

椭圆悬钩子、红毛悬钩子和栽秧泡的原位杂交及系统分类研究

王 燕¹, 王小蓉^{1,2,*}, 陈 清¹, 张 丽¹, 刘 胤¹, 汤浩茹¹

(¹四川农业大学园艺学院, 四川雅安 625014; ²四川农业大学果蔬研究所, 成都 611130)

摘 要: 应用荧光原位杂交和基因组原位杂交技术进行 rDNA 在椭圆悬钩子、红毛悬钩子和栽秧泡中期染色体上的定位及 3 个物种亲缘关系研究。结果表明: 3 个物种均具有 1 对 45S rDNA 位点, 位于染色体短臂端部; 椭圆悬钩子和红毛悬钩子的 1 对 5S rDNA 位点位于染色体短臂近着丝粒处, 栽秧泡的 1 对 5S rDNA 位于染色体短臂端部。基因组原位杂交表明, 椭圆悬钩子与红毛悬钩子之间共有的重复序列主要分布于 14 条染色体近着丝粒区或端部, 杂交信号较强; 而与栽秧泡之间共享的重复序列仅存在 8 条染色体近着丝粒区或端部, 且杂交信号相对较弱。红毛悬钩子与处于绒毛叶亚组的茅莓关系较近, 与处于柔毛叶亚组的插田泡关系较远。结合形态特征的差异, 支持将椭圆悬钩子和红毛悬钩子归并, 并将归并后的椭圆悬钩子放在绒毛叶亚组; 将栽秧泡从椭圆悬钩子的变种独立、提升为种, 仍留在绒毛叶亚组。

关键词: 椭圆悬钩子; 红毛悬钩子; 栽秧泡; 荧光原位杂交; 基因组原位杂交; 分类处理

中图分类号: S 663.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 05-0841-10

In Situ Hybridization Analysis and Taxonomic Treatments of Rubus ellipticus, R. pinfaensis and R. ellipticus var. obcordatus

WANG Yan¹, WANG Xiao-rong^{1,2,*}, CHEN Qing¹, ZHANG Li¹, LIU Yin¹, and TANG Hao-ru¹

(¹Department of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China; ²Institute of Pomology and Olericulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: Chromosomal localization of 45S rDNA and 5S rDNA were studied by means of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on metaphase chromosomes of *Rubus ellipticus*, *R. pinfaensis* and *R. ellipticus* var. *obcordatus*. Genomic *in situ* hybridization (GISH) technique was also used to analyze the phylogenetic relationship among them. The results showed that two 45S rDNA and two 5S rDNA sites were detected in the three taxa. All 45S rDNA sites were localized on terminal chromosomal regions. 5S rDNA loci localized on peri-centromeric region of short arms in *R. ellipticus* and *R. pinfaensis*, but located on terminal regions in *R. ellipticus* var. *obcordatus*. GISH results indicated that the genomes of *R. ellipticus* and *R. pinfaensis* shared many common DNA sequences on 14 chromosomes. Eight weak signals around centromere and telomere were shared between *R. ellipticus* and *R. ellipticus* var. *obcordatus*. Meanwhile, *R. pinfaensis* showed close relationship with *R. parvifolius* from subsection *Stimulantes*,

收稿日期: 2014-01-15; 修回日期: 2014-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272134; 30971990)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wangxrtj@163.com)

distant with *R. coreanus* from subsection *Pungentes*. Combined the above data and morphological differences, we approved the view that *R. ellipticus* and *R. pinfaensis* should be combined and placed the combined species *R. ellipticus* into subsection *Stimulantes*. *R. ellipticus* var. *obcordatus* should be treated as *R. obcordatus* rather than as a variety of *R. ellipticus*.

Key words: *Rubus ellipticus*; *Rubus pinfaensis*; *Rubus ellipticus* var. *obcordatus*; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); genomic *in situ* hybridization (GISH); taxonomic treatments

悬钩子属 (*Rubus* L.), 又名树莓属, 属于蔷薇科 (Rosaceae), 由落叶稀常绿灌木、半灌木或多年生匍匐草本植物组成 (曲泽州和孙云蔚, 1990)。该属植物种类繁多, 变异性大, 存在无融合生殖, 多倍体化和广泛杂交。因此, 该属植物有不少种都存在分类处理困难的问题 (陆玲娣, 1983; 俞德浚 等, 1985; Naruhashi, 1989), 其中椭圆悬钩子 (*R. ellipticus* Smith)、红毛悬钩子 (*R. pinfaensis* Lévl. et Vant.) 和栽秧泡 [*R. ellipticus* Smith var. *obcordatus* (Franch.) Focke] 的分类处理的争议最为典型。争议的焦点之一: 椭圆悬钩子和红毛悬钩子是否归并, 归并后应该放在哪个亚组; 之二: 栽秧泡是否应从椭圆悬钩子的变种独立并提升为种 (Focke, 1911; Thuan, 1968; Lauener & Ferguson, 1970; 俞德浚 等, 1985; 李维林和贺善安, 2001; Wang et al., 2009; 万静, 2010)。作者在资源调查中发现, 栽秧泡和椭圆悬钩子在植株生长习性、花序的着生部位和花量、开花期、叶片、花萼和生境等形态学和生态学上存在明显差异, 而椭圆悬钩子和红毛悬钩子的差异主要表现在叶片和叶片背面绒毛的颜色上。从以上对三者的比较, 椭圆悬钩子和红毛悬钩子有较多相似之处, 而椭圆悬钩子的变种栽秧泡则与其原种差异较大。

目前, 中国大面积栽培的树莓品种多由国外引进, 种源来自欧洲红树莓和黑莓, 其遗传背景复杂 (Hall et al., 2009), 生态适应性问题突出。椭圆悬钩子、红毛悬钩子和栽秧泡都是中国西南地区广泛分布的优良树莓种质, 特别是栽秧泡。栽秧泡不仅果实品质优良, 而且丰产性高, 适应性强 (钟必凤 等, 2011), 适合树莓育种, 但它与椭圆悬钩子和红毛悬钩子的亲缘关系尚不清楚。了解这些种质的遗传基础和亲缘关系, 能够为合理有效地利用它们进行树莓新品种培育和遗传改良提供依据。

