棉花 GISH-NOR 的初步探讨

刘三宏 王坤波* 宋国立 王春英 刘 方 黎绍惠 张香娣 王玉红

(中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点实验室, 安阳 455112. * 联系人, E-mail: wkbcri@public.ayptt.ha.cn,
wkbcri@cricaas.com.cn)

摘要 在以棉花基因组 DNA(gDNA)为探针的基因组原位杂交(genomic *in situ* hybridization, GISH)实验中, 观察到 6 个 NOR(nucleolar organizer region)信号. 在对草棉或陆地棉的同一有丝分裂细胞分别进行以 45S rDNA 和 gDNA 为探针的原位杂交中, 发现以 gDNA 为探针所产生的 NOR 信号与以 45S rDNA 为探针所产生的 NOR 信号在数目、位置以及大小方面极其相似甚至相同, 由此将以 gDNA 为探针所产生的 NOR 命名为 GISH-NOR. 在棉花 GISH-NOR 中, 陆地棉和雷蒙德氏棉全部为端部类型 GISH-NOR, 而对于草棉变种阿非利加棉则为 4 个端部类型和 2 个着丝粒类型 GISH-NOR. 陆地棉 6 个 GISH-NOR 中的 2 个位于 A 亚组染色体上, 其余的 4 个位于 D 亚组染色体上. 在以雷蒙德氏棉为靶 DNA, 以其本身 gDNA 为探针的 GISH 中, 观察到 6 个 GISH-NOR 信号. 而在以阿非利加棉为靶 DNA, 以其本身 gDNA 为探针的 GISH 中, 没有观察到 GISH-NOR 信号, 并且有一对染色体长臂近一半区域不显示信号. 在以陆地棉为靶 DNA, 阿非利加棉为探针时发现, 如果用 D 基因组棉种作封阻, 则不出现 GISH-NOR 信号; 如果改用鲑鱼精 DNA 作封阻, 则出现 GISH-NOR 信号. 而在以 D 基因组二倍体棉种戴维逊氏棉为探针时, 即使用 A 基因组棉种作封阻, 也能观察到 6 个 GISH-NOR 信号. 对于这种现象, 可能由 2 种原因造成, 即 rDNA 的同步进化和 D 基因组棉种 gDNA 中的 rDNA 含量多于 A 基因组棉种. 此外, 还观察到陆地棉染色体上的所有 GISH-NOR 信号全都位于染色体短臂端部.

关键词 棉花 荧光原位杂交 基因组原位杂交 NOR 易位 同步进化

最新提出的分类系统将棉属(*Gossypium* L)分为 4 个亚属, 共 51 个种(亚种), 其中包括 46 个二倍体种($2n = 2X = 26$), 5 个四倍体棉种($2n = 4X = 52$)^[1]. 二倍体棉种的草棉(*G. herbaceum*)和亚洲棉(*G. arboreum*)、四倍体棉种的陆地棉(*G. hirsutum*)和海岛棉(*G. barbadense*)为栽培种, 其余 47 个种均为野生棉. 以前的研究已表明, A 和 D 染色体组棉种最有可能是四倍体棉种 A 亚组和 D 亚组的供体种. 四倍体棉种 A 亚组的供体种可能是草棉(*G. herbaceum*)或亚洲棉(*G. arboreum*), 雷蒙德氏棉最有可能四倍体棉种 D 亚组的供体种. 但是一些研究者认为, 瑟伯氏棉(*G. thurberi*)以及戴维逊氏棉(*G. davidsonii*)也可能是四倍体棉种 D 亚组的供体种^[2,3]. 目前, 一些新技术已被应用到棉花物种起源、演化和分类的研究中^[3~7]. 基因组原位杂交(genomic *in situ* hybridization, GISH)就是其中重要的一种, 其在研究多倍体植物起源与演化中以及种间基因组的同源关系等方面有着重要的作用^[8~9].

