

## 25S rDNA 和 5S rDNA 在大白菜中期染色体上的 FISH 定位

轩淑欣, 申书兴, 赵建军, 张成合, 陈雪平, 郝丽娟

(河北农业大学园艺学院, 保定 071001)

**摘要:** 【目的】确定 rDNA 在中国大白菜基因组中的位点数目和分布位置, 并建立识别大白菜不同染色体的特异标记。【方法】用荧光原位杂交技术对 25S rDNA 和 5S rDNA 在大白菜有丝分裂中期染色体进行了定位研究。【结果】在大白菜中期染色体上, 分别检出了 5 对 25S rDNA 杂交信号和 3 对 5S rDNA 杂交信号。对应于大白菜中期染色体形态图, 确定 5 对 25S rDNA 信号分别分布在大白菜 1 号染色体长臂 (1L) 的近末端, 2 号染色体长臂 (2L) 的近中部, 3 号和 4 号染色体长臂 (3L、4L) 的近着丝点处和 10 号染色体的随体上, 信号强度为 10 号>2 号>3 号和 4 号>1 号; 而 5S rDNA 的 3 对信号分别位于 2 号染色体的长臂 (2L) 和 9 号、10 号染色体的短臂 (9S、10S)。【结论】在分子水平上为大白菜部分染色体提供了识别标记。

**关键词:** 大白菜; 25SrDNA; 5S rDNA; 荧光原位杂交

## Location of 25S rDNA and 5S rDNA in Chinese Cabbage-pe-tsai Metaphase Chromosome

XUAN Shu-xin, SHEN Shu-xing, ZHAO Jian-jun, ZHANG Cheng-he, CHEN Xue-ping, QIE Li-juan

(College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001)

**Abstract:** 【Objective】The objective was to determine the number and location of rDNA sites in Chinese cabbage-pe-tsai genome, and identify the special molecular markers related to different chromosomes. 【Method】Fluorescence *in situ* hybridization(FISH) technique was used to locate the 25S rDNA and 5S rDNA on the mitotic metaphase chromosomes of Chinese cabbage-pe-tsai. 【Result】Five pairs of hybridization signals of 25S rDNA and three pairs of hybridization signals of 5S rDNA were detected on the metaphase chromosomes. Contrasting the normal karyotype of the diploid Chinese cabbage-pe-tsai, the 25S rDNA hybridization signals were located near the end of 1L, the central section of 2L, the centromere region of 3L and 4L, and the satellite of chromosome 10, respectively. The intensity of hybridization signals was chromosome 10 > chromosome 2 > chromosome 3 and chromosome 4 > chromosome 1. Hybridization signals of 5S rDNA were located on 2L, 9S and 10S. 【Conclusion】These results indicated that some molecular markers related to different chromosomes were identified in Chinese cabbage-pe-tsai.

**Key words:** Chinese Cabbage-pe-tsai (*Brassica campestris* syn *rapa* ssp. *pekinensis*); 25S rDNA; 5S rDNA; Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

## 0 引言

【研究意义】核糖体 RNA 基因 (rDNA 基因) 是真核生物基因组中一类高度重复并有转录活性的基因家族。rDNA 基因的相对物理位置和多拷贝基因位点数目对于构建物理图谱和研究种系发生是非常重要的

的, 认识 rDNA 在不同物种基因组中位点的分布和序列差异对研究基因组间的关系、进化情况以及在基因组内划分染色体的类型也具有重要意义<sup>[1~8]</sup>。此外, rDNA 基因也因其串联组织和高拷贝数成为确定不同植物种属染色体和核型的特异标记<sup>[9~11]</sup>。【前人研究进展】在芸薹属作物上, 关于 rDNA 基因在不同物种

收稿日期: 2006-02-22; 接受日期: 2006-07-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471182), 河北农业大学科技将帅计划