荧光原位杂交 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 作为一项成熟的分子细胞遗传技术, 常用于植物的染色体组型、亲缘关系、多倍体的起源和基因组结构与进化等研究中 (Chester et al., 2010; Roa & Guerra, 2012)。基因组原位杂交 (Genomic *in situ* hybridization, GISH) 能够揭示 DNA 序列沿染色体的分布模式, 从而比较不同物种间的亲缘关系, 探讨基因组的进化 (Raina & Rani, 2001; Zoller et al., 2001)。本研究中利用原位杂交技术对椭圆悬钩子、红毛悬钩子和栽秧泡进行分析, 比较其基因组的同源性, 推测三者间的亲缘关系, 为确定它们的分类和系统位置提供分子细胞遗传学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2012—2013 年在四川农业大学园艺学院遗传育种实验室完成。

供试材料为椭圆悬钩子、红毛悬钩子和栽秧泡 (表 1, 图 1), 采自四川雅安, 种植于四川农业大学教学科研园。选择绒毛叶亚组 (Subsect. *Stimulantes* Yü et Lu) 的茅莓 (*R. parvifolius* L.), 柔毛叶亚组 [Subsect. *Pungentes* (Focke) Yü et Lu] 的红花悬钩子 [*R. inopertus* (Diels) Focke] 和插田泡 (*R. coreanus* Miq.) 为对照, 分别采自四川西充和雅安。上述材料均为二倍体 ($2n = 2x = 14$)。

表 1 椭圆悬钩子、红毛悬钩子和栽秧泡的生长习性 & 形态特征

Table 1 The habitat and morphological characteristics among *Rubus ellipticus*, *R. pinfaensis* and *R. ellipticus* var. *obcordatus*

生长习性/形态特征 Habitat/Morphological features	椭圆悬钩子* <i>R. ellipticus</i>	红毛悬钩子 <i>R. pinfaensis</i>	栽秧泡* <i>R. ellipticus</i> var. <i>obcordatus</i>
生长习性 Growth habits and habitat	生长势较弱，半匍匐，枝条细弱，几乎藤状；生林中阴湿处，分布广泛。 Weak growth, semi-creeping, branches gracile, nearly vine-like, limited in damp areas under trees.	生长势较弱，半匍匐，枝条细弱，几乎藤状；生林中阴湿处。 Weak growth, semi-creeping, branches gracile, nearly vine-like, limited in damp areas under trees.	生长旺盛，半直立，枝条粗壮，呈灌木状；生路边灌丛或山坡林缘或荒草地，分布广泛。 Vigorous growth, semi-erect, branches sturdy, fruticose, often seen in shrubs at roadside or at forest edge or in waste grass.
叶片 Leaflet	叶较大，椭圆形，叶背呈绿色沿叶脉有紫红色刺毛，顶端急尖或突尖，顶叶长 8.5 ~ 14 cm，宽 6 ~ 11.5 cm，侧叶长 7.5 ~ 8.5 cm，宽 6 ~ 7 cm。 Leaflet elliptica vel long elliptica, apex acute or (abrupte apiculata), central lobe, 8.5 - 14 cm length, 6 - 11.5 cm width, and lateral lobes, 7.5 - 8.5 cm length, 6 - 7 cm width.	叶较大，椭圆形，叶面因着生细小绒毛而呈紫红色，顶端尾尖或急尖，顶叶长 9 ~ 12 cm，宽 7 ~ 10 cm，侧叶长 7 ~ 8 cm，宽 5 ~ 6.5 cm。 Leaflet elliptica vel long elliptica, apex acute or (abrupte apiculata), central lobe, 9 - 12 cm length, 7 - 10 cm width, and lateral lobes, 7 - 8 cm length, 5 - 6.5 cm width.	叶较小，倒卵形，顶端浅心形或截形，顶叶长 7.5 ~ 8.5 cm，宽 6 ~ 7 cm，侧叶长 5 ~ 6 cm，宽 4 ~ 5 cm。 Leaflet apex pubescentia vel lopped, central lobe, 7.5 - 8.5 cm length, 6 - 7 cm width, and lateral lobes, 5 - 6 cm length, 4 - 5 cm width.
花序 Inflorescence	3 ~ 8 朵叶腋簇生，结果量小。 Inflorescences with only 3 - 8 flowers arising from leaf axils of perennial branches and a small quantity of fruit.	3 ~ 8 朵叶腋簇生，结果量小。 Inflorescences with only 3 - 8 flowers arising from leaf axils of perennial branches and a small quantity of fruit.	15 ~ 112 朵顶生总状花序，结果量大。 Apical raceme with 15 - 112 flowers and a large quantity of fruit.
花梗 Pedicel	0.4 ~ 0.6 cm，具柔毛或刺毛。 Pedicel 4 - 6 mm and pubescent.	0.4 ~ 0.7 cm，密被短柔毛。 Pedicel 4 - 7 mm and pubescent and intermixed setosi.	1 cm 以上，几无刺毛。 Pedicel longer than 1 cm and very sparsely bristly.
花萼 Calyx	有黄色绒毛和柔毛或疏生刺毛。 Sparse setosi and tomentose.	密被绒毛状柔毛。 Sparse setosi.	几无刺毛。 No setosi.
开花时间(四川雅安) Flowering time (Ya'an, Sichuan)	2—3 月，比栽秧泡早 10 ~ 15 d。 From February to March, 10 - 15 days earlier than <i>R. ellipticus</i> var. <i>obcordatus</i> .	2—3 月。 From February to March.	3 月。 March.

* Wang et al., 2009.

