

Chrysanthemum weyrichii 基因组测定及 rDNA 定位

钱 双^{1,2}, 李 昂², 赵 鑫², 杨树华², 李名扬¹, 葛 红²

(1. 西南大学 园艺园林学院, 重庆市花卉工程技术研究中心, 重庆 400716; 2. 中国农业科学院 蔬菜花卉研究所, 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 国家花卉改良中心, 北京 100081)

摘 要:以 *Chrysanthemum weyrichii* 为试材, 采用流式细胞术估算其基因组大小, 同时利用染色体计数法统计了 *C. weyrichii* 的染色体条数并对其 rDNA 染色体定位进行了研究。结果表明: *C. weyrichii* 基因组大小为 10.02 Gb, 染色条数为 $2n=8x=72$, 5S rDNA 杂交信号有 4 对位点, 位于染色体的亚中部; 45S rDNA 杂交信号有 8 对位点, 位于染色体的末端。该研究结果为该物种基因组分析以及菊属植物染色体进化研究提供了依据。

关键词: *Chrysanthemum weyrichii*; 流式细胞术; 染色体; rDNA; 荧光原位杂交

中图分类号: S 682.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2016)12-0101-05

基因组大小(或称 C-值)是指某种生物单倍体细胞核或配子中 DNA 的含量^[1], 其单位常用质量(pg)或碱基对数目(Gb)来表示, 二者的换算关系为 1 pg=0.978 Gb。目前常用的测定基因组大小的方法主要有 3 种: 浮耳根微显影(Feulgen microdensitometry)、流式细胞术(Flow cytometry, FCM)和基因组测序(Genomic sequencing)。流式细胞术因操作简单、分析快速、花费较小等优点在植物基因组测定研究中广泛使用。1983 年, GALBRAITH 等^[2]首次运用 FCM 成功测定了 17 种植物的核 DNA 含量, 开创了 FCM 检测植物核 DNA 含量的先河。目前, 以合理的参考物种作为参照, 利用流式细胞仪来估算物种基因组大小的方法已经在多种植物中运用^[3-6]。物种基因组大小反映了该物种全部或特定的遗传信息, 对基因组大小的研究不仅可以为物种亲缘关系研究、基因组测序和分析奠定基础, 还可以为杂交育种材料的选择提供理论依据^[7]。

核糖体 DNA(rDNA, ribosome DNA)是指基因组中转录生成 rRNA 前体的 DNA 序列。在真核生物中, rD-

NA 有 2 种转录单元, 45S rDNA(编码 18S、5.8S 和 26S rRNA)和 5S rDNA。45S rDNA 为串联重复序列, 位于核仁组织区(NOR), 与核仁形成有关, 5S rDNA 也为串联重复序列, 但不参与核仁形成^[8-9]。荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)是一种简单而高效的在染色体上对 DNA 序列进行物理定位的技术, 它可以将功能基因、重复序列等目标 DNA 片段直接定位在染色体上^[10]。通过荧光原位杂交技术将 rDNA 在染色体上进行物理定位, 不但可以为核型分析提供有效的细胞学识别标记, 阐明染色体的结构变异等重要的遗传学问题, 还可以进一步研究植物种属间的进化关系^[11-13]。目前, rDNA 已在多种植物的基因组中进行了物理定位, 为这些物种的染色体识别、基因组结构分析、物理图谱的构建以及种属间进化关系、多倍体起源的研究提供了重要信息^[14-18]。

菊属(*Chrysanthemum* L.)植物全世界约有 41 种, 主要分布在中国、日本、朝鲜、俄罗斯^[19]。该属为多年生草本植物, 染色体基数 $x=9$, 倍性丰富, 同时还存在种内多倍体。*Chrysanthemum weyrichii* 原产日本、俄罗斯等地, 其舌状花淡紫色(图 1), 叶片形态奇特, 茎秆粗壮。20 世纪 90 年代中期, 明尼苏达大学利用 *C. weyrichii* 进行种间杂交, 首次获得了大型灌木状菊花品种和自然匍匐型的菊花品种^[20]。目前, 该物种基因组大小及其染色体组上的 rDNA 物理定位尚鲜见报道, 该试验测定了 *C. weyrichii* 的基因组大小并对其染色体上的 rDNA 进行了物理定位, 为该物种基因组学及菊属植物

第一作者简介: 钱双(1991-), 女, 四川广安人, 硕士研究生, 研究方向为观赏植物生物技术与遗传育种。E-mail: 990602213@qq.com.