美国德克萨斯 A&M 大学的 David Stelly 博士在 1993 年开创了棉花荧光原位杂交(fluorescent *in situ* hybridization, FISH)研究, 不过其所用的靶细胞多数

是减数分裂中期细胞, 探针也多是 rDNA(ribosomal DNA), 很少进行以棉花的 GISH 研究^[10~12]. 棉花富含酚类和多糖等高分子次生化化合物, 妨碍了棉花基因组 DNA(genomic DNA, 简为 gDNA)的提取和纯化, 这可能是棉花 GISH 研究较落后的主要因素. 并且对棉花而言, 细胞质浓厚, 且染色体形态小且数目多, 给制片带来较大困难. 这些制约因素导致了棉花 FISH 研究落后于水稻、玉米和小麦等作物^[13~15]. 我们实验室在突破以上 2 个制约因素后, 获得了良好的实验结果^[16~19,22]. 在以 A 和 D 基因组二倍体棉种为探针、以其本身有丝分裂中期体细胞染色体以及四倍体棉种有丝分裂中期细胞为靶 DNA 的 GISH 实验中, 发现以 gDNA 为探针也能产生 NOR 信号, 并且此信号与以 45S rDNA 为探针所产生的 NOR 信号很相似甚至完全一样. 另外, 也观察到在以自身 gDNA 为探针所进行的 GISH 实验中, 杂交信号并不完全覆盖染色体.

1 材料与方法

为了讨论和描述的方便, 本文涉及的原位杂交组合均按照靶 DNA-探针-封阻 DNA 格式书写. 本文

中的实验组合为: 阿非利加棉(*G. herbaceum* var *africanum*)-雷蒙德氏棉 gDNA-鲑鱼精 DNA, 阿非利加棉-45S rDNA-鲑鱼精 DNA, 雷蒙德氏棉-雷蒙德氏棉 gDNA-鲑鱼精 DNA, 阿非利加棉-阿非利加棉 gDNA-鲑鱼精 DNA, TM-1-戴维逊氏棉 gDNA-阿非利加棉, TM-1-45S rDNA-鲑鱼精 DNA, TM-1-雷蒙德氏棉 gDNA-阿非利加棉, 中 16(中棉所 16, 简为中 16)-阿非利加棉 gDNA-戴维逊氏棉和中 16-阿非利加棉 gDNA-鲑鱼精 DNA. 实验用的种子和叶片材料全部取自于中国农业科学院棉花研究所海南野生棉种植园, 45S rDNA 探针由美国 Cornell 大学的 Dai 和 Wu 博士提供.

棉花 gDNA 的提取与纯化参照宋国立等人^[16]的方法, 纯化后的棉花基因组总 DNA 高压灭菌锅灭菌 10 min 打断, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查片段大小. 探针 DNA 所用的标记物为 DIG-11-dTUP, 采用德国 Roche 公司的 DIG-High-Prime 标记系统对其进行标记, 按其提供的标准流程操作. 体细胞染色体制备和荧光原位杂交参照 Wang^[17]和王春英等人^[18,19]的方法. 用安装有 CCD 摄像头 (Zeiss) 的 Leica MRA2 荧光显微镜观察荧光信号. 用 Photoshop 7.0 软件进行图版编排.

2 结果与分析

2.1 以二倍体棉种为靶 DNA 的 GISH-NOR

在阿非利加棉-雷蒙德氏棉 gDNA-鲑鱼精 DNA 的 GISH 实验中(图 1(a)), 观察到 6 个十分强烈的红色荧光信号, 将其与以往棉花或其他作物中以 45S rDNA 或 18S~28S rDNA 为探针所产生的 NOR 信号比较^[11,12,20], 发现两者极其相似, 故我们推测其为 NOR 信号. 为了证实这种推测, 我们先进行了阿非利加棉-45S rDNA-鲑鱼精 DNA 的 FISH(图 1(b)), 观察到有 6 条染色体显示 NOR 信号, 然后又对同一细胞进行了以雷蒙德氏棉 gDNA 为探针的 GISH(图 1(c)), 观察到的结果与以 45S rDNA 为探针的 FISH 结果完全一致, 由此将以 gDNA 为探针所产生的 NOR 命名为 GISH-NOR. 并且其中 4 个位于染色体短