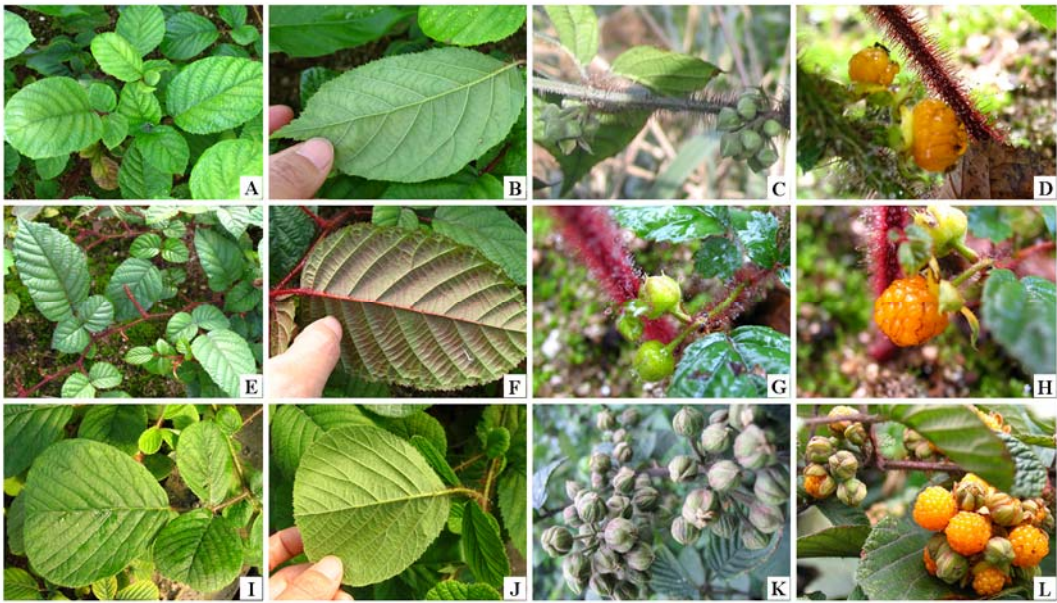


图 1 椭圆悬钩子 (A ~ D)、红毛悬钩子 (E ~ H) 和栽秧泡 (I ~ L) 的形态特征

Fig. 1 The morphological characteristics among *Rubus ellipticus* (A - D), *R. pinfaensis* (E - H) and *R. ellipticus* var. *obcordatus* (I - L)

1.2 染色体制片

染色体制备采用王小蓉等(2008)的根尖压片法。选择细胞分散、分裂相多的装片,在液氮中冻片 5 min,揭片晾干后置于 -20 °C 备用。

1.3 基因组 DNA 提取及探针制备

基因组 DNA 提取采用周延清(2005)的改良 CTAB 法。

基因组探针使用地高辛(digoxigenin-11- dUTP)缺口平移试剂盒标记(Roche 公司)。

45S rDNA 探针扩增体系参考 Zhang & Sang(1999)的,引物为 18S-F1(5'-TACCTGGTTGATCCT GCCAGTA-3')和 18S-R1(5'-CAATGATCCTTCCGCAGGTTCA-3'),采用生物素(biotin-16-dUTP)缺口平移法标记。

5S rDNA 探针参考 Fukui 等(1994)的引物: 5S1(5'-GGATGCGATCATACCAGCAC-3')和 5S2(5'-GGGAATGCAACACGAGGACT-3'),采用 PCR DIG Probe Synthesis Kit 试剂盒直接标记。

1.4 原位杂交

荧光原位杂交采用 Mishima 等(2002)的方法,基因组原位杂交参照 Lim 等(1998)的方法进行。原位杂交预处理:每张载玻片加 80 μL 酶处理液(2%纤维素酶和 2%果胶酶,上海生工),37 °C 保温 1.5 h,2 \times SSC 洗涤两次,各 5 min;80 μL RNase A(100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)37 °C 处理 1 h,2 \times SSC 洗涤两次,各 5 min;加 80 μL Proteinase K(1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,上海生工)37 °C 处理 30 min,2 \times SSC 洗涤两次,各 5 min;4%多聚甲醛室温固定 10 min,2 \times SSC 洗涤两次,各 5 min;用 75%、90%和 100%乙醇依次脱水,每次 5 min。室温干燥备用。

原位杂交:装片在含 70%甲酰胺的 2 \times SSC 中 70 °C 变性 3 min,在 -20 °C 冰冻的 75%、90%和 100%乙醇依次脱水,每次 5 min。杂交液在 PCR 仪中 100 °C 变性 5 min,随后立即置于冰上 10 min。每张装片加 30 μL 杂交液(100%去离子甲酰胺 15 μL ;50%硫酸葡聚糖 6 μL ;20 \times SSC 3 μL ;10% SDS 1 μL ;鲑鱼精 DNA 1 μL ;40 ~ 50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 探针 DNA 100 ng;ddH₂O 加至 30 μL),盖上盖玻片,指甲油封片。在人工气候箱中 37 °C 恒温杂交过夜。

1.5 杂交信号检测及图像分析

杂交后的装片用含 20%甲酰胺的 0.1 \times SSC 在 42 °C 下洗脱 10 min,2 \times SSC 洗涤 5 min。晾干装片后加 80 μL 抗体(Anti-Dig-FITC, Anti-Biotin-Rhodamine,溶于 0.5% BSA)染色,37 °C 温育 1 h,2 \times SSC 洗涤两次,各 5 min。用 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma)复染 10 min。用荧光显微镜(Olympus BX-51, Japan)观察,DP 70 拍照。使用 Image Pro-plus 6.0 和 Photoshop 处理图像。

2 结果与分析

2.1 椭圆悬钩子、红毛悬钩子和栽秧泡的双色荧光原位杂交分析

用生物素和地高辛分别标记 45S rDNA 和 5S rDNA,与椭圆悬钩子、红毛悬钩子和栽秧泡的中期染色体进行杂交,至少观察到 5 个杂交信号清晰明确的中期分裂相。杂交结果如图 2 所示。