责任作者: 葛红(1964-), 女, 研究员, 研究方向为花卉资源的收集与育种。E-mail: gehong@caas.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(C150302); 国家“863”计划资助项目(2011AA100208)。

收稿日期: 2016-03-11



图1 *C. weyrichii* 头状花形态(标尺=1 cm)

Fig. 1 The head flower morphology of *C. weyrichii* (Bar=1 cm)
间的亲缘关系研究提供了依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

C. weyrichii 植株由北京林业大学赵惠恩副教授赠送,保存在中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室。向日葵(*Helianthus annuus*)种子由中国科学院植物研究所刘公社研究员提供,生菜(*Lactuca sativa*)种子由中国农业科学院蔬菜花卉研究所徐兆生研究员提供。含有玉米45S rDNA,5S rDNA序列的质粒由中国农业大学国家玉米改良中心金危危教授惠赠。

1.2 试验方法

1.2.1 流式细胞仪测定基因组大小 该试验选用同为菊科且已知DNA-2C值的二倍体植物向日葵和生菜为参照,估算*C. weyrichii*的基因组大小。向日葵和生菜用萌发20 d的实生苗叶片进行分析,*C. weyrichii*用组培新生叶片分析。流式细胞测定工作在北京市农林科学院蔬菜研究中心完成。(1~2) cm×(1~2) cm大小的样品,放入小培养皿中,加入1 mL核提取缓冲液,用锋利的刀片快速切碎,切碎后放置2 min,期间摇动。用42 μm尼龙膜过滤匀浆至1.5 mL离心管中,4℃,大离心机600 r·min⁻¹离心6 min。倒掉上清液,加入200 μL荧光染料PI(碘化丙啶)溶液(50 μg·mL⁻¹),将沉淀弹起,4℃避光染色20 min。取出用流式细胞仪(BD,FAC-SCalibur,USA)测定,每次测定前将样品摇匀。流式细胞仪只在最开始测定参考样品为标准时调节样品的流速和阈值,样品测定之中不再调节以减少误差,待测样品做2次生物学重复。待测样品核DNA含量=待测样品G1峰荧光值/参照样品G1峰荧光值×参照样品核DNA含量。

1.2.2 染色体制片 取*C. weyrichii*茎段接于MS培养基中培养15 d,得到大量无菌组培苗,再转移到1/2MS+

0.1 mg·L⁻¹ NAA培养基上生根,待根长到1 cm左右时,剪下根尖浸泡在0.002 mol·L⁻¹的8-羟基喹啉溶液中,于4℃处理3 h,取出后用双蒸水清洗3遍,保存在固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1)中备用,-20℃可长期保存。染色体制备参照陈瑞阳等^[21]的方法稍加修改。将根尖从固定液中取出,用ddH₂O清洗3次,放入混合酶液(2%纤维素酶和1%果胶酶)中,37℃条件下酶解80~100 min,吸去酶液,ddH₂O清洗3次,火焰干燥法制片。制片完成后用相差显微镜观察,好制片,-20℃保存待用。

1.2.3 荧光原位杂交 探针标记采用缺口平移法,5S rDNA用地高辛-dUTP标记,45S rDNA用生物素-dUTP标记。选取好的中期分裂相染色体进行荧光原位杂交^[22]。杂交信号5S rDNA用抗地高辛的罗丹明(Roche)做信号检出,45S rDNA用抗生物素的FITC(Roche)做信号检出。染色体使用DAPI(Vector Laboratories)复染。最后在配有CCD(charge coupled device)偶联的Olympus BX53荧光显微镜下观察,用Cellsense Standard软件采集染色体图像,用Adobe Photoshop CS6进行图像处理。