臂的端部, 即“端部 NOR”, 2 个位于短臂的着丝点部位, 称之为“着丝点 NOR”(表 1), 这种现象尚未见诸报道. 此外, 还观察到, 即使使用鲑鱼精 DNA 作封阻, 也没有观察到染色体上有大量的弥散杂交信号出现, 仅仅看到了 6 个 GISH-NOR 信号(图 1(a)和(c)). 由此可知, 除 rDNA 序列外, 棉花 A 和 D 基因组经过漫长的分化, 其同源序列已经变得很少. 在雷蒙德氏棉-雷蒙德氏棉 gDNA-鲑鱼精 DNA 的 GISH 中, 同样观察到 6 个 GISH-NOR 信号, 但全部位于染色体短臂端部(图 1(d)), 这与阿非利加棉-雷蒙德氏棉 gDNA-鲑鱼精 DNA 中的 GISH-NOR 位置不同(表 1).

在阿非利加棉-阿非利加棉 gDNA-鲑鱼精 DNA 的 GISH 实验中(图 1(e)), 没有观察到 GISH-NOR 信号, 我们重复了多次实验, 并找了不同分裂时期的细胞进行对比, 都没有发现 GISH-NOR 信号. 从染色体其他部位的信号显示情况看, 应该不是探针的问题. 结合 Zhao 等人^[21]的结果可知, 阿非利加棉的 NOR 信号被在数量上占有绝对优势的散在重复序列信号“湮没”了. 此外, 观察到即使是以自身的基因组 DNA 为探针和自身的染色体杂交, 基本上每 1 条染色体的端部都没有被红色信号覆盖, 不知是什么原因导致这一现象的产生. 并且发现一对染色体的长臂的近一半区域不显示红色荧光信号, 该现象和前人以 A 基因组棉种 gDNA 为探针与四倍体棉种进行原位杂交时的结果一致^[22].

2.2 以四倍体棉种为靶 DNA 的 GISH-NOR

在以陆地棉有丝分裂中期细胞为靶 DNA 的 GISH 实验中(图 1(f)~(j)), 可以清晰地观察到 26 条显示红色荧光信号的染色体和 26 条显示蓝色荧光的染色体, 这与王坤波等人^[22]的 FISH 结果完全一致. 这一点直观地说明了陆地棉的确是一个双二倍体起源, 这与前人的研究结果一致^[2,3,23]. 另外, 还观察到 6 个十分强烈的信号, 并且 2 个位于 A 亚组染色体上, 4 个位于 D 亚组染色体上. 为了进一步证实此信号为 NOR 信号, 我们首先进行了以 TM-1 有丝分裂中期细胞为靶 DNA, 45S rDNA 为探针, 鲑鱼精 DNA 为封阻

表 1 二倍体棉种 GISH-NOR 数目以及种类

靶 DNA-探针-封阻 DNA	GISH-NOR 数目	GISH-NOR 种类
阿非利加棉-雷蒙德氏棉 gDNA-鲑鱼精 DNA	6	4 个为端部 NOR, 2 个为着丝点 NOR
雷蒙德氏棉-雷蒙德氏棉 gDNA-鲑鱼精 DNA	6	全部为端部 NOR
阿非利加棉-阿非利加棉 gDNA-鲑鱼精 DNA	0	-

