CCDD 基因组的高秆野生稻 (*Oryza alta*) 和宽叶野生稻 (*O. latifolia*) 进行 rDNA 的荧光原位杂交定位分析和核型分析。结果显示: 宽叶野生稻中 45S rDNA 信号分布于多条染色体上, 位点数目为 10~16; 高秆野生稻中有 6 个信号点, 分布于 3 对同源染色体上, 其中 2 对信号位点位于染色体短臂, 1 对位于染色体长臂。研究结果表明, 高秆野生稻 45S rDNA 在基因组中位点数目稳定, 宽叶野生稻中 45S rDNA 位点数在不同个体中呈现一定的动态变化, 显示这 2 种野生稻基因组存在一定差异; 核型分析结果也表明二者基因组存在较大的差异。由此推测, 高秆野生稻分化较早而趋向稳定, 宽叶野生稻可能形成较晚, 还处于进化过程之中。鉴于二者在基因组结构上的明显差异和进化上的不平衡性, 建议把这 2 种野生稻划分为不同野生稻种, 可能会更加符合二者的进化特性。同时, 讨论了 45S rDNA 在染色体中分布特点与机制。

**关键词** 45S rDNA; 荧光原位杂交; 高秆野生稻; 宽叶野生稻

**中图分类号** S 511.902.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)03-0001-07

稻属 (*Oryza*) 被分为栽培稻复合体、药用野生稻复合体、马来野生稻复合体和疣粒野生稻复合体。药用野生稻复合体中的高秆野生稻和宽叶野生稻同属于 CCDD 基因组型, 为异源多倍体, 具有抗虫、抗病、抗逆等多种优良特性。但是, 人们对这 2 个种的划分一直存在争议。有些学者认为两者在地理分布和形态特征等方面都极为相似, 生殖隔离不显著, 在减数分裂过程中染色体组之间又可以正常地联会配对, 因此, 倾向于将高秆野生稻和宽叶野生稻划分为同一个种<sup>[1]</sup>。但是, 许多分子生物学领域的相关研究 (AFLP 标记、RFLP 标记、重复序列和核糖体 ITS 序列的研究等)、同工酶研究、细胞生物学研究 (Cot-1 DNA 杂交、基因组杂交) 都证明二者在稻属系统进化树上有着明显的不同<sup>[2-4]</sup>。为了利用有限的资源来更好地保护和利用这些野生稻遗传资源, 需要有更多的研究证据来澄清二者之间的遗传关系。

45S rDNA 属于中高度重复序列, 而中高度重复序列的变异可以用来研究物种的分化和基因组的

起源, 从而以此来确定其原始祖先, 并且可以建立不同物种基因组之间的进化树。中高度重复序列 (包括 45S rDNA) 之所以有此用途是因为中高度重复序列中所含有的基因较少或多为重复基因, 在进化的过程中发生的基因突变不至于产生致死效应, 因而受到的选择压力比较小。在这些区域发生的变异能够逐步累积, 并形成了种属内部物种之间的差异性。通常发生在保守序列如功能基因区的变异容易引起致死效应, 其变异较少能得到遗传和保留。因此, 相对于在进化上较为保守的单拷贝和低拷贝序列, 中高度重复序列更适合用于研究亲缘关系较近、变异较小的物种基因组之间的变异关系。

植物遗传资源研究中常通过 rDNA 的荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 定位技术来获取相应的信息以进行染色体的结构变化、近缘种属的系统学关系和异源多倍体的起源等与进化相联系的研究<sup>[5-7]</sup>。通过 45S rDNA 的荧光原位杂交技术发现, 在小麦近缘种之间 rDNA 位点

收稿日期: 2014-08-07

基金项目: 湖北省自然科学基金重点项目 (BZZ11004)

周会, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学与细胞遗传学. E-mail: jingxuedanlanxiao@163.com

通信作者: 李刚, 博士, 副教授, 研究方向: 植物分子生物学与细胞遗传学. E-mail: lglg863@163.com

在染色体上的位置一般是稳定的,其原始种和它们衍生的多倍体种在经历长时间的平行进化后 rDNA 在染色体上的位置仍然保持稳定。且通过此技术发现,芸苔属中在 3 个具有 A、B 和 C 基因组的基本二倍体中其 45S rDNA 位点数分别为 5 对、3 对和 2 对<sup>[8]</sup>。Shishido 等<sup>[9]</sup>用 FISH 技术分析了栽培稻和野生稻不同基因组间 45S rDNA 的位置和数目,发现其 rDNA 的位点和数目都存在一些变化,如稻属(*Oryza*)中的 6 个二倍体种的 rDNA 位点数在 1 至 3 对间波动,rDNA 重复单位的拷贝数和 rDNA 位点所在染色体上的位置也存在变化<sup>[10]</sup>。栽培稻中的粳稻(*O. sativa* ssp. *japonica*)仅有 1 对 45S rDNA 位点,而籼稻(*O. sativa* ssp. *indica*)有 2 对 45S rDNA 位点。