2 结果与分析

2.1 基因组大小估算

利用流式细胞仪测定*C. weyrichii*细胞核DNA含量(图2)。试验用的生菜DNA-2C值为5.32 pg^[23],以此作为参照,根据*C. weyrichii*和参照样品G1峰值的比值关系,由此可以估算*C. weyrichii*相对DNA-2C值为20.08 pg,则基因组大小(DNA-1C值)约为9.82 Gb。以同样的方法,用向日葵作为参照,已知向日葵DNA-2C值为7.23 pg^[24],估算*C. weyrichii*相对DNA-2C值为20.90 pg,基因组大小(DNA-1C值)约为10.22 Gb(表1)。该结果与以生菜为参照获得的估算结果基本一致。取二者的平均值得到*C. weyrichii*的基因组大小约10.02 Gb。

表1 *C. weyrichii* 2C DNA 含量估算

Table 1 2C DNA content estimation of *C. weyrichii*

样品 Sample	G1 值 G1 value	平均值 Mean value	按生菜估算 Estimated by <i>L. sativa</i> /pg	按向日葵估算 Estimated by <i>H. annuus</i> /pg	变异系数 CV/%
生菜	37.43	37.43			4.13
向日葵	48.86	48.86			2.72
<i>C. weyrichii</i> 1	139.18	141.26	20.08	20.90	3.59
<i>C. weyrichii</i> 2	143.33				

2.2 染色体计数

通过染色体制片统计*C. weyrichii*细胞内染色体条数,共统计30个细胞,染色体条数在67~78波动,73.3%的分裂相集中在72条左右,根据菊属植物染色体