椭圆悬钩子(图 2, A): 45S rDNA 在椭圆悬钩子上有 1 对较强的信号,位于 3 号染色体短臂末端;5S rDNA 位于 5 号染色体短臂近着丝粒处,信号较强。

红毛悬钩子(图 2, B): 45S rDNA 位于 3 号染色体短臂末端,信号较强;5S rDNA 位于 5 号

染色体短臂近着丝粒处。红毛悬钩子的 rDNA 信号位置和强度与椭圆悬钩子一致。

栽秧泡 (图 2, C): 45S rDNA 位于 3 号染色体短臂末端, 信号较强; 5S rDNA 位于 5 号染色体短臂端部, 同源染色体上的信号强度有差异。

2.2 椭圆悬钩子、红毛悬钩子和栽秧泡的基因组原位杂交分析

以椭圆悬钩子、红毛悬钩子和栽秧泡的基因组总 DNA 为探针针对各自的中期染色体进行杂交, 均观察到至少 5 个杂交信号清晰明确的中期分裂相。杂交结果如图 3 所示, 每一个杂交组合中, 染色体的核仁组织区 (NOR) 都显示了明显强于其他区域的杂交信号 (图 3, 箭头)。

椭圆悬钩子基因组总 DNA 对自身染色体的杂交结果 (图 3, A) 显示, 杂交信号主要分布在染色体着丝粒区、近着丝粒区以及端部的异染色质区域, 信号明显而强烈。不同染色体上的信号区域的大小不同, 有几条染色体上的信号由着丝粒向两臂延伸, 信号区域明显更大, 表明这几条染色体上重复序列占较大比例。

椭圆悬钩子基因组总 DNA 的杂交信号在红毛悬钩子 (图 3, B) 染色体上的分布特征与椭圆悬钩子对自身染色体的杂交结果相似。

椭圆悬钩子基因组总 DNA 在栽秧泡 (图 3, C) 染色体上只有 8 个明显的杂交信号, 两个位于染色体着丝粒并向两臂延伸, 信号最强, 两个位于染色体近着丝粒区, 信号较强, 另外 4 个位于近着丝粒区或端部区域, 信号稍弱。

以红毛悬钩子基因组总 DNA 为探针, 对自身染色体 (图 3, E) 的杂交信号集中在近着丝粒区及端部区域, 信号强烈。

红毛悬钩子基因组总 DNA 的杂交信号在椭圆悬钩子 (图 3, D) 染色体上的分布特征与红毛悬钩子自身基因组原位杂交结果相似, 杂交信号分布在每一条染色体的近着丝粒区或端部区域。

红毛悬钩子基因组总 DNA 在栽秧泡 (图 3, F) 染色体上仅检测到 6 个信号, 两个位于染色体近着丝粒区, 信号明显而强烈, 另外 4 个位于染色体近着丝粒区或短臂近端部, 信号稍弱。

以栽秧泡基因组总 DNA 为探针, 对自身染色体的杂交结果 (图 3, I) 显示, 杂交信号集中在近着丝粒区及端部区域, 信号明显而强烈。

栽秧泡基因组总 DNA 在椭圆悬钩子 (图 3, G) 染色体上显示了 8 个杂交信号, 4 个位于染色体近着丝粒区, 4 个位于染色体短臂近端部, 信号较强。

栽秧泡基因组总 DNA 在红毛悬钩子 (图 3, H) 染色体上显示了 6 个杂交信号, 4 个位于染色体近着丝粒区, 两个位于染色体短臂近端部, 信号强度一致。

2.3 红毛悬钩子与茅莓和插田泡的基因组原位杂交结果

为进一步研究红毛悬钩子与绒毛叶亚组和柔毛叶亚组物种之间的关系, 以红毛悬钩子基因组总 DNA 为探针, 与茅莓和插田泡的中期染色体进行杂交, 结果如图 4 所示。

红毛悬钩子基因组 DNA 在茅莓 (图 4, A) 的 12 条染色体的近着丝粒或染色体臂上显示了较强的信号, 其中 1 对信号几乎覆盖整条染色体; 在插田泡 (图 4, B) 的 6 条染色体的中部近着丝粒或近端部显示了信号, 4 个较强, 两个稍弱。

作为对照, 以红花悬钩子基因组 DNA 为探针, 在插田泡 (图 4, B_i) 的 12 条染色体上检测到信号, 6 个位于染色体中部近着丝粒区, 信号较强, 4 个位于染色体近着丝粒区, 信号较弱, 两个位于染色体短臂近端部区域, 信号较强。

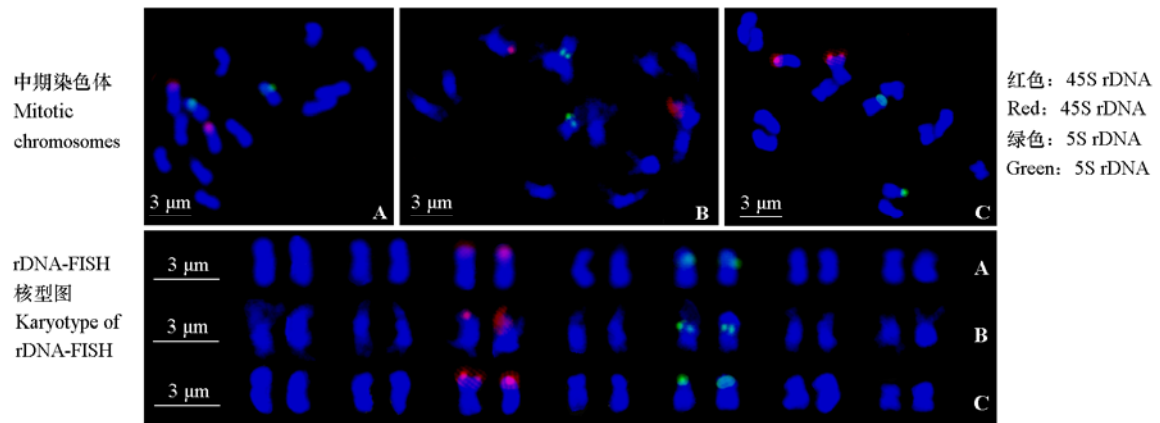


图2 椭圆悬钩子(A)、红毛悬钩子(B)和栽秧泡(C)的中期染色体双色荧光原位杂交

Fig. 2 Double FISH on metaphase chromosomes of *Rubus ellipticus* (A), *R. pinfaensis* (B) and *R. ellipticus* var. *obcordatus* (C)