本研究利用 45S rDNA 探针分别对高秆野生稻(CCDD)和宽叶野生稻(CCDD)进行荧光原位杂交及核型分析,比较 45S rDNA 在二者染色体上的数目和位置变化,同时探讨 45S rDNA 异源多倍体在进化中的作用、进化上的特点以及异源四倍体可能的起源和进化机制;比较分析高秆野生稻和宽叶野生稻 2 种异源四倍体基因组中 45S rDNA 的数目、大小、位置等分布情况的差异,旨在为它们一直以来颇具争议的分类地位的划分提供相应的证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源与特征

宽叶野生稻(*O. latifolia*)材料 IRW6 和高秆野生稻(*O. alta*)材料 IRW41 由华南农业大学卢永根院士提供。45S rDNA 质粒由华中科技大学熊志勇博士提供。野生稻栽种于瓷缸中,按常规方法种植,生长旺盛的植株用于剪取根尖制备染色体制片。

### 1.2 染色体标本制备

清水洗净高秆野生稻和宽叶野生稻根尖,用刀片切取生长旺盛的根尖 1~2 mm,置于洁净 1.5 mL 离心管中,用 0.075 mmol/L KCl 溶液低渗处理 30 min。甲醇:冰醋酸(V:V=3:1)固定液固定过夜,再用双蒸水清洗根尖 3~5 次,每次 5 min。将洗净的根尖置于 2%的果胶酶和 2%的纤维素酶的等体积混合酶液中,在 28℃培养箱里酶解 3~4 h。酶解后的根尖用双蒸水后低渗处理 30 min,最后利用火焰干燥法制片。经过显微镜初步检测染色体分裂相较好的制片用封口膜密封后储存于-20℃冰箱备用。

### 1.3 荧光原位杂交

对染色体制片先进行预处理:在 60℃烘箱中烘片 1 h,10 μg/mL 的 RNaseA 溶液在 37℃下酶解处理 1 h,4%多聚甲醛室温下处理 10 min。然后进行变性处理:用 2×SSC 溶液室温下处理 5 min,重复 1 次;70%甲酰胺溶液在 70℃下处理 3.5 min,迅速放入-20℃冰冷的 70%、95%、100%乙醇中各处理 5 min,将染色体制片置于超净工作台,室温下通风充分干燥。杂交处理:将新配制的杂交液(45S rDNA 探针 100 ng,50%去离子甲酰胺,ssDNA 2 μg,10% 20×SSC,0.1% SDS)在 90℃下变性 10 min,然后迅速在冰上放置 20 min 以上;取变性后的 50 μL 杂交液滴在染色体制片上,盖上盖玻片,放入保湿皿中;在 80℃烘箱中共变性 10 min 后置于 37℃培养箱中温育 24 h 左右。

### 1.4 信号检测

杂交后的染色体制片处理与荧光信号检测步骤如下:42℃下 20%甲酰胺溶液洗片 10 min,2×SSC 溶液洗 10 min,0.2×SSC 溶液洗 10 min;室温条件下 1×PBS 溶液洗 10 min,空气中沥干染色体制片。然后在每张片上滴加 50 μL 0.008 mg/mL 新配制的链亲和素-Cy3(streptavidin-Cy3)溶液,盖上盖玻片,放入保湿皿于 37℃培养箱中温育 1 h。取出制片在室温、黑暗条件下用 1×PBS 溶液洗 3 次,每次 5 min。沥干后每张片滴加 50 μL 0.008 mg/mL 的生物素链亲和素(biotinylated streptavidin)溶液,保湿皿中 37℃温育 1 h。取出制片用 1×PBS 室温下洗 3 min 后,重复用链亲和素-Cy3 溶液温育 1 h。再次用 1×PBS 室温下洗 3×5 min 后,每张制片在黑暗环境中滴加 50 μL 10 μg/mL DAPI 染液进行复染。最后在 OLYMPUSBX61 显微镜下进行荧光观察,100 倍物镜下,用 Case Data Manager Expo2. 1.1 图像系统控制的 Cool-1300QSCCD(VDS, Germany)照相系统获取相应图片,然后用 FISH View EX-PO2.0 和 Photoshop 软件进行图片处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 中期染色体制片的 FISH 分析