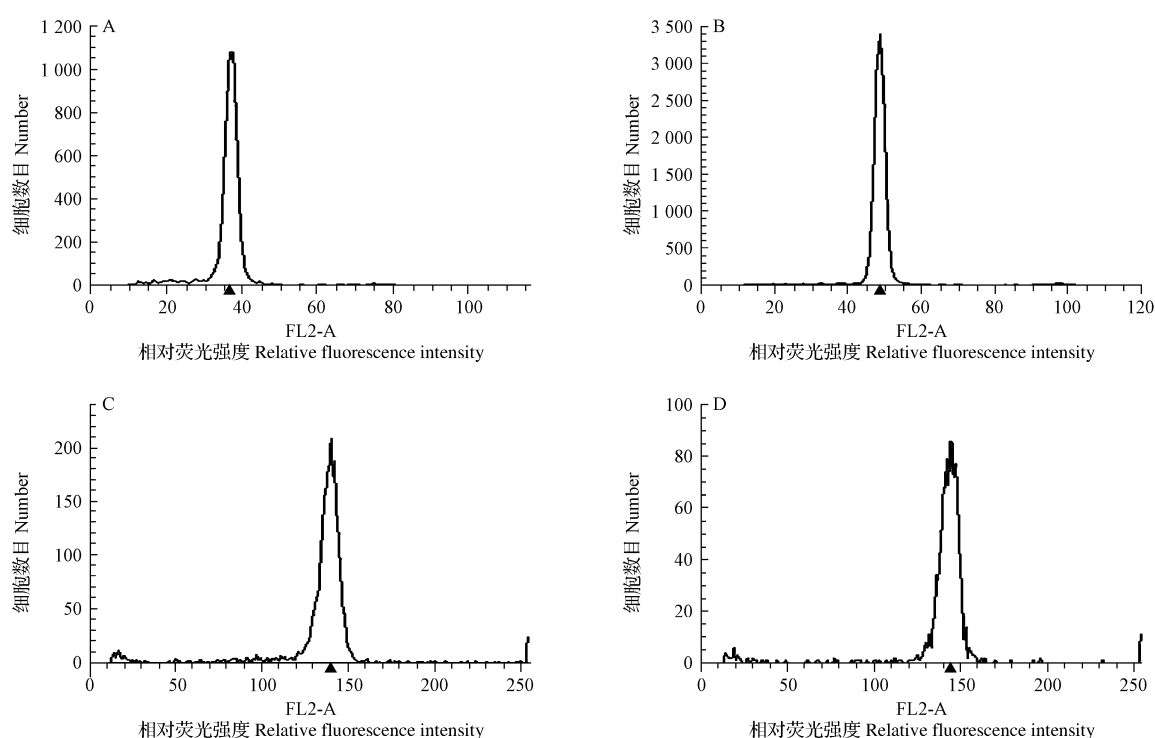


图2 生菜(A)、向日葵(B)和 *C. weyrichii* (C、D) 的流式细胞术测定

Fig. 2 The flow cytometry determination result of *Lactuca sativa* (A), *Helianthus annuus* (B) and *C. weyrichii* (C, D)

并且杂交信号均位于染色体的末端(图4, H, 三角形所示)。

3 讨论

该试验首次选择以生菜和向日葵为参照物种,测定了 *C. weyrichii* 的基因组大小。生菜和向日葵作为菊科中优先纳入基因组测序的物种(<http://compgenomics.ucdavis.edu/index.php>),核基因组大小已知且恒定,其染色质结构与同为菊科的 *C. weyrichii* 较为相似,基本符合 DOLEZEL 等^[25] 提出的“Dolezel's standard plant set”,以其作为参考具有可信性。由此,以生菜、向日葵为参照,也可估算菊属其它物种的基因组大小,为后续基因组大小测定提供依据。

在菊属植物中,二倍体甘菊(*C. lavandulifolium*)、泡黄金菊(*C. boreale*)、异色菊(*C. dichrum*)、菊花脑(*C. nankingense*)、*C. japonicum* 的 5S rDNA 位点 1 对,四倍体野菊(*C. indicum*)、小红菊(*C. chanetii*)有 2 对,六倍体毛华菊(*C. vestitum*)有 4 对^[26],该试验中的八倍体 *C. weyrichii* 有 4 对 5S rDNA 位点。由此可见,在菊属植物中 5S rDNA 位点的数目与物种的倍性具有一定的关系,倍性越高,5S rDNA 位点的数目相对越多。ROA 等^[27] 对 784 个物种的 5S rDNA 位置进行了统计,结果显示位于染色体短臂近着丝粒的概率最大, *C. weyrichii* 也与之相吻合。而 45S rDNA 位点数目在不同倍性的菊

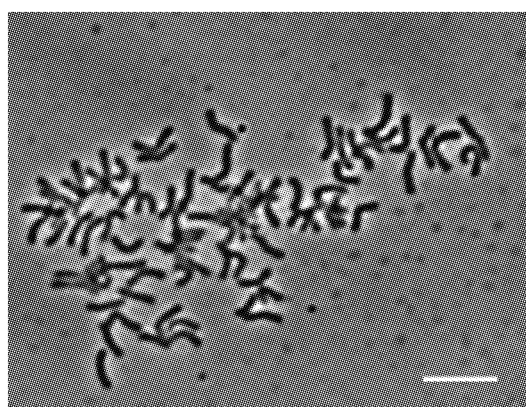


图3 *C. weyrichii* 染色体形态分布(标尺=10 μm)