作者简介: 轩淑欣 (1977-), 女, 河北定州人, 博士研究生, 研究方向为分子细胞遗传学。Tel: 03127528323; E-mail: xsx\_2003 @eyou.com。通讯作者申书兴 (1964-), 男, 河北唐山人, 教授, 研究方向为蔬菜染色体工程。Tel: 03127521316; E-mail: shensx@mail.hebau.edu.cn

基因组中的位点数目和分布也有所研究。如, 1995 年, Cheng 等使用 FISH 和银染技术研究了核糖体 RNA 基因在 *Brassica alboglabra* Bailey 中的位点数目和核仁活性<sup>[12]</sup>。Fukui 等<sup>[13]</sup>、Snowdon 等<sup>[14]</sup>和 Schrader 等<sup>[15]</sup>进一步研究了 rDNA 位点在芸薹属不同种作物有丝分裂中期染色体基因组中的位点数目和分布。Hasterok 和 Maluszynska<sup>[16]</sup>确定了 rDNA 的转录活性。2001 年, Hasterok 等又将 rDNA 作为分子标记进行芸薹属 6 个种不同染色体的识别<sup>[17]</sup>。2005 年, Lim 等利用 rDNA 在 *Brassica rapa* 上的位点分析了异染色体在染色体上分布区域<sup>[18]</sup>。这些研究表明 rDNA 可以用于某些染色体的鉴别和核型的构建。【本研究的切入点】据报道, 关于 rDNA 基因在芸薹种作物上的研究, 多以起源于西方的 *Brassica rapa* 为试验材料, 而对中国大白菜 (*Brassica campestris* syn *rapa* ssp. *pekinensis*) 的研究尚未见报道。【拟解决的关键问题】本试验拟以 25S 和 5S rDNA 为探针, 在大白菜中期染色体上进行 FISH 杂交, 来分析两类 rDNA 基因在大白菜染色体上的数目和分布, 并构建大白菜基于 FISH 的核型图, 旨在为进一步研究中国大白菜染色体的进化历程和精确鉴别不同染色体提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验于 2005 年冬在河北农业大学园艺学院细胞生物学实验室进行。所用植物材料为大白菜自交系 85-1M 种子, 由本实验室自备。

供试探针: 25S rDNA 探针来自拟南芥 25S rDNA 编码区的一个大小为 2.3 kb 的亚克隆, 由波兰的 Dr. Robert Hasterok 提供。5S rDNA 质粒由武汉大学生命科学学院李立家教授提供。

### 1.2 方法

1.2.1 材料培养 种子先浸泡 4~6 h, 然后放在垫有两层纱布的培养皿里, 置于 25℃ 恒温箱中暗培养, 当根尖长至 1 cm 左右时, 切取生长旺盛的根尖约 2 mm 用于染色体制备。

1.2.2 染色体制片 采用常规去壁低渗的方法。制片晾干后用 5% 吉姆萨染色, 在 Zeiss 荧光显微镜 (Axioskop 40) 普通光下镜检后精选染色体形态良好且不相互重叠的高质量图像拍照, 用 Axiovision Imaging System 软件测量每个染色体的长、短臂长度, 计算出每条染色体的相对长度、臂比。拍过照的玻片浸于酒精与氯仿为 7:3 的溶液约 2 h 去除油镜用油

后, 经 75%、95%、100% 酒精脱水各 5 min, 空气干燥, -20℃ 保存备用。

1.2.3 探针标记 两个探针均用地高辛 (Digoxigenin) -11-dUTP (Roche 公司) 标记, 其中 2.3 kb 的 25S rDNA 片段通过随机引物法, 5S rDNA 序列通过缺口平移法, 标记方法参照 Roche 公司手册进行。