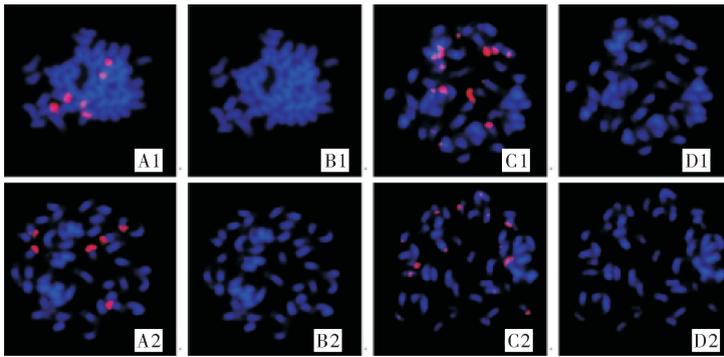
以生物素标记的 45S rDNA 为探针,对高秆野生稻和宽叶野生稻根尖分生区细胞的中期染色体制片进行荧光原位杂交(FISH)分析(图 1),45S rDNA 探针用链亲和素-Cy3 检测为红色信号,染色体用 DAPI 复染后显示为蓝色。

对每个植株分别制备 5 张较好的染色体制片进行染色体计数,结果显示高秆野生稻染色体和宽叶野生稻染色体均为 48 条(图 1)。然而,45S rDNA 在这 2 种染色体组上的杂交信号数目有较大的差异。高秆野生稻染色体制片中 45S rDNA 信号都为 6 个(图 1A1-A2),而不同植株宽叶野生稻染色体制片中 45S rDNA 信号数目不定,图 1C1 上 45S rDNA 信号为 16 个,图 1C2 上 45S rDNA 信号为 13 个。对 12 个不同植株的染色体制片进行分析,发现信号点数目最少的为 10 个,最多的为 16 个,其中出

现 13 个和 14 个信号点的次数较多,分别为 4 株和 3 株。统计结果表明宽叶野生稻染色体上 45S rDNA 信号点的数目在 10~16 个之间变动。

### 2.2 45S rDNA 在 2 种染色体组上的分布特征

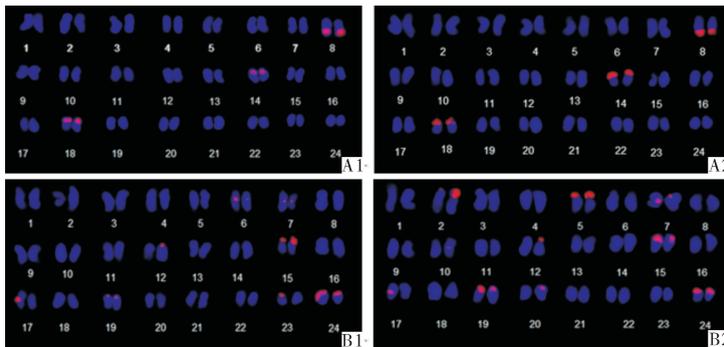
以 FISH 图像为依据,使用 FISHView EX-PO2.0 软件将染色体逐条分离出来,再用 SPOT advanced 软件曲线测量法测量染色体的长度,同时利用 Photoshop 软件对图片进行相应处理,并分别对高秆野生稻和宽叶野生稻染色体由长到短进行配对和排序。



A1, A2:45S rDNA 对高秆野生稻染色体的杂交信号图;B1, B2:高秆野生稻染色体的 DAPI 复染图;C1, C2:45S rDNA 对宽叶野生稻染色体的杂交信号图;D1, D2:宽叶野生稻染色体的 DAPI 复染图。A1, A2:Hybrid signals of 45S rDNA on the *O. alta* chromosomes; B1, B2:DAPI counterstained *O. alta* chromosomes; C1, C2:Hybrid signals of 45S rDNA on the *O. latifolia* chromosomes; D1, D2:DAPI counterstained *O. latifolia* chromosomes.

图 1 45S rDNA 对高秆野生稻和宽叶野生稻染色体制片的 FISH 分析

Fig. 1 FISH analysis with 45S rDNA on the chromosomes prepares of *O. latifolia* and *O. alta*



A1, A2:高秆野生稻的核型图 ; B1, B2:宽叶野生稻的核型图。A1, A2:Karyogram of *O. alta*; B1, B2:Karyogram of *O. latifolia*.