图 1 棉花 GISH-NOR 结果

(a) 阿非利加棉-雷蒙德氏棉 gDNA-鲑鱼精 DNA 的 GISH 图. 箭头所示为 6 个 GISH-NOR 信号, 其中 4 个位于染色体短臂端部, 2 个位于着丝粒与短臂端部之间. (b) 阿非利加棉-45SrDNA-鲑鱼精 DNA 的 FISH 图. 箭头所示为 6 个 NOR 信号. (c) 对(b)中的同一分裂相进行以雷蒙德氏棉 gDNA 为探针的 GISH. 箭头所示为 6 个绿色荧光 NOR 信号(FITC), 信号显示情况与(b)一样. (d) 雷蒙德氏棉-雷蒙德氏棉 gDNA-鲑鱼精 DNA 的 GISH 图. 箭头所示为 GISH-NOR 信号. (e) 阿非利加棉-阿非利加棉 gDNA-鲑鱼精 DNA 的 GISH 图. 没有显示 GISH-NOR 信号, 箭头所示为 1 对染色体长臂不显示信号的区域. (f) TM-1-戴维逊氏棉 gDNA-阿非利加棉 gDNA 的 FISH 图. 箭头所示为 6 个 GISH-NOR 信号, 其中 2 个位于显示蓝色荧光的 A 亚组染色体上, 4 个位于显示红色荧光的 D 亚组染色体上. (g) TM-1-45SrDNA-鲑鱼精 DNA 的 FISH 图. 箭头所示为 6 个 NOR 信号. (h) 对(g)中的同一分裂相进行以雷蒙德氏棉 gDNA 为探针的 GISH. NOR 数目为 6 个, 且其中 2 个位于显示红色荧光的 A 亚组染色体上, 4 个位于显示绿色荧光(FITC)的 D 亚组染色体上. (i) 中 16-阿非利加棉 gDNA-戴维逊氏棉 gDNA 的 GISH 图. 箭头所示为 6 个 GISH-NOR 信号, 其中 2 个位于显示红色荧光的 A 亚组染色体上, 4 个位于蓝色荧光的 D 亚组染色体上. Bar = 10 μ m

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2005-50-5-443>

的 FISH, 观察到 6 个 NOR 信号(图 1(g)). 随后又进行了以雷蒙德氏棉 gDNA 为探针的 GISH, 观察到 6 个 NOR 信号位点与以 45S rDNA 为探针所产生的 NOR 信号完全一致, 并且 2 个位于 A 亚组染色体上, 4 个位于 D 亚组染色体上(图 1(h)), 这更充分地证明了以 gDNA 为探针所产生的 NOR 信号位点与实际 NOR 位点是一致的.

在中 16-阿非利加棉gDNA-戴维逊氏棉gDNA为封阻的实验中(图 1(i)), 仅观察到 26 条显示红色荧光信号的染色体和 26 条显示蓝色荧光的染色体, 并没有观察到GISH-NOR信号. 而在中 16-阿非利加棉gDNA-鲑鱼精DNA的GISH实验中(图 1(j)), 6 个 GISH-NOR信号又重新出现, 并且 2 个位于A亚组染色体上, 4 个位于D亚组染色体上. 这说明, 当以A基因组棉种gDNA为探针时, 如果用D基因组棉种gDNA作封阻就观察不到GISH-NOR信号. 而从图 1(f)可知, 当以D基因组棉种gDNA为探针时, 即使是使用 A 基因组棉种 gDNA 作封阻, 仍能观察到 GISH-NOR信号(表 2). 另外, 陆地棉基因组上显示的 NOR信号全部位于染色体短臂端部, Li Dayong等人^[20]在研究十倍体植物*Thinopyrum ponticum*时也曾发现类似现象.

3 讨论

3.1 四倍体棉种染色体上的 GISH-NOR 信号

从图 1(f), (i)和(j)比较可知, 在以A基因组棉种gDNA为探针时, 如果有D基因组棉种gDNA作封阻, 就不出现 6 个GISH-NOR信号, 如果不用D基因组棉种gDNA作封阻, 就出现了6个GISH-NOR信号. 而当以D基因组棉种gDNA为探针时, 即使是使用A基因组棉种gDNA作封阻, 仍能观察到GISH-NOR信号. 对于这种现象, 推测是由 2 种原因造成的: () rDNA 的同步进化. Wendel等人^[4]对 5 个四倍体种(AADD基因组)及其二倍体亲本种(AA或DD)的 18S~26S rDNA 的基因内可转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS), 包括 ITS1, ITS2 和 5.8S rDNA 的