1.2.4 原位杂交 参照杭超等<sup>[19]</sup>的方法, 略做修改。将制备好的染色体标本, 在 60℃ 烤箱内烤 1 h, 70℃ 下用 2×SSC 配制的 70% 去离子甲酰胺变性 2.5 min, 立即在 -20℃ 下预冷的 70%、95%、100% 酒精系列浸洗脱水各 5 min。在染色体变性的同时配制杂交液, 75℃ 下变性 5 min, 迅速置于冰上至少 5 min 备用。酒精系列浸洗脱水后取出的标本在空气中充分干燥, 后加杂交液和盖片在保湿盒中 37℃ 下杂交 16~21 h。

1.2.5 杂交信号的荧光检测 杂交后依次用 2×SSC 室温、37℃ 浸洗各 10 min, 接着在室温下用 2×SSC 和 1×PBS 浸洗各 5 min 后, 依次加羊抗地高辛荧光素抗体、兔抗羊 FITC 偶联物 37℃ 下各程序控制反应 1 h, 每次抗体反应后用 1×PBS 在室温下浸洗 3 次, 每次 5 min。

1.2.6 图像检测及分析 染色体制片用 2 μg·ml<sup>-1</sup> DAPI 复染。在 Zeiss 荧光显微镜 (Axioskop 40) 下观察荧光原位杂交信号, 用 CCD 照相装置俘获图像, 用 Axiovision Imaging System 和 Photoshop 软件对图像进行测量和处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 大白菜有丝分裂中期染色体形态

为了确定 FISH 杂交信号位于哪条染色体, 首先应对大白菜各对染色体的形态特征有清晰的了解, 为此, 本研究着重分析了染色体分散良好且形态清晰的 10 个细胞, 对染色体的相对长度、臂比做了统计分析, 确定了着丝点的类型 (表), 获得了大白菜中期染色体形态图 (图 1)。通过对 10 个细胞的分析, 总结出体细胞染色体的特征及鉴别方法, 除随体染色体外, 染色体的标号按照染色体全长顺序编号, 将随体染色体定为 10 号染色体, 这与 Lim 等对染色体标号的排序不同。由表可见, 除 10 号染色体的着丝点指数为 0.26 外, 其余染色体的着丝点指数均分布于 0.39~0.50 之间, 因此大白菜染色体为近等着丝点类型。

### 2.2 用 FISH 方法进行 25S rDNA 的定位

以地高辛-11-dUTP 标记 25S rDNA, 与大白菜中

期染色体杂交,可以清楚地发现 25S rDNA 所在染色体的杂交信号。在荧光显微镜下,用 DAPI 复染的染色体呈蓝色荧光(为了便于观察,模拟为红色),且染色体的常、异染色质片段清晰可辨,荧光强度较强的区域为常染色质,荧光强度较弱的区域为异染色质(图 2-A)。地高辛-dUTP 标记的 25S rDNA 经用抗地高辛抗体-荧光剂 FITC 检测之后呈现的绿色荧光,与染色体的红色叠加为黄绿色,其模式照片见图 2-B。从模式照片和基于 FISH 信号的核型图片(图 2-C)可以看出,以大白菜的体细胞染色体为靶时,25S rDNA 探针共有 5 对杂交信号,根据染色体的编号,这 5 对杂交信号分别位于 1 号、2 号、3 号、4 号和 10 号(随体染色体)5 对同源染色体上。其中,1 号同源染色体的一对杂交信号位于长臂末端且强度较弱,2 号、3 号和 4 号 3 对染色体上的杂交信号强度均较强,只是在 2 号染色体上位于长臂的近中部,在 3 号和 4 号染色体上的位置在长臂几乎靠近着丝点的位置,其中,2

号染色体上的信号强度略强于 3 号和 4 号染色体上的信号强度。在 10 号染色体的一对杂交信号位于随体上,其信号强度远远强于其它 4 对信号。通过分析可以推断 25S rDNA 在各染色体上的拷贝数为 10 号>2 号>3 号和 4 号>1 号。