图 2 45S rDNA 对高秆野生稻和宽叶野生稻的核型图

Fig. 2 Karyogram of *Oryza latifolia* and *Oryza alta* with 45S rDNA signals

从图 2 可以看出,45S rDNA 信号在高秆野生稻与宽叶野生稻染色体上的红色信号相对集中地分布在染色体的着丝粒、近着丝粒和端粒区。比较两者的核型图,发现 45S rDNA 在染色体上的分布存在差异,各自具有特异的带型;高秆野生稻染色体上的信号点相对少一些,主要分布在端粒附近,并且高

秆野生稻染色体上的 6 个杂交信号点分布在 3 对同源染色体上,其中有 2 对位于染色体短臂,1 对位于染色体长臂;宽叶野生稻染色体中杂交信号为 10~16 个不等,信号带在染色体的短臂、长臂、着丝粒及其附近都有分布;短臂末端处分布较多,有 9 个左右,近着丝粒处有 2~3 个,着丝粒处有 2~3 个;而

且宽叶野生稻的 45S rDNA 的信号点并非都是成对分布的,一些染色体对中只有 1 个有杂交信号,并且有的成对的染色体中杂交信号强弱不一致,表明同源染色体上 45S rDNA 分布不均匀。高秆野生稻和宽叶野生稻中核型的不同,表明 2 个物种的中高度重复序列的分布存在差异。重复序列在高秆野生稻染色体上的分布显示出稳定的带型,从一定程度上说明高秆野生稻这个物种较早趋于稳定。对于宽叶野生稻来讲,45S rDNA 的信号点位置、数目都不固定。

表 1 高秆野生稻和宽叶野生稻的核型分析<sup>1)</sup>

Table 1 Karyotype analysis of *O. latifolia* and *O. alta*

编号 No.	高秆野生稻 <i>O. latifolia</i>				宽叶野生稻 <i>O. alta</i>			
	长臂相对长度/%	短臂相对长度/%	相对全长/%	臂比	长臂相对长度/%	短臂相对长度/%	相对全长/%	臂比
	LRL±SD	SRL±SD	TRL±SD	AR±SD	LRL±SD	SRL±SD	TRL±SD	AR±SD
1	29.00±3.42	23.37±2.77	52.37±5.71	1.24±0.12	30.50±4.60	24.37±4.47	54.87±7.68	1.25±0.24
2	25.75±1.58	22.62±2.13	48.37±2.56	1.13±0.15	31.62±8.31	21.25±6.02	52.87±7.22	1.48±1.02
3	25.50±2.33	19.87±3.27	45.37±2.92	1.28±0.39	27.62±4.00	20.25±4.13	47.87±5.06	1.36±0.38
4	24.25±1.49	19.62±2.97	43.87±3.72	1.23±0.19	29.25±4.77	17.25±4.13	46.50±6.05	1.69±0.54
5	23.62±2.77	19.50±3.25	43.12±3.70	1.21±0.34	25.25±4.27	20.25±2.92	45.50±6.00	1.24±0.23
6	22.37±1.60	19.00±2.62	41.37±3.62	1.17±0.14	25.75±3.45	19.62±4.41	45.37±6.44	1.31±0.29
7	22.87±3.36	16.75±2.71	39.62±4.31	1.36±0.35	25.50±4.14	19.37±3.85	44.87±3.76	1.31±0.53
8	22.75±2.66	16.75±3.65	39.50±2.10	1.35±0.56	25.12±1.25	18.87±4.29	44.00±4.69	1.33±0.47
9	20.25±2.66	16.62±1.69	36.87±2.83	1.21±0.28	24.75±3.77	17.87±3.36	42.62±3.93	1.38±0.48
10	19.62±1.92	15.37±2.62	35.00±2.03	1.27±0.37	23.37±4.37	18.62±2.97	42.00±3.85	1.25±0.51
11	19.75±1.28	15.00±1.77	34.75±1.75	1.31±0.21	22.87±1.73	17.50±1.93	40.37±2.26	1.30±0.21
12	19.62±1.60	14.25±1.28	33.87±2.03	1.37±0.16	21.75±2.66	17.50±2.20	39.25±3.77	1.24±0.20
13	17.75±1.39	15.37±1.85	33.12±2.70	1.15±0.14	21.50±2.27	17.50±2.98	39.00±4.84	1.22±0.16
14	18.37±3.02	14.37±0.74	32.75±3.45	1.27±0.18	22.25±2.82	16.50±2.07	38.75±3.62	1.34±0.27
15	17.00±1.77	14.62±1.91	31.62±2.66	1.16±0.26	21.75±3.11	16.75±3.01	38.50±4.47	1.29±0.31
16	17.62±1.77	13.87±1.60	31.50±2.97	1.27±0.12	20.87±2.53	17.62±1.77	38.50±3.96	1.18±0.11
17	18.00±2.33	13.75±2.17	31.75±2.56	1.30±0.36	20.62±2.88	16.75±2.25	37.37±4.37	1.23±0.18
18	15.62±1.77	14.37±2.42	30.00±3.11	1.08±0.33	21.50±3.89	14.75±1.75	36.25±3.73	1.45±0.35
19	16.50±1.85	13.87±1.51	30.37±3.25	1.18±0.06	20.00±2.56	15.62±2.07	35.62±3.54	1.28±0.23
20	17.00±2.39	12.75±2.12	29.75±2.12	1.33±0.39	20.50±4.34	14.37±4.44	34.87±3.76	1.42±0.97
21	16.50±2.20	12.75±2.49	29.25±3.41	1.29±0.33	18.75±2.38	15.25±1.75	34.00±3.38	1.22±0.17
22	15.87±2.53	12.37±2.50	28.25±3.45	1.28±0.38	17.62±2.50	14.87±1.36	32.50±3.59	1.18±0.12
23	15.00±1.51	11.25±1.98	26.25±2.76	1.33±0.25	17.62±2.39	13.00±1.60	30.62±2.92	1.35±0.24
24	13.75±0.71	11.62±2.07	25.37±2.45	1.18±0.25	14.62±2.20	11.37±2.07	26.00±3.30	1.28±0.30