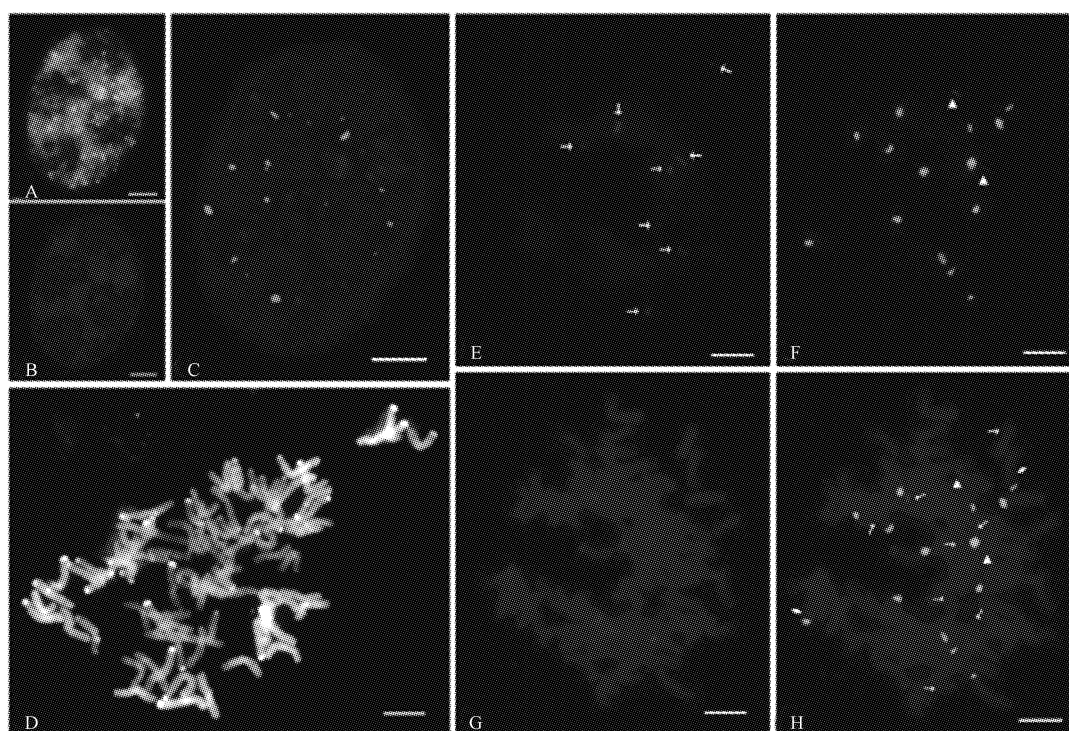
Fig. 3 The chromosome morphology of

C. weyrichii (Bar=10 μm)

基数为 9,推测 *C. weyrichii* 染色体条数为 $2n=8x=72$ (图3)。

2.3 荧光原位杂交分析

荧光原位杂交结果表明,5S rDNA、45S rDNA 在 *C. weyrichii* 细胞分裂的间期和中期染色体上均有明显的 FISH 杂交信号,红色信号为 5S rDNA,绿色信号为 45S rDNA(图4)。在细胞分裂中期染色体上,5S rDNA 有 4 对位点,1 对微弱,3 对稍强(图4, E, 箭头所示),杂交信号位于染色体亚中部(图4, H, 箭头所示)。45S rDNA 有 8 对位点,7 对较强,1 对较弱(图4, F, 三角形所示),



注: A~C. 同一间期核 DAPI 染色体及 FISH 信号(5S rDNA 红色, 45S rDNA 绿色); D. 有丝分裂中期染色体; E~H. 5S rDNA 和 45S rDNA 在 *C. weyrichii* 有丝分裂中期染色体上的定位; E. 5S rDNA 杂交信号(红色); F. 45S rDNA 杂交信号(绿色); G. DAPI 复染的染色体; H. 5S rDNA(红色)、45S rDNA(绿色)与 DAPI 复染的染色体(蓝色)的合成图。标尺=5 μm 。

Note: A-C. FISH signals of 5S rDNA(red) and 45S rDNA(green) sites on interphase chromosomes; D. Metaphase chromosomes of *C. weyrichii*; E-H. FISH localization of 5S rDNA and 45S rDNA on metaphase chromosomes of *C. weyrichii*; E. FISH signals of 5S rDNA(red); F. FISH signals of 45S rDNA(green); G. DAPI-stained chromosomes in metaphase; H. A merged image of the metaphase chromosomes and the FISH signals of 5S rDNA(red) and 45S rDNA(green). Bar=5 μm .