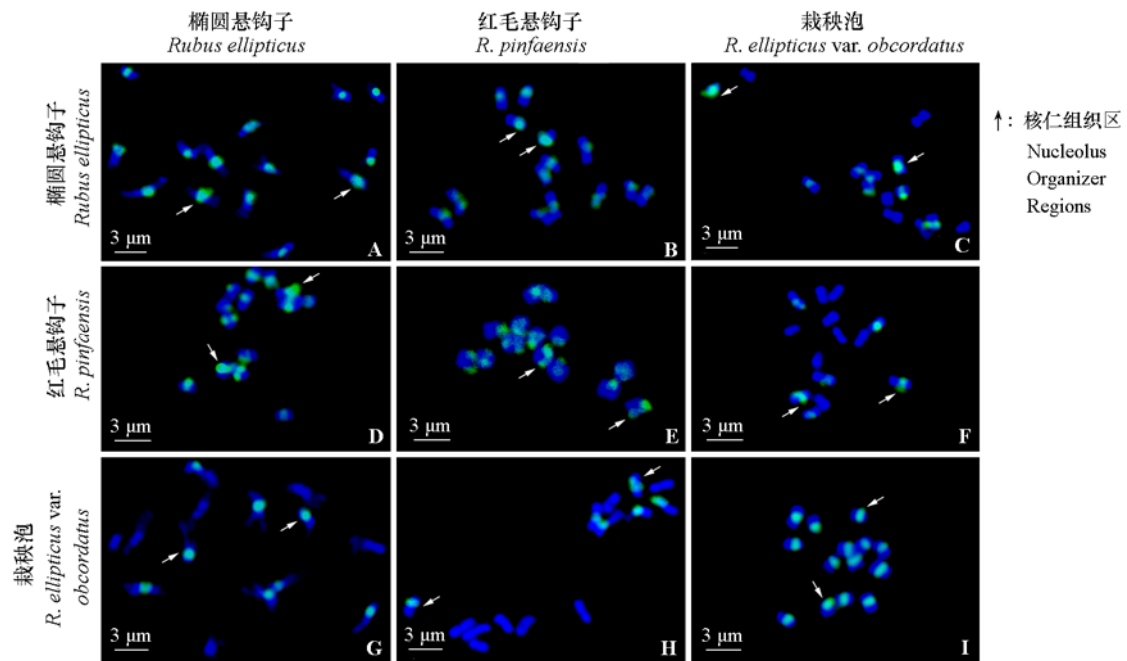


图3 椭圆悬钩子、红毛悬钩子和栽秧泡的相互基因组原位杂交

Fig. 3 Reciprocal GISH analysis between genomic DNA probes and mitotic chromosomes among *Rubus ellipticus*, *R. pinfaensis* and *R. ellipticus* var. *obcordatus*

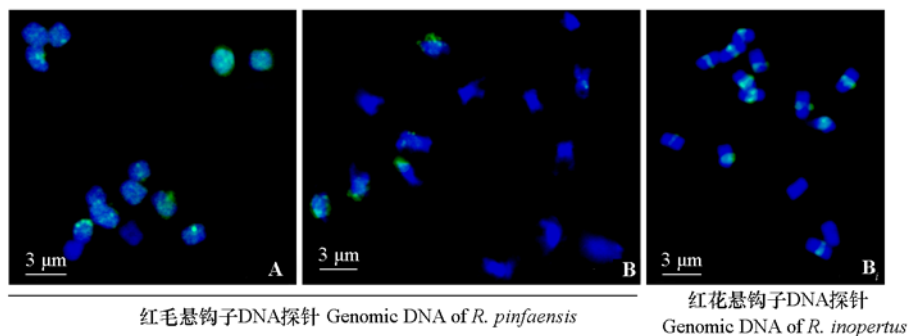


图4 红毛悬钩子与茅莓(A)和插田泡(B)中期染色体的基因组原位杂交

Fig. 4 GISH on mitotic chromosomes of *Rubus parvifolius* (A) and *R. coreanus* (B) with total genomic DNA of *R. pinfaensis*

3 讨论

3.1 45S rDNA 和 5S rDNA 在染色体上的分布

编码 rRNA 的基因有两种, 一种为 45S rDNA, 另一种为 5S rDNA。其中 45S rDNA 是多拷贝串联重复序列, 其功能与核仁形成直接相关。rDNA 编码区的保守性和非编码区的多态性是研究动植物系统发育与进化的一个重要标记。rDNA 在染色体上的分布数量和具体定位可以有效地反映种属间的分化程度和亲缘关系。在蔷薇科植物中, 45S rDNA 多位于染色体次缢痕或短臂端部区域, 5S rDNA 则常定位于染色体短臂中部近着丝粒处、或短臂端部 (Lim et al., 1998; Mishima et al., 2002; Maghuly et al., 2010; Liu & Davis, 2011)。本研究中, 45S rDNA 的数量和位置在这 3 个物种中分布一致, 均位于 3 号染色体短臂端部, 具有保守性, 与茅莓等其他悬钩子属植物 (Lim et al., 1998; Mishima et al., 2002) 分布一致。但栽秧泡的 45S rDNA 信号强度大于椭圆悬钩子和红毛悬钩子 (图 2), 表明 45S rDNA 拷贝数量在 3 个物种间存在多样性。