### 2.3 5S rDNA 在大白菜上的 FISH 定位

用地高辛-dUTP 标记 5S rDNA,与大白菜中期染色体(图 3-A)杂交,把 5S rDNA 清晰的定位在了 3 对同源染色体上(图 3-B)。通过对每条染色体进行形态分析,对照大白菜中期染色体形态图,可以确定这 3 对杂交信号分别位于 2 号、9 号和 10 号(随体染色体)3 对染色体上(图 3-C)。从图 3-B 和图 3-C 可以看出,在 2 号染色体上 5S rDNA 的杂交信号位于长臂近着丝点的位置,在 9 号染色体上 5S rDNA 的杂交信号位于短臂靠近着丝点的位置,在 10 号染色体上 5S rDNA 的杂交点位于短臂上

表 大白菜体细胞中期染色体的核型参数

Table Major characters of Karyotype of the Chinese cabbage-pe-tsai metaphase chromosomes

染色体序号	相对长度	臂比值	着丝点类型	着丝点指数
Chromosome number	Relative length (%)	Arm ratio	Centromere type	Centromere index
1	13.44±1.10	1.30±0.11	m	0.48
2	10.58±0.59	1.53±0.07	m	0.44
3	9.80±0.50	1.85±0.14	sm	0.39
4	9.21±0.52	1.19±0.08	m	0.50
5	8.41±0.49	1.52±0.21	m	0.45
6	7.69±0.51	1.90±0.17	sm	0.39
7	7.11±0.44	1.52±0.37	m	0.46
8	6.61±0.35	1.80±0.44	sm	0.41
9	6.17±0.65	1.74±0.21	sm	0.41
10*	10.20±1.07	3.34±0.22	st(SAT)	0.26

\*为随体染色体,其相对长度和臂比为不带随体计入数据

\* represent the satellite chromosome, and the figures of relative length and arm ratio didn't include the lengths of satellites



图 1 大白菜中期染色体形态图(250×)

Fig. 1 Ten pair metaphase chromosomes of Chinese cabbage-pe-tsai root tip cells are arranged in descendent order(the satellite chromosomes are exceptional) showing their size and centromere position (250×)

A: 用于与 25S rDNA 杂交的中期染色体; B: 25S rDNA 在中期染色体上的分布; C: 大白菜基于 25S rDNA-FISH 图像核型图  
 A: The metaphase cell used for in situ hybridization with 25S rDNA; B: Distribution of 25S rDNA on metaphase; C: Homologous pairing of chromosomes based on 25S rDNA FISH

图 2 以 DIG-11-dUTP 标记的 25S rDNA 与大白菜的染色体做原位杂交 (250×)

Fig. 2 In situ hybridization of DIG-11-dUTP labeled 25S rDNA probe to Chinese cabbage-pe-tsai chromosomes (250×)

A: 用于与 5S rDNA 杂交的中期染色体; B: 5S rDNA 在中期染色体上的分布; C: 大白菜基于 5S rDNA-FISH 图像核型图  
 A: The metaphase cell used for in situ hybridization with 5S rDNA; B: Distribution of 5S rDNA on metaphase; C: Homologous pairing of chromosomes based on 5S rDNA FISH

图 3 以 DIG-11-dUTP 标记的 5S rDNA 与大白菜的染色体做原位杂交 (250×)

Fig. 3 In situ hybridization of DIG-11-dUTP labeled 25S rDNA probe to Chinese cabbage-pe-tsai chromosomes (250×)

### 3 讨论

#### 3.1 关于 rDNA 的杂交信号与随体的关系

高等植物 45S rDNA 是编码各种 rRNA(5.8S、18S、25S、28S) 前体的基因, 在基因组中为中度串联重复序列, 与核仁形成有关, 主要定位在核仁组织区, 一般在染色体的次缢痕部位。如果 rDNA 在分裂间期表达, 携带该基因的染色体即在 NORs 处形成核仁, 具 NORs 的染色体即随体染色体。从染色体结构来讲, NOR 的数目应该与随体数目相对应, 在棉花<sup>[20]</sup>、水稻<sup>[21]</sup>、玉米<sup>[22]</sup>等作物中, 许多研究结果也表明, 随体染色体的数目与 45S rDNA 杂交位点的数目是相同的。但 rDNA 在十字花科芸薹属作物上 FISH 定位研