核苷酸序列进行了分析, 发现所有多倍体都只带有 1 种类型的祖先 rDNA, 其中陆地棉 ITS 类型属于 D 基因组类型. 依其结果可知, 陆地棉中所有 NOR 的 rDNA 类型都和 D 基因组二倍体棉种 NOR 的 rDNA 类型完全一致, 那么当以 D 基因组为探针时, 四倍体棉种所有 NOR 的 rDNA 序列就与 D 基因组棉种所有 NOR 的 rDNA 序列杂交, 包括 ITS1 和 ITS2 序列. 而以 A 基因组为探针时, 它与四倍体 NOR 的 rDNA 杂交的是同源的 18S, 5.8S 和 26S 序列和部分的 ITS1 和 ITS2 序列. 使用 A 和 D 基因组棉种 gDNA 作封阻时的情况亦然, 那么就会出现上面的结果. () 可能是由于 D 基因组棉种 gDNA 中的 rDNA 含量多于 A 基因组棉种. 如果是这种情况, 当以 D 基因组棉种 gDNA 为探针、以 A 基因组棉种 gDNA 为封阻时, 由于 D 基因组中的 rDNA 含量多, 就能充分和靶 DNA 杂交, 而作为封阻的 A 基因组 gDNA, 由于其 rDNA 含量少, 无法与作为探针的 D 基因组中的 rDNA 竞争, 所以无论是否使用 A 基因组棉种 gDNA 作封阻, 都能看到 6 个 GISH-NOR 信号. 反之, 当以 A 基因组棉种 gDNA 为探针, D 基因组棉种 gDNA 为封阻时, 由于封阻 DNA 中的 rDNA 含量远高于探针中的 rDNA 含量, 使得探针无法与靶 DNA 进行充分杂交. 不过, 也有可能是以上两种因素综合作用所致.

通过将 A 基因组、D 基因组以及陆地棉基因组中所显示的 GISH-NOR 数目以及在染色体上的位置作以比较(表 1 和 2), 发现 A 和 D 基因组二倍体棉种的 GISH-NOR 数目之和不等于陆地棉基因组的 GISH-NOR 数目, 并且, 原本在其供体种中不位于染色体短臂端部的 NOR, 多倍化后所有 NOR 全部都位于染色体短臂端部. 这些现象证明, 多倍化后, A 和 D 基因组的 rDNA 通过不等交换进行了必要的调整以便能在同一细胞核中稳定共存.

3.2 四倍体棉种 A 和 D 亚基因组间的易位

王坤波等人^[22]在以海岛棉有丝分裂中期细胞为靶DNA, 以A基因组二倍体棉种(亚洲棉)gDNA为探

表 2 陆地棉 GISH-NOR 数目以及在染色体上的位置

靶 DNA-探针-封阻 DNA	GISH-NOR 数目	GISH-NOR 在染色体上的位置
TM-1-戴维逊氏棉 gDNA-阿非利加棉 gDNA	6	全部位于染色体短臂端部, 并且 2 个位于 A 亚组上, 4 个位于 D 亚组上
TM-1-雷蒙德氏棉 gDNA-阿非利加棉 gDNA	6	全部位于染色体短臂端部, 并且 2 个位于 A 亚组上, 4 个位于 D 亚组上
中 16-阿非利加棉 gDNA-鲑鱼精 DNA	6	全部位于染色体短臂端部, 并且 2 个位于 A 亚组上, 4 个位于 D 亚组上
中 16-阿非利加棉 gDNA-戴维逊氏棉 gDNA	0	

针的 FISH 实验中,曾发现在海岛棉显示红色荧光的染色体中,部分染色体端部的红色荧光信号覆盖不完全,并且其中有 1~2 对染色体的长臂的近一半区域没有红色荧光信号,推测是由于 D 染色体组的片段易位到该位置而导致这一现象的产生.而我们在阿非利加棉-阿非利加棉 gDNA-鲑鱼精 DNA 的 GISH 实验中(图 1(e)),观察到有一对同源染色体的长臂的下半部分信号明显弱于其他部位的信号,这与四倍体中观察到的现象一样.由此可知,在四倍体中这种现象的发生并不是由于 A 和 D 基因组之间的相互易位造成的.分析其原因可能为,这一部位的染色体低拷贝序列比重较大,而其他部位的散在重复序列又非常多,从而导致这一部位的杂交信号比其他部位的杂交信号弱.

致谢 感谢中国农业科学院作物科学所贾继增研究员、张学勇研究员为本论文提供了部分照片的拍照系统.本工作为国家自然科学基金(批准号:30170501)、国家重点基础研究发展计划(批准号:2004CB117300)和国家高技术研究发展计划(批准号:2003AA207051)资助项目.