5S rDNA 位点则具有位置多态性, 在椭圆悬钩子和红毛悬钩子中位于 5 号染色体短臂近着丝粒处, 而在栽秧泡中位于 5 号染色体短臂端部。Mishima 等 (2002) 认为由于染色体重排 (chromosome rearrangements), 导致其位于染色体端部。5S rDNA 的这种分布在蔷薇科其他物种中也有报道, 如 *Sanguisorba annua* 中 (Mishima et al., 2002) 和栽培草莓 *Fragaria × ananassa* 中 (Rho et al., 2012)。值得特别提到的是, 栽秧泡中, 位于 5 号染色体上的 5S rDNA 信号在两条同源染色体上的信号强度有差异, 这可能与染色体异位有关。此外, 45S rDNA 和 5S rDNA 的分布相互独立, 分别位于 3 号和 5 号染色体上。Mantovani 等 (2005) 认为 45S rDNA 和 5S rDNA 具有不同的功能, 导致它们需要存在一定的物理距离, 并趋向于分布在不同的染色体上。rDNA 位点在这 3 个物种染色体上的分布差异表明, 椭圆悬钩子与红毛悬钩子亲缘关系较近, 而栽秧泡与它们较远。

3.2 基因组 DNA 在染色体上的分布

自身 GISH 信号实际上反映了基因组重复 DNA 序列对染色体的杂交, 因而能够说明重复序列在染色体上的分布模式。She 等 (2007) 认为自身 GISH 信号图型在物种间有明显的差异, 并与基因组的大小相关。大基因组的玉米和大麦的所有染色体都被密集地标记, 并在染色体全长上显示出强标记区与弱标记或不标记区的交替排列 (Hao et al., 2006; She et al., 2007; Guan et al., 2008)。基因组相对较小的水稻、高粱的杂交信号分散分布在染色体的全长, 但在近着丝粒区或近端区的分布明显占优势, 而小基因组拟南芥的染色体几乎只有近着丝粒区和核仁组织区被标记 (She et al., 2007)。另一方面, 重复序列的含量与基因组大小密切相关 (Flavell et al., 1974)。比如, 大麦 (18 pg/1C, 17 000 Mb/1C) 含有 91.6% 的重复序列 (Li et al., 2004); 玉米基因组相对较小 (2.8 pg/1C, 2 700 Mb/1C), 含有 78% 的重复序列 (Flavell et al., 1974); 拟南芥基因组最小 (0.16 pg/1C, 157 Mb/1C), 仅含 15%~20% 的重复序列 (Bennett & Smith, 1991; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)。据报道, 悬钩子属植物基因组较小, 为 0.30 pg/1C (280 Mb/1C) (Arumuganathan & Earle, 1991)。本研究中, 悬钩子属植物基因组原位杂交信号主要存在于染色体的近着丝粒区、NORs 或某些染色体短臂端部区域, 与该属植物为小基因组这一事实相符。

在高等真核植物中, 重复序列在基因组功能中起着重要作用, 物种间重复序列的同源程度可以反映它们亲缘关系的远近。因此, 根据 GISH 杂交信号的多少和强弱, 可以推测物种间亲缘关系的远近, 这在玉米和水稻、杧果及其近缘种、大白菜和结球甘蓝等物种中都已报道 (Ning et al., 2001; Nishiyama et al., 2006; 鄯丽娟 等, 2007)。本研究结果表明, 椭圆悬钩子与红毛悬钩子之间共享

的重复序列主要分布在 14 条染色体的近着丝粒区或端部, 信号较强; 椭圆悬钩子与栽秧泡之间共享的重复序列仅存在 8 条染色体的近着丝粒区或端部, 且杂交信号相对较弱; 而红毛悬钩子与栽秧泡之间仅 6 条染色体着丝粒和端部存在共享重复序列。这说明, 椭圆悬钩子和红毛悬钩子的基因组具有非常高的同源性, 亲缘关系很近; 而栽秧泡与它们的亲缘关系则较远。另一方面, 红毛悬钩子与来自绒毛叶亚组的茅莓亲缘关系较近, 而与来自同一亚组 (即柔毛叶亚组) 的插田泡亲缘关系相对较远。来自同一亚组的红花悬钩子和插田泡则显示了较近的亲缘关系。本研究结果与用细胞学、孢粉学以及分子生物学来研究它们的亲缘关系所得到的结果 (Wang et al., 2009) 一致, 表明利用基因组原位杂交来研究悬钩子属物种间亲缘关系是比较准确的。

3.3 分类处理和系统位置

长期以来, 椭圆悬钩子、红毛悬钩子和栽秧泡的分类和归属一直是世界各国植物分类学家争论的焦点之一。Thuan (1968) 首次将椭圆悬钩子归并入红毛悬钩子中, 随后 Lauener 和 Ferguson (1970) 同意这种处理。俞德浚等 (1985) 根据椭圆悬钩子和红毛悬钩子标本在植物形态上的差异, 处理为两个独立的种, 并将它们分别划入绒毛叶亚组和柔毛叶亚组中。李维林和贺善安 (2001) 推测二者的变异仅仅是种内连续变异, 且变异幅度很狭窄, 认为二者应归并移入柔毛叶亚组。近来, Wang 等 (2009) 基于细胞学、孢粉学和 RAPD 分子生物学研究, 支持椭圆悬钩子和红毛悬钩子归并, 保留椭圆悬钩子的种名, 但不支持将归并后的椭圆悬钩子划归柔毛叶亚组中, 而主张回到原椭圆悬钩子所属的绒毛叶亚组中。万静 (2010) 通过表型性数量分类研究, 也赞成将红毛悬钩子划归绒毛叶亚组。Focke (1911) 将栽秧泡划分为椭圆悬钩子的变种, 俞德浚等 (1985) 采用了此分类处理。李维林和贺善安 (2001) 基于它们在植株生长习性、花序和生境上的明显差异, 将栽秧泡独立为种, 仍在绒毛叶亚组。Wang 等 (2009) 基于二者形态学、生态学及核型差异, 赞成将栽秧泡作为独立的种。并对椭圆悬钩子和栽秧泡进行了人工杂交, 但未收获果实或种子, 这表明它们之间可能出现了生殖隔离。