1) LRL: Long arm relative length; SD: Standard deviation; SRL: Short arm relative length; TRL: Total arm relative length; AR: Ratio of arms (Long arm/short arm).

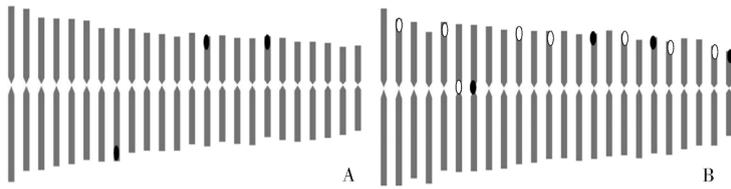
从表 1 可以看出,宽叶野生稻的染色体相对长度普遍比高秆野生稻染色体的相对长度要长(0.63~6.88)。例如,高秆野生稻 24 号染色体相对全长为 25.37,宽叶野生稻 24 号染色体相对全长为 26.00%,相差最小,为 0.63;高秆野生稻 15 号染色体相对全长为 31.62%,宽叶野生稻 10 号染色体相对全长为 38.5%,相差最大,为 6.88。从一定程度上说明了这 2 套基因组的对应染色体之间是有差异的,从总体上看宽叶野生稻染色体相对较长,应当还处于进化的较早时期。而高秆野生稻的染色体普遍较短,应当更加趋向于进化的稳定期。

## 2.3 2 种野生稻的染色体核型模式图分析

分别统计 5 张高秆野生稻染色体的 45S rDNA 探针杂交图片和宽叶野生稻染色体 45S rDNA 杂交图片,利用 Photoshop 软件分别对二者每条染色体进行编号,SPOT advanced 软件曲线测量法测量每条染色体的相对全长、长臂相对长度,短臂相对长度,同时利用 Excel 软件对相关的数据进行分析统计,并结合染色体形态对高秆野生稻和宽叶野生稻染色体由长到短配对、编号、记录数据(表 1)。

根据染色体的长度、形态、信号分布将配对好的染色体由长到短排序,长度相同的短臂较短的在前,运用 Excel 软件获得染色体模式图(图 3)。

由图 3A 可以看出,45S rDNA 探针对高秆野生稻染色体杂交的 3 对信号分别位于第 8 号染色体的长臂、14 号染色体的短臂、18 号染色体的短臂;其染色体相对长度分别为 39.50、32.75、30.00。由图 3B 可以看出,45S rDNA 对宽叶野生稻染色体杂交有 4 对信号是稳定的,他们分别位于第 7 号染色体着丝粒,第 15、19、24 对染色体短臂;其染色体相对长度分别为 44.87、38.50、35.62、26.00。不稳定信



A:45S rDNA 对高秆野生稻的核型模式图; B:45S rDNA 对宽叶野生稻的核型模式图;从左到右依次为 1~24 号染色体,黑色椭圆表示稳定分布的 45S rDNA 信号点,灰色椭圆表示不稳定分布的 45S rDNA 信号点。A:45S rDNA karyogram mode pattern of *O. alta*; B:45S rDNA karyogram mode pattern of *O. latifolia*; the chromosomes from left to right were numbered chromosome 1 to 24; black ovals represent stable 45S rDNA signal points,gray ovals represent instability 45S rDNA signal points.