参 考 文 献

- 1 王坤波,杜雄明,宋国立.棉花种质创新的现状与发展.植物遗传资源学报,2004,5(增刊):23~28
- 2 Endrizzi J E, Turcotte E L, Kohel R J. Genetics, cytogenetics, and evolution of *Gossypium*. Adv Genet, 1985, 23: 271~375
- 3 Wendel J F, Cronn R C. Polyploidy and the evolutionary history of cotton. Adv Agron, 2002, 78: 139~180
- 4 Wendel J F, Schnabel A, Seelanan T. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 280~284
- 5 Small R L, Wendel J F. The mitochondrial genome of allotetraploid cotton (*Gossypium* L). J Hered, 1999, 90: 251~253[DOI]
- 6 Cronn R C, Small R L, Haselborn T, et al. Rapid diversification of the cotton genus(*Gossypium*:Malvaceae) revealed by analysis of sixteen nuclear and chloroplast genes. Am J Bot, 2002, 89: 707~725
- 7 Adams K L, Cronn R C, Percifield R, et al. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 4649~4654[DOI]
- 8 Tang S, Li X, Jia X, et al. Genomic *in situ* hybridization (GISH) analyses of *Thinopyrum intermedium*, its partial amphiploid Zhong 5, and disease-resistant derivatives in wheat. Theor Appl Genet, 2000, 100: 344~352[DOI]
- 9 Snowdon R J, Köhler W, Friedt W, et al. Genomic *in situ* hybridization in *Brassica amphidiploids* and interspecific hybrids. Theor Appl Genet, 1997, 95: 1320~1324[DOI]
- 10 Hanson R E, Zwick M S, Choi S D, et al. Fluorescent *in situ* hybridization of a bacterial artificial chromosome. Genome, 1995, 38: 646~651
- 11 Hanson R E, Islam-Farid M N, Percival E A, et al. Distribution of 5s and 18s-28s rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L) and putative diploid ancestors. Chromosoma, 1996, 105: 55~61[DOI]
- 12 Hanson R E. Evolution of interspersed repetitive elements in *Gossypium* (Malvaceae). Am J Bot, 1998, 85(10): 1364~1368
- 13 Cheng Z K, Dong F G, Langdon T, et al. Rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon. Plant Cell, 2002, 14(8): 1691~1704[DOI]
- 14 熊志勇,高原,何光源,等.玉米、二倍体多年生类玉米及其杂交后代异染色质重复序列在染色体上的分布.科学通报,2004,12(49):1162~1165[摘要][PDF]
- 15 李大勇,张学勇,杨继,等.普通小麦三个基因组之间的遗传关系及原位杂交分析.植物学报,2000,42(9):957~964
- 16 宋国立,崔荣霞,王坤波,等.改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA.棉花学报,1998,10(5):273~275
- 17 Wang K B. Identification of karyotype of *Gossypium Bickii* proch, proceedings of world cotton research conference-1. Australia: Brisbane, 1994, 299~302
- 18 王春英,王坤波,王文奎,等.棉花 gDNA 体细胞染色体 FISH 技术.棉花学报,1999,11(2):79~83
- 19 王春英,王坤波,宋国立,等.棉花体细胞染色体 rDNA-FISH 技术.棉花学报,2001,13(2):75~77
- 20 Li D Y, Zhang X Y. Physical localization of the 18S-5.8S-26S rDNA and sequence analysis of ITS regions in *Thinopyrum ponticum*(Poaceae:Triticeae): Implications for concerted evolution. Ann Bot, 2002, 90: 445~452[DOI]
- 21 Zhao X P, Yang S, Hanson R E, et al. Dispersed repetitive DNA has spread to new genome since polyploid formation in cotton. Genome Research, 1998, 8(5): 479~492
- 22 王坤波,王文奎,王春英,等.海岛棉原位杂交及核型比较.遗传学报,2001,28(1):69~75
- 23 Beasley J O. The origin of American tetraploid *Gossypium* species. Am Nat, 1940, 74: 285~286

(2004-11-04 收稿,2005-01-31 收修改稿)