图 4 5S rDNA 和 45S rDNA 在 *C. weyrichii* 体细胞染色体上的荧光原位杂交分析

Fig. 4 Fluorescence in situ hybridization of 5S rDNA and 45S rDNA on mitotic chromosomes of *C. weyrichii*

属植物中变化较大,如二倍体 *C. horaimontana* 1 对位点,二倍体菊花脑和异色菊有 4 对位点,四倍体野菊 6 对位点,六倍体毛华菊 5 对位点,八倍体台湾菊(*C. morii*)5 对位点^[28]。在其它物种中,如葫芦科^[29]、百合属^[30]等的 45S rDNA 位点数目也无明显规律。虽然菊属植物的 45S rDNA 位点数目变化较大,但其 45S rDNA 信号在染色体上的位置却比较固定,基本上位于染色体末端^[31]。另外在 *C. weyrichii* 的某些染色体上可以观察到次缢痕(图 4H,菱形所示),次缢痕是染色体上的缢痕部位,由于该处的部分的 DNA 松懈而使染色体变细,一般来说,次缢痕和 rDNA 序列相关。在该试验中,在有次缢痕的染色体上也观察到了 45S rDNA 杂交信号。因 5S rDNA 和 45S rDNA 位点个数有限,要想识别更多的染色体,还得从其基因组开发特异的重复序列作为探针,这不仅可以准确分析 *C. weyrichii* 的核型,还可以更好的分析菊属植物间的亲缘关系以及基因组的演化进程。

参考文献

[1] BENNETT M D, BHANDOL P, LEITCH I J. Nuclear DNA amounts

in angiosperms and their modern uses-807 new estimates[J]. Annals of Botany, 2000, 86(4): 859-909.

[2] GALBRAITH D W, HARKINS K R, MADDOX J M, et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues[J]. Science, 1983, 220(4601): 1049-1051.

[3] ARUMUGANATHAN K, EARLE E D. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1991, 9(3): 229-241.

[4] PRICE H J, MORGAN P W, JOHNSTON J S. Environmentally correlated variation in 2C nuclear DNA content measurements in *Helianthus annuus* L[J]. Annals of Botany, 1998, 82(12): 95-98.

[5] ZÁVESKÝL, JAROLÍMOVÁ V, ŠTĚPÁNEK J. Nuclear DNA content variation within the genus *Taraxacum* (Asteraceae)[J]. Folia Geobotanica, 2005, 40(1): 91-104.

[6] 郭水良, 于晶, 李丹丹, 等. 长三角及邻近地区 138 种草本植物 DNA C-值测定及其生物学意义[J]. 生态学报, 2015, 35(19): 6516-6529.

[7] DOLEZEL J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes[J]. Journal of Applied Genetics, 1997, 38(3): 285-302.

[8] INAFUKU J, NABEYAMA M, KIKUMA Y, et al. Chromosomal location and nucleotide sequences of 5S ribosomal DNA of two cyprinid species (*Osteichthyes*, *Pisces*)[J]. Chromosome Research, 2000, 8(3): 193-199.