本研究中, 原位杂交结果显示椭圆悬钩子与红毛悬钩子具有较近的亲缘关系, 栽秧泡与它们的关系较远, 红毛悬钩子与绒毛叶亚组的物种关系更近, 而与柔毛叶亚组的物种关系较远。因此, 建议将椭圆悬钩子和红毛悬钩子归并, 归并后的椭圆悬钩子仍留在绒毛叶亚组中, 并将栽秧泡 [*R. ellipticus* Smith var. *obcordatus* (Franch.) Focke] 从椭圆悬钩子的变种中独立, 提升为种 [*R. obcordatus* (Franch.) Thuan], 与 Wang 等 (2009) 的结果一致。

References

- Arumuganathan A, Earle E D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9 (3): 208 - 218.
- Bennett M D, Smith J B. 1991. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*, 334 (1271): 309 - 345.
- Chester M, Leitch A R, Soltis P S, Soltis D E. 2010. Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridization). *Genes*, 1 (2): 166 - 192.
- Flavell R B, Bennett M D, Smith J B, Smith D B. 1974. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochemical Genetics*, 12 (4): 257 - 269.
- Focke W O. 1911. *Species Ruborum*, part II. *Bibliotheca botanic: Abhandlungen aus dem Gesamtgebiete der Botanik*, 17 (22): 121 - 223.
- Fukui K, Kamisugi Y K, Sakai T. 1994. Physical mapping of 5S rDNA loci by direct-cloned biotinylated probes in barley chromosomes. *Genome*, 37 (1): 105 - 111.
- Guan Bing, Wang Kai, Zhou Bao-liang, Guo Wang-zhen, Zhang Tian-zhen. 2008. Establishment of a multi-color genomic *in situ* hybridization technique to simultaneously discriminate the three interspecific hybrid genomes in *Gossypium*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (3):

- 345 - 351.
- Hall H K, Hummer K E, Jamieson A R, Jennings S N, Weber C A. 2009. Raspberry breeding and genetics. *Plant Breeding Reviews*, 32: 39 - 353.
- Hao Lin, Song Guo-li, Li Bing-lin, Wang Kun-bo, Wang Chun-ying, Li Xin. 2006. Karyotype analysis of *Gossypium arboreum* × *G. bickii* by genome *in situ* hybridization. *Acta Genetica Sinica*, 33 (6): 565 - 572.
- Lauener L A, Ferguson H. 1970. Catalogue of the names published by Hector Leveille. VI. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh, 30: 239 - 294.
- Li W L, Zhang P, Fellers J P, Friebe B, Gill B S. 2004. Sequence composition, organization, and evolution of the core Triticeae genome. *The Plant Journal*, 40 (4): 500 - 511.
- Li Wei-lin, He Shan-an. 2001. Taxonomic revision on several taxa in the genus *Rubus* (Rosaceae). *Bulletin of Botanical Research*, 21 (3): 346 - 349. (in Chinese)
- 李维林, 贺善安. 2001. 悬钩子属部分分类群的分类订正. *植物研究*, 21 (3): 346 - 349.
- Lim K Y, Leitch I J, Leitch A R. 1998. Genomic characterization and the detection of raspberry chromatin in polyploid *Rubus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 97 (7): 1027 - 1033.
- Liu B, Davis T M. 2011. Conservation and loss of Ribosomal RNA gene sites in diploid and polyploid *Fragaria* (Rosaceae). *BMC Plant Biology*, 11 (1): 157.
- Lu Ling-di. 1983. A study on the genus *Rubus* of China. *Journal of Systematics and Evolution*, 21 (1): 13 - 25. (in Chinese)
- 陆玲娣. 1983. 我国悬钩子属植物的研究. *植物分类学报*, 21 (1): 13 - 25.
- Maghuly F, Schmoellerl B, Temsch E M, Laimer M. 2010. Genome size, karyotyping and FISH physical mapping of 45S and 5S genes in two cherry rootstocks: *Prunus subhirtella* and *Prunus incisa* × *serrula*. *Journal of Biotechnology*, 149 (1): 88 - 94.
- Mantovani M, Douglas dos L, Abel S, Moreira-Filho O. 2005. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 123 (3): 211 - 216.
- Mishima M, Ohmido N, Fukui K, Yahara T. 2002. Trends in site-number change of rDNA loci during polyploid evolution in *Sanguisorba* (Rosaceae). *Chromosoma*, 110 (8): 550 - 558.
- Naruhashi N. 1989. Notes on Japanese *Rubus* (4). *Taxon*, 37 (1): 1 - 4.
- Ning Shun-bin, Jin Wei-wei, Wang Ling, Song Yun-chun. 2001. Comparative genome research between maize and rice using genomic *in situ* hybridization. *Chinese Science Bulletin*, 46 (8): 656 - 661.
- Nishiyama K, Choi Y A, Honsho C, Eiadthong W, Yonemori K. 2006. Application of genomic *in situ* hybridization for phylogenetic study between *Mangifera indica* L. and eight wild species of *Mangifera*. *Scientia Horticulturae*, 110 (1): 114 - 117.
- Qie Li-juan, Shen Shu-xing, Xuan Shu-xin, Wang Yan-hua, Chen Xue-ping, Zhang Cheng-he, Li Xiao-feng, Luo Shuang-xia. 2007. Karyotype analysis of Chinese cabbage and cabbage by genome *in situ* hybridization. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (6): 1459 - 1464. (in Chinese)
- 郝丽娟, 申书兴, 轩淑欣, 王彦华, 陈雪平, 张成合, 李晓峰, 罗双霞. 2007. 大白菜和结球甘蓝基因组原位杂交及核型分析. *园艺学报*, 34 (6): 1459 - 1464.
- Qu Ze-zhou, Sun Yun-wei. 1990. Category of pomology. Beijing: Agriculture Press: 153 - 160. (in Chinese)
- 曲泽州, 孙云蔚. 1990. 果树学种类论. 北京: 农业出版社: 153 - 160.
- Raina S N, Rani V. 2001. GISH technology in plant genome research. *Methods in Cell Science*, 23: 83 - 104.
- Rho I R, Hwang Y J, Lee H I, Lee C H, Lim K B. 2012. Karyotype analysis using FISH (fluorescence *in situ* hybridization) in *Fragaria*. *Scientia Horticulturae*, 136: 95 - 100.
- Roa F, Guerra M. 2012. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology*, 12 (1): 225.
- She Chao-wen, Liu Jing-yu, Diao Ying, Hu Zhong-li, Song Yun-chun. 2007. The distribution of repetitive DNAs along chromosomes in plants revealed by self-genomic *in situ* hybridization. *Journal of Genetics and Genomics*, 34 (5): 437 - 448.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408 (6814): 796 - 815.
- Thuan N V. 1968. Flore du Cambodge, du Laos, et du Vietnam. Fascicule 7: Rosaceae II (*Rubus*). Paris: Museum National d'Histoire Naturelle.
- Wan Jing. 2010. Study on mathematic classification of morphologic character about 48 species in *Rubus* [M. D. Dissertation]. Ya'an: Sichuan