究表明, 杂交信号的个数并不与随体染色体的数目相同, 而往往多于随体染色体数。在本试验中, FISH 杂交所检出的 10 个 25S rDNA 位点, 除 2 个位于一对随体染色体上外, 其余信号均位于非随体同源染色体, 这与 Snowdon 等、Hasterok 等、Kulak 等及 Lim 等在芸薹属不同作物上的研究结果是一致的, 李懋学也指出次缢痕区即 NOR, 但 NOR 并不一定在次缢痕区<sup>[23]</sup>。

#### 3.2 关于 rDNA 信号位点的位置与异染色质的关系

一般认为, 随体是高度惰性的异染色质, 着丝点附近区域亦是异染色质集中分布的区域。在水稻、玉米等禾本科作物上, 45S rDNA 位点的位置与核仁组织区 NORs (即随体) 联系在一起, 即位于异染色质区。在 Lim 等的研究中, 45S rDNA-FISH 位点位于

*Brassica rapa* 1~5 号染色体上, 信号最大的区域位于 2 号染色体(随体染色体)的 NOR 区, 其它的信号均位于 1 号、3~5 号染色体长臂近着丝点的异染色质区。而在 Hasterok 等的研究中, 在 *Brassica campestris* 的染色体上检出的 5 对 25S rDNA-FISH 位点除一对位于随体染色体的 NOR 区, 另 4 对信号位点也分布于短臂或长臂近着丝点处。此外芸薹属其它物种上的研究结果也表明, 尽管 45S rDNA (包括其编码的各种前体 rRNA) 位点可能位于长臂或短臂上, 但基本分布于近着丝点处。而本试验中, 25S rDNA 位点除在随体染色体 NOR 区分布外, 在 3 号和 4 号染色体上分布于近着丝点的异染色质区与前人的研究结果是相同的, 只是在 1 号染色体上分布于长臂的末端, 在 2 号染色体上分布于长臂的近中部与前人的结果不同。有关 rRNA 位点的位置在中期染色体中具有随机性这一点宋林生等<sup>[24]</sup>在讨论中曾指出过。Kulark 等<sup>[25]</sup>在用 5S rDNA 和 25S rDNA 做标记研究芸薹属作物 3 个复合种时也发现, 异染色质在 A 组一些染色体的长臂比短臂要大, 且在 A 组染色体的短臂端部也检出了 rDNA 信号。笔者在使用 DAPI 对大白菜二倍体和不同三体进行显带时也发现, 1 号、2 号和 4 号等染色体的长臂深染区域比其短臂上的深染区域的分布要大, 且 1 号染色体长臂存在着端带, 本试验结果与前人研究结果不同可能因为这个原因。

由于 5S rDNA 基因在染色体上的位置不像 45S rDNA 那样有与核仁相连系的明显的特征, 关于它的定位, 在芸薹属作物上也有许多报道, 不同研究者之间结果不尽相同。本研究中检出的 3 对 5S rDNA 位点, 分别位于 2 号、9 号和 10 号染色体上, 其数目和位置和 Lim 等在 *Brassica rapa* 上的研究结果是一样的。本研究中, 大白菜的中期染色体核型是经过 10 个可分析细胞仔细测量得出的, 所用 FISH 药物、步骤经过多次操作, 具可重复性。因此利用荧光原位杂交技术, 并参照申书兴等<sup>[26]</sup>对大白菜非同源染色体的区分方法, 从染色体相对长度、臂比及杂交位点等方面结合起来, 可以确定出 8 对杂交信号共位于 6 对同源染色体上, 它们分别是 1 号、2 号、3 号、4 号、9 号和 10 号染色体。

## 4 结 论

本试验从分子水平为中国大白菜的 1~4 号、9 号和 10 号染色体提供了识别标记。但是, 要想准确、快速地鉴别大白菜所有的染色体, 还需采用更多的特异

探针进行 FISH 杂交, 同时将杂交位点与大白菜染色体的细胞学特征相结合, 建立大白菜每条染色体的特异标记。

致谢: 武汉大学生命科学学院李立家教授为本试验提供探针和技术帮助, 特此感谢!