图3 45S rDNA 对高秆野生稻和宽叶野生稻的核型模式图

Fig.3 Karyogram pattern of *O. latifolia* and *O. alta* with 45S rDNA signals

号有成对出现的(即出现在同源染色体上)如图 2B1 中第 6 对染色体着丝粒区出现的 45S rDNA 信号,图 2B2 中的第 2 和第 5 对染色体端粒区出现的 45S rDNA 信号;也有单个出现的,如图 2B1 中的第 12、15、23 对染色体上,图 2B2 中的第 10、12、17、20 对染色体上,且二者的信号存在的位置不在同一编号的染色体上,进一步体现了二者的差异性。

### 3 讨论

高秆野生稻和宽叶野生稻同属于稻属药用野生稻复合体,且都为异源四倍体,原分布于拉丁美洲,基因组的类型都为 CCDD 组型。然而,对于是否把它们划分为同一个种一直存在着争议。有些学者认为应将这 2 种野生稻划分为同一个种<sup>[1]</sup>,但是,许多研究(Cot-1 DNA 杂交、基因组杂交)都证明高秆野生稻和宽叶野生稻在进化方面存在着明显的差异<sup>[2-4]</sup>,且有研究表明宽叶野生稻的叶绿体 DNA 与高秆野生稻的也有所不同<sup>[11]</sup>。蓝伟侦等<sup>[12]</sup>利用药用野生稻的 C 基因组的 Cot-1 DNA 对高秆野生稻和宽叶野生稻的 CCDD 基因组进行了 FISH 分析,结果表明中高度重复序列在两者基因组的分布上有着明显的差异,特别是两者的 D 基因组存在着较大的差异;高秆野生稻染色体杂交信号比较稳定,且纯合度高;宽叶野生稻染色体杂交信号非但不稳定且纯合度较低。王德彬等<sup>[13]</sup>利用高秆野生稻 CCDD 基因组的 Cot-1 DNA 作为探针,对高秆野生稻自身体细胞的染色体与宽叶野生稻体细胞的染色体进行 FISH 分析和核型的同源性聚类分析,发现宽叶野生稻和高秆野生稻的同源性较高,但是区别也非常明显,两者的杂交信号存在着显著差异。本研究分析了 45S rDNA 探针信号在 2 种野生稻染色体中的数目和分布上的差异,进一步从细胞学上证明了

二者在遗传进化关系上的差异性。

45S rDNA 是基因组中的中度重复序列,在不同物种中存在着较高的同源性。不同学者利用 FISH 技术对不同物种的 rDNA 位点数的研究结果表明,大多数二倍体物种均具有 2 个 45S rDNA 位点,但有些二倍体有多个 rDNA 位点。例如,在栽培稻不同亚种中 45S rDNA 位点数目存在差异,籼稻为 2 个,而粳稻为 4 个。而在不同种野生稻中的 45S rDNA 位点数目有较大的变异,位点数为 4~14 个。Shishido 等<sup>[10]</sup>的报道指出四倍体物种的 rDNA 位点数并不是二倍体 rDNA 位点数的简单加倍也说明了这一点。本研究对四倍体的高秆野生稻和宽叶野生稻进行了 45S rDNA 位点数目分析,在高秆野生稻(CCDD)的染色体上检测到 6 个(3 对)rDNA 位点,数目稳定,而且都位于染色体端部。而宽叶野生稻(CCDD)的 45S rDNA 位点数多达 10~16 个,其中只有 8 个(4 对)位点是固定的,大约 9 个位点位于染色体短臂末端,2~3 个在近着丝粒区,2~3 个在着丝粒区。这与吴绮等<sup>[14]</sup>的研究中显示的部分中高度重复序列在异源多倍体基因组中的分布不稳定、并呈现细微变化这一结论一致。此外,董正伟<sup>[15]</sup>的研究也表明,在宽叶野生稻的染色体中 45S rDNA 位点呈现出多态性,大约有 10~14 个位点,与本研究结果(10~16 个)略有差异,推测可能是由于所用原位杂交方法及检测的灵敏度的差异所致。本研究中,高秆野生稻和宽叶野生稻同为 CCDD 基因组型,两者之间的 45S rDNA 位点数却存在以上明显的差异,显示了两者的内部结构及组成存在着较大的差异。

已有研究表明多倍体物种在进化的过程中 45S rDNA 的基因座位点数总体倾向于不断减少<sup>[16]</sup>。本研究发现不仅宽叶野生稻平均染色体长度大于高

