

DOI:10.11937/bfyy.201511021

蕙兰(*Cymbidium faberi* Rolfe)基因组大小测定

汪琛颖^{1,2}, 张坤³, 梁芳⁴, 崔波⁴, 马润林⁵

(1. 郑州师范学院 生命科学学院, 河南 郑州 450044; 2. 郑州师范学院 分子生物学实验室, 河南 郑州 450044; 3. 黑龙江大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150080; 4. 郑州师范学院 生物工程研究所, 河南 郑州 450044; 5. 中国科学院 遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要:以蕙兰为试材,采用流式细胞分析技术,以铁皮石斛为外参,对其基因组大小进行估算。结果表明:蕙兰的基因组大小为 (4.39 ± 0.12) Gb,即2C DNA含量为8.98 pg。该研究探索了用流式细胞仪分析蕙兰基因组大小的方法,所得数据为蕙兰基因组测序提供了必要的基础。

关键词:蕙兰;基因组大小;流式细胞术;铁皮石斛

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)11-0086-05

蕙兰(*Cymbidium faberi* Rolfe)属兰科(Orchidaceae)兰属(*Cymbidium* Sw.)中国兰地生种类的主要种之一,是国家二级重点保护野生生物种。蕙兰一茎多花,植株飒爽挺秀、叶片刚柔兼备,姿态亭亭玉立,其香清芳幽远、沁人肺腑,是国兰代表性种类。但是因其自身繁殖速度较慢,某些品种几百年来仍只有数株。现有多数栽培种均是由野生自然变异种筛选而来,加上人类的滥采乱挖,目前,中国野生兰花资源日趋紧缺,新品种更新速度较慢。加之蕙兰组培苗尚未成功批量培植,传统繁殖的优良品种苗仍较受市场青睐,而且株价昂贵。蕙兰花多、蜜多,可开发花茶及香精油等产品。因此,对于蕙兰的研究不仅具有植物学方面的科研价值和观赏价值,而且亦包含有深厚的文化意蕴。基因组学研究是蕙兰品种改良的基础,新一代基因组测序技术的出现以及基因组学研究技术与理论的飞速发展有效提高传统育种效率提供了一条快捷途径。基因组序列包含生物的起源、进化、发育、生理以及与遗传性状有关的一切信息,是从分子水平上全面解析各种生命现象的前提和基础。蕙兰全基因组测序研究是在基因组层面开展的系列研究,该研究将会极大地推动前沿生命科学技术在国兰研究中的应用,在较短时间内实现国兰研究的跨越式发展,使其迅速走到生命科学研究的最前沿。经过全基因组测序和生物信息学分析获得蕙兰的生物信息数据应用到蕙兰进一步研究中,必将对进一步扩大和挖掘重要的物种资源,深入认识其遗传机制从而进行深度开发利用具有重要意义。而进行全基因组测序的必要基础之一即是对该物种基因组大小的测定,据此可估测该物种

的DNA含量,对测序工作前期预算的评估具有重要的意义。流式细胞仪可在高速液流中对DNA含量进行测定分析,检测器捕获单细胞悬浮液中经DNA特异性染料染色的细胞核被激发后所发射的荧光信号,并用直方图进行量化分析,通过与内参比较相对荧光强度,从而计算出DNA含量^[1]。流式分析技术已经被成功地应用于植物基因组大小测定^[2-7],其制样方法简便易行,检测结果较为稳定。

该研究以蕙兰为试材,选取铁皮石斛作为外参,用流式细胞仪对4组样品进行重复试验,通过比较计算测定蕙兰基因组大小,以期为其基因组研究提供必要的基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蕙兰(*Cymbidium faberi* Rolfe)及铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)组培苗均由郑州兰业工程技术研究中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞核悬液的制备 细胞核悬液制备方法及配方见参考文献[8-11]。铁皮石斛及蕙兰材料各准备4份,每份20 mg新鲜幼嫩叶片,洗净,控水,置冰浴培养皿中,分别加入1.5 mL冰冻的Galbraith's缓冲液,Tris-MgCl₂缓冲液,Lysis buffer(LB01)缓冲液,General purpose buffer(GPB)缓冲液。用锋利的手术刀片将叶片一次性快速切碎,忌挤压组织,整个过程材料须浸没在解离液中,以便更好的游离细胞核。培养皿上下轻轻晃动,混匀样品,用1 000 μ L移液器反复吸取几次,应避免气泡,将样品液用300目尼龙筛网过滤后置于2 mL离心管中。

1.2.2 DNA特异性染色 向冰浴处理上述2 mL离心管中的细胞核悬液中加入PI染料(1 mg/mL)和RNase A(1 mg/mL)至终浓度50 μ g/mL,轻摇,低温(4℃)避光

第一作者简介:汪琛颖(1968-),女,博士,教授,现主要从事植物分子系统发育等研究工作。E-mail:cywang2013@hotmail.com。

基金项目:河南省科技计划资助项目(132300410358)。

收稿日期:2015-01-21

染色 30 min。

1.2.3 流式细胞仪分析 开启流式细胞仪 Accuri C6 (美国 BD 公司), 样品流速设定为 $12 \mu\text{L}/\text{min}$, 每次样本至少收集 20 000 个细胞。保持流式细胞仪参数不变, 用外标法, 将外参铁皮石斛及待测样本蕙兰细胞核悬液分别放到流式细胞仪上测定。重复测定每样本 3 次。测定所得图像和数据由流式细胞仪自带软件进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 4 种细胞裂解液的裂解效果

该研究用上述 Galbraith's 缓冲液等 4 种细胞裂解液分别对铁皮石斛和蕙兰进行了充分的机械破碎, 以期选择可分离获得完整细胞核的最适裂解液, 结果见图 1、