## References

- [1] Zhang D M, Sang T. Physical mapping of ribosomal RNA genes in peonies(*Paonia*, Paoniaceae) by fluorescent in situ hybridization: implications for phylogeny and concerted evolution. *American Journal of Botany*, 1999, 86:735-740.
- [2] Wasko A P, Galetti Jr P M. Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon*(Characidae) by fluorescence in situ hybridization(FISH). *Genetics and Molecular Biology*, 2000, 23(1): 135-138.
- [3] Siroky J, Zluvova J, Riha K, Shippen D E, Vyskot B. Rearrangements of ribosomal DNA clusters in late generation telomerase-deficient *Arabidopsis*. *Chromosoma*, 2003, 112: 116-123.
- [4] Pillay M, Myers G O. Genetic diversity in cotton assessed by variation in ribosomal RNA genes and AFLP markers. *Crop Science*, 1999, 39: 1881-1886.
- [5] 谭 睿, 马得泉, 丁 毅. 中国西藏近源野生大麦 5S rDNA NTS 序列分析. *遗传学报*, 2005, 32: 1094-1100.  
Tan R, Ma D Q, Ding Y. Comparative analysis of sequences of the 5S rDNA NTS in wild close relatives of barley from Tibet of China. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32: 1094-1100. (in Chinese)
- [6] Liu Z L, Zhang D M, Wang X Q, Ma X F, Wang X R. Intragenomic and interspecific 5S rDNA sequence variation in five Asian pines. *American Journal of Botany*, 2003, 90(1): 17-24.
- [7] 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98:1-9.
- [8] Shishido R, Sano Y, Fukui K. Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes. *Molecular and General Genetics*, 2000, 263: 586-591.
- [9] Montijn M B, Houtsmuller A B, ten Hoopen R, Oud J L, Nanninga N. The 5S rRNA gene clusters have a defined orientation toward the nucleolus in *Petunia hybrida* and *Crepis capillaries*. *Chromosome Research*, 1999, 7: 387-399.
- [10] Dhar M K, Kaul S, Friebe B, Gill B S. Chromosome identification in *Plantago ovata* Forsk. Through C-banding and FISH. *Current Science*, 2002, 83(2): 150-152.