秆野生稻染色体的长度,而且其45S rDNA位点数较多,数目不稳定;高秆野生稻的45S rDNA位点数稳定为3对,且高秆野生稻45S rDNA的纯合度明显高于宽叶野生稻。由此推测,高秆野生稻的形成和定型早于宽叶野生稻,宽叶野生稻的45S rDNA的基因座总体可能正处于消减的过程中,或许在漫长的将来其45S rDNA的基因座将慢慢地趋向于稳定。尽管高秆野生稻和宽叶野生稻在形态学和染色体行为上有相似之处,鉴于二者在基因组结构上的较大差异,而且从进化上也具有不平衡性,因此,本研究认为把二者划分为不同野生稻种将更加符合二者的进化特性。

由图3A、B可以看出,高秆野生稻和宽叶野生稻45S rDNA在各基因组中的数目虽然不同,但它们在染色体上的分布位置大都相同,且大多都分布在染色体的近端部,并且主要分布在短臂的近端部处。45S rDNA在染色体上的位置对45S rDNA的进化速率有着密切的影响,与近端部45S rDNA序列相比,染色体中部的45S rDNA具有较高的易变性,纯合度也相对较低;45S rDNA信号倾向于分布在染色体短臂的末端,这一特征可能与其特定的功能有关,此特点也有可能是45S rDNA数目改变的原因之一<sup>[17]</sup>。宽叶野生稻染色体中大多数45S rDNA位点在染色体端部或近端部,而且信号点不成对分布的较多。一些染色体对中只有1个有杂交信号,而且有的成对的染色体中杂交信号强弱不一致,表明同源染色体上45S rDNA分布不均匀,可能是由于减数分裂时不对等交换引起的,这些进一步说明其还处于不断进化当中。染色体重排、不等交换(缺失、添加)、由转座子引起的隐蔽rDNA拷贝数的扩增都会导致染色体结构的改变,这些改变发生在短臂末端可能引起45S rDNA数目的改变。Altinkut等<sup>[18]</sup>在水稻中发现En/Spm转座子存在于45S rDNA之中,此转座子引起的拷贝数的改变可能是45S rDNA数目和位置改变的原因之一。Lima等<sup>[19]</sup>分析了700多个种的核仁组织区,发现有87%的种的核仁组织区都位于染色体的短臂上,在形态上一般表现为染色体的次缢痕,推断出45S rDNA参与核仁组织区(NOR)的构成。Lim等<sup>[20]</sup>、Mantovan等<sup>[17]</sup>的研究同样都认为45S rDNA分布在染色体末端的这种位置特征可能和其功能有关。Fransz等<sup>[21]</sup>发现在间期细胞核中,常染色质与异染色质都具有特定的空间结构,且这种特定的结构能够使基

因的表达调控更顺利地实现。45S rDNA是否是受到某种特定的空间结构的制约而倾向于特异性地分布在染色体的端部还有待于进一步的研究。以上的结果表明,45S rDNA在高秆野生稻与宽叶野生稻中进化的不同步性、重复序列位点还存在着杂合性以及45S rDNA多分布在染色体端部的具体机制还需进一步研究,从而澄清多倍体植物的起源和进化机制。

## 参 考 文 献

- [1] GOPALAKRISHNAN R, SAMPATH S. Taxonomic status and origin of American tetraploid species of the series *latifolia* Tateoka in the genus *Oryza*[J]. Indian J Agric Sci, 1967, 37: 465-475.
- [2] BAO Y, GE S. Rapid communication-identification of *Oryza* species with the CD genome based on RFLP analysis of nuclear ribosomal ITS sequences[J]. Acta Bot Sin, 2003, 45(7): 752-756.
- [3] YAMAKI S, OHYANAGI H, YAMASAKI M, et al. Development of INDEL markers to discriminate all genome types rapidly in the genus *Oryza*[J]. Breeding Science, 2013, 63(3): 246.
- [4] TANG L, ZOU X, ACHOUNDONG G, et al. Phylogeny and biogeography of the rice tribe (*Oryzae*): evidence from combined analysis of 20 chloroplast fragments[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2010, 54(1): 266-277.
- [5] ZHANG D, SANG T. Chromosomal structural rearrangement of *Paeonia brownii* and *P. californica* revealed by fluorescence *in situ* hybridization[J]. Genome, 1998, 41(6): 848-853.
- [6] KITAMURA S, INOUE M, SHIKAZONO N, et al. Relationships among *Nicotiana* species revealed by the 5S rDNA spacer sequence and fluorescence *in situ* hybridization[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(5): 678-686.
- [7] 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.
- [8] FUKUI K, NAKAYAMA S, OHMIDO N, et al. Quantitative karyotyping of three diploid *Brassica* species by imaging methods and localization of 45S rDNA loci on the identified chromosomes [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 96(3/4): 325-330.
- [9] SHISHIDO R, SANO Y, FUKUI K. The third 45S rDNA locus in *O. eichingeri* (CC) newly detected by an improved FISH method[J]. Rice Genet Newslett, 1996, 13: 84-85.
- [10] SHISHIDO R, SANO Y, FUKUI K. Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes[J]. Molecular and General Genetics MGG, 2000, 263(4): 586-591.
- [11] BAO Y, GE S. Origin and phylogeny of *Oryza* species with the