- Agricultural University. (in Chinese)
- 万 静. 2010. 48 种悬钩子属植物表型性状数量分类研究[硕士论文]. 雅安: 四川农业大学.
- Wang Xiao-rong, Tang Hao-ru, Duan Juan, Li Ling. 2008. A comparative study on karyotypes of 28 taxa in *Rubus* sect. *Idaeobatus* and sect. *Malachobatus* (Rosaceae) from China. *Journal of Systematics and Evolution*, 46 (4): 505 - 515. (in Chinese)
- 王小蓉, 汤浩茹, 段 娟, 李 玲. 2008. 中国悬钩子属空心莓组与木莓组 28 种和变种的核型比较研究. *植物分类学报*, 46 (4): 505 - 515.
- Wang Xiao-rong, Tang Hao-ru, Zhang Han-wu, Zhong Bi-feng, Xia Wu-feng, Liu Yuan. 2009. Karyotypic, palynological, and RAPD study on 12 taxa from two subsections of section *Idaeobatus* in *Rubus* L. and taxonomic treatment of *R. ellipticus*, *R. pinfaensis*, and *R. ellipticus* var. *obcordatus*. *Plant Systematics and Evolution*, 283 (1): 9 - 18.
- Yu De-jun, Lu Ling-di, Gu Cui-zhi, Guan Ke-jian, Li Chao-luan. 1985. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*. Vol. 37. Beijing: Science Press: 10 - 218. (in Chinese)
- 俞德浚, 陆玲娣, 谷翠芝, 关克俭, 李朝銮. 1985. 中国植物志. 第 37 卷. 北京: 科学出版社: 10 - 218.
- Zhang D M, Sang T. 1999. Physical mapping of ribosomal RNA genes in *Peonies* (Paeonia, Paeoniaceae) by fluorescent *in situ* hybridization: Implications for phylogeny and concerted evolution. *American Journal of Botany*, 86 (5): 735 - 740.
- Zhong Bi-feng, Wang Xiao-rong, Deng Jia-lin, Xia Wu-feng, Tang Hai-dong, Zhang Han-wu, Chen Qing, Liu Yuan. 2011. Observation and evaluation on seven wild bramble excellent germplasms distributed in Sichuan Province. *Southwest China Journal of Agricultural Science*, 24 (6): 2332 - 2335. (in Chinese)
- 钟必凤, 王小蓉, 邓家林, 夏武峰, 唐海东, 张汉武, 陈 清, 刘 源. 2011. 四川野生优良树莓种质的调查和评价. *西南农业学报*, 24 (6): 2332 - 2335.
- Zhou Yan-qing. 2005. Application on DNA molecular markers technology in plant study. Beijing: Chemical Industry Press: 9 - 34. (in Chinese)
- 周延清. 2005. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用. 北京: 化学工业出版社: 9 - 34.
- Zoller J F, Yang Y, Herrmann R G, Hohmann U. 2001. Comparative genomic *in situ* hybridization (cGISH) analysis on plant chromosomes revealed by labeled *Arabidopsis* DNA. *Chromosome Research*, 9: 357 - 375.

征 订

欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会和中国农业科学院蔬菜花卉研究所主办的学术期刊, 创刊于 1962 年, 刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究报告、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息, 适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊, 中国科技核心期刊; 被英国《CAB 文摘数据库》、美国 CA 化学文摘、日本 CBST 科学技术文献速报、俄罗斯 AJ 文摘杂志、CSCD 中国科学引文数据库等多家数据库收录。《园艺学报》荣获“第三届国家期刊奖”及“新中国 60 年有影响力的期刊”、“中国国际影响力优秀学术期刊”、“百种中国杰出学术期刊”、“中国权威学术期刊”、“中国精品科技期刊”等称号。

《中国学术期刊影响因子年报》2013 年公布的《园艺学报》复合总被引频次为 11 071, 复合影响因子为 1.734; 期刊总被引频次为 5 146, 期刊影响因子为 1.112。

《中国科技期刊引证报告》2013 年公布的《园艺学报》扩展总被引频次为 6 106, 扩展影响因子为 1.333; 核心总被引频次为 4 328, 核心影响因子为 1.047; 在中国科技核心期刊综合评价总分排名中居第 29 位。

《园艺学报》为月刊, 每月 25 日出版。每期定价 40 元, 全年 480 元。国内外公开发行, 全国各地邮局办理订阅, 国内邮发代号 82 - 471, 国外发行由中国国际图书贸易总公司承办, 代号 M448。漏订者可直接寄款至编辑部订购。编辑部地址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部。

邮政编码: 100081; 电话: (010) 82109523. E-mail: yuanyixuebao@126.com. 网址: <http://www.ahs.ac.cn>。