- [11] Murata M, Heslop-Harrison J S, Motoyoshi F. Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones. *The Plant Journal*, 1997, 12(1): 31-37.
- [12] Cheng B F, Heneen W K, Pedersen C. Ribosomal RNA gene loci and their nucleolar activity in *Brassica alboglabra* Bailey. *Hereditas*, 1995, 123: 169-173.
- [13] Fukui K, Nakayama S, Ohmido N, Yoshiaki H, Yamabe M. Quantitative karyotyping of three diploid *Brassica* species by imaging methods and localization of 45S rDNA loci on the identified chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96: 325-330.
- [14] Snowden R J, Friedt W, Köhler A, Köhler W. Molecular cytogenetic localization and characterization of 5S and 25S rDNA loci for chromosome identification in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Annals of Botany*, 2000, 86: 201-204.
- [15] Schrader O, Budahn H, Ahne R. Detection of 5S and 25S rRNA genes in *Sinapis alba*, *Raphanus sativus* and *Brassica napus* by double fluorescence *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100: 665-669.
- [16] Hasterok R, Maluszynska J. Nucleolar dominance does not occur in root tip cells of allotetraploid *Brassica* species. *Genome*, 2000, 43: 574-579.
- [17] Hasterok R, Jenkins G, Langdon T, Jones R N, Maluszynska J. Ribosomal DNA is an effective marker of *Brassica* chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103: 486-490.
- [18] Lim K B, Jong H D, Yang T J, Park J Y, Kwon S J, Kim J S, Lim M H, Kim J A, Jin M, Jin Y M, Kim S H, Lim Y P, Bang J W, Kim H I, Park B S. Characterization of rDNAs and Tandem repeats in the heterochromatin of *Brassica rapa*. *Molecules and Cells*, 2005, 19(3): 436-444.
- [19] 杭超, 宋运淳, 刘立华, 丁毅, 谭光轩. 玉米两个 RFLP 标记的原位单杂交与共杂交定位的比较. *遗传学报*, 1999, 26(1): 69-75.  
Hang C, Song Y C, Liu L H, Ding Y, Tan G X. Comparisons of location between *in situ* hybridization and cohybridization of two RFLP markers in maize. *Acta Genetica Sinica*, 1999, 26(1): 69-75. (in Chinese)
- [20] 别墅, 王坤波, 王春英, 宋国立, 孔繁玲, 刘方, 刘三宏, 黎绍惠, 张香娣, 王玉红. 二倍体栽培棉 45S rDNA-FISH 作图及核型比较. *棉花学报*, 2004, 16: 223-228.  
Bie S, Wang K B, Wang C Y, Song G L, Kong F L, Liu F, Liu S H, Li S H, Zhang X D, Wang Y H. Studies on 45S rDNA-FISH and karyotype of *Gossypium herbaceum* and *Gossypium arboreum*. *Cotton Science*, 2004, 16: 223-228. (in Chinese)
- [21] 龚志云, 吴信淦, 程祝宽, 顾铭洪. 水稻 45S rDNA 和 5S rDNA 的染色体定位研究. *遗传学报*, 2002, 29: 241-244.  
Gong Z Y, Wu H K, Cheng Z K, Gu M H. Physical mapping of the 45S rDNA and 5S rDNA to rice prometaphase chromosome. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29: 241-244. (in Chinese)
- [22] Li L J, Arumuganathan K. Physical mapping of 45S and 5S rDNA on maize metaphase and sorted chromosomes by FISH. *Hereditas*, 2001, 134: 141-145.
- [23] 李懋学, 张赞平. 作物染色体及其研究技术. 北京: 中国农业出版社, 1996: 14.  
Li M X, Zhang Z P. *Crop Chromosome and Research Technique*. Beijing: China Agricultural Press, 1996: 14. (in Chinese)
- [24] 宋林生, 樊延玉, 王秀玲, 郭世宜, 张自立. 用原位杂交技术对玉米中期染色体中 rRNA 的研究. *南开大学学报(自然科学)*, 1995, 28(3): 1-5.  
Song L S, Fan T Y, Wang X L, Guo S Y, Zhang Z L. Studies on rRNA in metaphase chromosome of *Zea mays* by *in situ* hybridization. *Acta Scientiarum Natrualium Universitatis Nankaiensis*, 1995, 28(3): 1-5. (in Chinese)
- [25] Kulak S, Hasterok R, Maluszynska J. Karyotyping of *Brassica* amphidiploids using 5S and 25S rDNA as chromosome markers. *Hereditas*, 2002, 136: 144-150.
- [26] 申书兴, 李振秋, 张成合, 王彦华, 陈雪平. 大白菜 3 号、6 号染色体双三体及其初级三体的鉴定. *园艺学报*, 2002, 29: 438-442.  
Shen S X, Li Z Q, Zhang C H, Wang Y H, Chen X P. Identification of double triplo-3, 6 and acquisition of primary triplo-3 and triplo-6 in Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, 29: 438-442. (in Chinese)

(责任编辑 曲来娥)