- CD genome based on multiple-gene sequence data[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2004, 249(1/2): 55-66.
- [12] 蓝伟贞, 覃瑞, 李刚. 利用 C 基因组 Cot-1 DNA 比较分析稻属 A, B, C, D 基因组[J]. *科学通报*, 2006, 51(12): 1422-1431.
- [13] 王德彬, 王阳, 赵候明, 等. 利用 Cot-1 DNA 对高秆野生稻和宽叶野生稻基因组的比较分析[J]. *中国水稻科学*, 2010, 24(2): 131-136.
- [14] 吴绮, 覃瑞, 李刚, 等. 利用药用野生稻 C 基因组 Cot-1 DNA 比较分析宽叶野生稻 CCDD 基因组[J]. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(5): 589-592.
- [15] 董正伟. 利用重复序列对几种野生稻基因组的比较分析[D]. 武汉: 中南民族大学图书馆, 2008.
- [16] DVORAK J, BROWN A, CLEGG M T, et al. Evolution of multigene families; the ribosomal RNA loci of wheat and related species[M]//BROWN A H D, CLEGG M T, KAHLER A L, et al. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1990: 83-97.
- [17] MANTOVANI M, ABEL S, MOREIRA-FILHO O. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) [J]. *Genetica*, 2005, 123(3): 211-216.
- [18] ALTINKUT A, RASKINA O, NEVO E, et al. En/Spm-like transposons in *Poaceae* species; transposase sequence variability and chromosomal distribution[J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2006, 11(2): 214-229.
- [19] LIMA D E, FARIA A. The chromosome field[J]. *Hereditas*, 1976, 83(1): 1-22.
- [20] LIM K, WENNEKES J, DE -JONG J H, et al. Karyotype analysis of *Lilium longiflorum* and *Lilium rubellum* by chromosome banding and fluorescence *in situ* hybridisation[J]. *Genome*, 2001, 44(5): 911-918.
- [21] FRANSZ P, DE JONG J H, LYSAK M, et al. Interphase chromosomes in *Arabidopsis* are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(22): 14584-14589.

## FISH analyses of *Oryza latifolia* and *O. alta* genomes with 45S rDNA probes

ZHOU Hui<sup>1</sup> LAN Wei-zhen<sup>1,2</sup> QIN Rui<sup>1</sup> LIU Hong<sup>1</sup> LI Gang<sup>1</sup>

1. *Engineering Research Center for Protection and Utilization of Bioresources in Ethnic Area of Southern China/School of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;*

2. *The Third Middle School of Wuyi County in Zhejiang Province, Jinhua 321000, China*

**Abstract** 45S rDNA probes were used to analyze *Oryza alta* and *O. latifolia* both having CCDD genomes with fluorescence *in situ* hybridization. The results showed that the hybridization signals of 45S rDNA in *O. latifolia* chromosome preparations were distributed on different chromosomes with the number of 10-16. The same signal in *O. alta* chromosome preparations was 6 and distributed on the certain three pairs homologous chromosomes, with two pairs in short chromosome arms and the other one pair in long chromosome arm. The number and position of 45S rDNA signals were stabled in *O. alta* genome, but there were some dynamic changes of signals in *O. latifolia* genome. It is indicated that there were differences between these two kinds of CCDD genomes. Comparatively analyzing the karyotype of *O. alta* chromosomes and *O. latifolia* chromosomes based on the fluorescence *in situ* hybridization pictures showed that there were greater differences. It is proposed that *O. alta* maybe differentiate earlier and tend to be stable, while *O. latifolia* may be still in its evolutionary process. Based on the imbalance of evolution and differences of genomic structure, *O. alta* and *O. latifolia* were divided into two wild rice species, which may be well conformed with their evolutionary characteristics. The mechanism and characteristics of 45S rDNA's distribution in the chromosomes were discussed.

**Key words** 45S rDNA; fluorescence *in situ* hybridization; *Oryza alta*; *Oryza latifolia*