- [9] HANSON R E, ISLAM-FARIDI M N, PERCIVAL E A, et al. Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors[J]. *Chromosoma*, 1996, 105(1): 55-61.
- [10] JIANG J, GILL B S. Nonisotopic in situ hybridization and plant genome mapping: The first 10 years[J]. *Genome*, 1994, 37(5): 717-725.
- [11] BUSTOS A D, CUADRADO A, SOLER C, et al. Physical mapping of repetitive DNA sequences and 5S and 18S-26S rDNA in five wild species of the genus *Hordeum*[J]. *Chromosome Research*, 1996, 4(7): 491-499.
- [12] VAO M, SPERANZA P, VALLS J F, et al. Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the *Quadrifaria* group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae)[J]. *Annals of Botany*, 2005, 96(2): 191-200.
- [13] WANG W K, DAI S L, LI M X. Physical mapping of rDNA in *Dendranthema kingense* and its close related species by fluorescent *in situ* hybridization[J]. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 2002, 7(3): 911-917.
- [14] 吴菁华, 张志忠, 吕柳新. 45S rDNA 和 5S rDNA 在水仙染色体上的物理定位[J]. *热带作物学报*, 2008, 29(5): 618-621.
- [15] 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(5): 614-620.
- [16] 张婷, 蹇洪英, 田敏, 等. 蔷薇属 3 个野生种中 45S rDNA 和 5S rDNA 的物理定位[J]. *园艺学报*, 2014, 41(5): 994-1000.
- [17] ROBERT H, AGNIESZKA M, DONNISON I S, et al. Alignment of the Genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence *in situ* hybridization[J]. *Genetics*, 2006, 173(1): 349-362.
- [18] QI X Y, ZHANG F, GUAN Z Y, et al. Localization of 45S and 5S rDNA sites and karyotype of *Chrysanthemum* and its related genera by fluorescent *in situ* hybridization[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015, 62: 164-172.
- [19] OBERPRIELER C, VOGT R, WATSON L. Anthemideae in Kubitzki, In: KADEREIT J W, JEFFREY C. (Eds.). *The families and genera of vascular plants*[J]. Springer, 2007, 8(23): 324-374.
- [20] ANDERSON N O. Flower breeding and genetics: Issues, challenges and opportunities for the 21st century[M]. Germany: Springer, 2006: 23-28.
- [21] 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰. 植物有丝分裂染色体制片的新方法[J]. *植物学报*, 1979, 21(3): 297-298.
- [22] JIANG J, NASUDA S, DONG F, et al. A conserved repetitive DNA element located in the centromeres of cereal chromosomes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(24): 14210-14213.
- [23] MICHAELSON M J. Comparison of plant DNA contents determined by Feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry[J]. *American Journal of Botany*, 1991, 78(2): 183-188.
- [24] BAACK E J, WHITNEY K D, RIESEBERG L H. Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species[J]. *New Phytologist*, 2005, 167(2): 623-630.
- [25] DOLEZEL J, BARTOS J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size[J]. *Annals of Botany*, 2005, 95(1): 99-110.
- [26] ABD EL-TWAB M H, KONDO K. Physical mapping of 5S rDNA in chromosomes of *Dendranthema* by fluorescence *in situ* hybridization[J]. *Chromosome Science*, 2002, 6: 13-16.
- [27] ROA F, GUERRA M. Non-Random Distribution of 5S rDNA sites and its association with 45S rDNA in plant chromosomes[J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2015, 146(3): 164-172.
- [28] ABD EL-TWAB M H, KONDO K. Physical mapping of 45S rDNA loci by fluorescent *in situ* hybridization and evolution among polyploidy *Dendranthema* species[J]. *Chromosome Science*, 2003, 7(3): 71-76.
- [29] 李琦, 马璐, 黄婧, 等. 西瓜、苦瓜与罗汉果染色体的 rDNA 定位及其核型分析[J]. *武汉大学学报(理学版)*, 2007, 53(4): 449-456.
- [30] 周树军, JAAP van TUYL, 臧德奎, 等. 45S rDNA 在 4 种百合属植物染色体上的物理定位[J]. *园艺学报*, 2008, 35(6): 859-862.
- [31] ABD E M H, KONDO K. Physical mapping of 5S and 45S rDNA in *Chrysanthemum* and related genera of the Anthemideae by FISH, and species relationships[J]. *Journal of Genetics*, 2012, 91(2): 245-249.

Estimation of Genomic Size and Physical Location of rDNA of *Chrysanthemum weyrichii*

QIAN Shuang^{1,2}, LI Ang², ZHAO Xin², YANG Shuhua², LI Mingyang¹, GE Hong²

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture/Chongqing Engineering Research Center for Floriculture, Southwest University, Chongqing 400716; 2. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops, Ministry of Agriculture/Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Flowers Improvement Center of China, Beijing 100081)

Abstract: Taking *Chrysanthemum weyrichii* as test material, the genome size of *C. weyrichii* was estimated by flow cytometry. The chromosome numbers and rDNA chromosomal location of *C. weyrichii* were studied by chromosome counting method and fluorescence in situ hybridization for the first time. The results showed that the genome size was 10.02 Gb, chromosome numbers were $2n=8x=72$, four pairs of 5S rDNA located at submetacentric regions and eight pairs of 45S rDNA located at terminal regions were detected. This study provided a valuable basis for future genomic and cytogenetic studies in *C. weyrichii*.

Keywords: *Chrysanthemum weyrichii*; flow cytometry; chromosome; rDNA; fluorescence *in situ* hybridization