表 1。4 种细胞裂解液对铁皮石斛及蕙兰叶片细胞均有一定裂解作用。就相对荧光强度 (relative fluorescence intensity of PI-stained nuclei, FL) 值来讲, 4 种裂解液对铁皮石斛的作用效果在统计学上存在显著差异 ($P=0.017$), 对蕙兰材料有极显著差异 ($P=0.002$)。用 Galbraith's 缓冲液进行裂解得出的 FL 值, 无论对于铁皮石斛亦或是蕙兰均高于其它 3 种裂解液。在用 4 种裂解液对蕙兰分别处理后进行的流式分析中, 变异系数 (coefficient of variation, CV) 均在 5% 以内, 其中 Galbraith's 缓冲液处理后的 CV 值最小, 为 2.42%, 由图 1 可以看出, Galbraith's 缓冲液制备的外参和待测样品的粒子团明确、清晰、集中, 表明选择 Galbraith's 缓冲

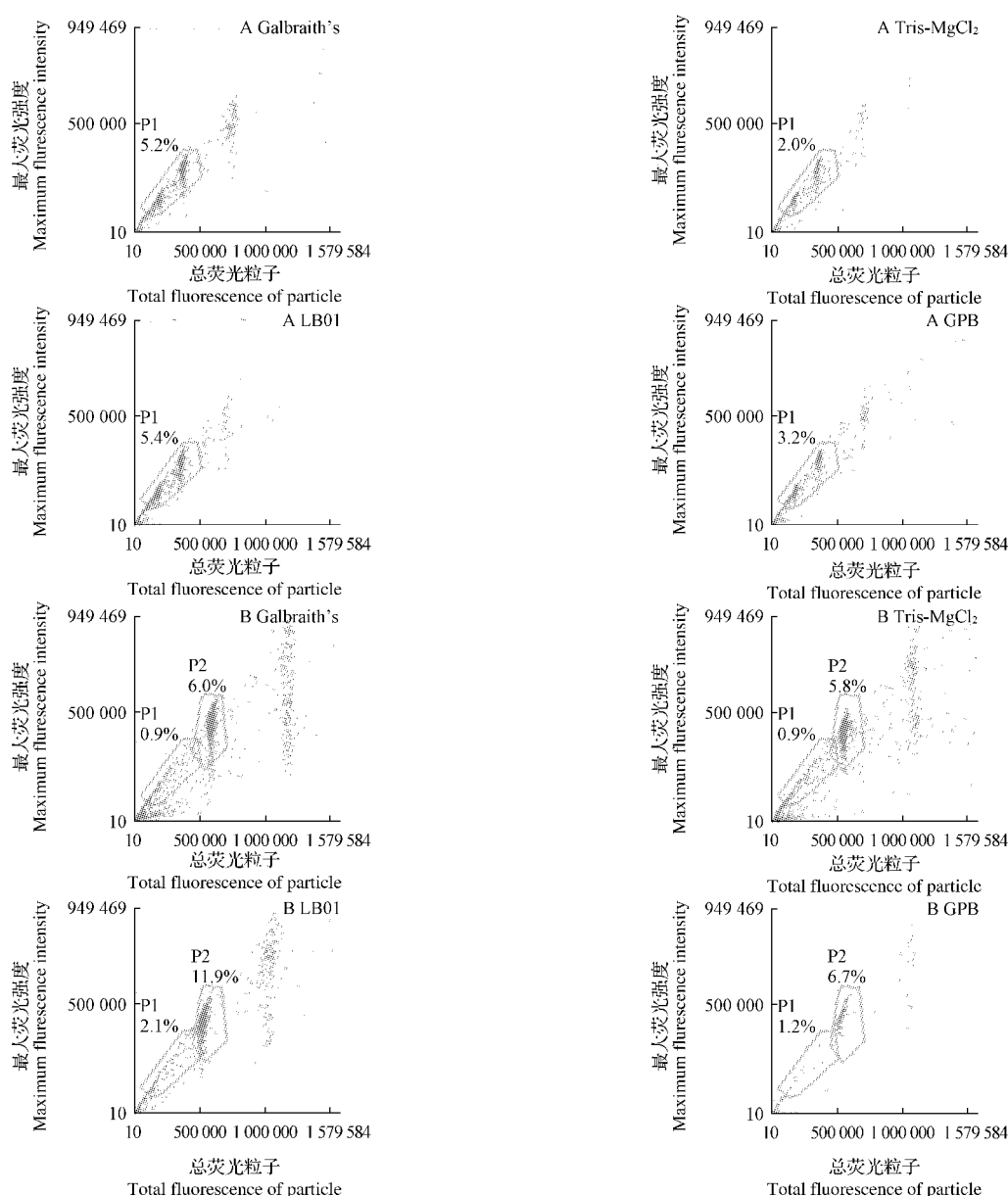


图 1 铁皮石斛(A)、蕙兰(B)分别经 Galbraith's, Tris-MgCl₂, LB01, GPB buffer 裂解结果-流式细胞仪亚细胞团分型散点图

Fig. 1 Subcellular scatter plot of PI-stained nuclei isolated with four lysis buffer Galbraith's, Tris-MgCl₂, LB01, GPB buffer, separately for *D. officinale*(A) or *C. faberi* (B)

表 1 4 种细胞裂解液的流式细胞术参数评定

Table 1 Assessment of flow cytometric parameters in four nuclear isolation buffers

裂解液	样品峰值	变异系数	外参峰值(G_0/G_1 峰)	变异系数	外参峰值(G_2/M 峰)	变异系数
Lysis buffer	Peak value of <i>C. faberi</i> (B)	CV/%	G_0/G_1 Peak value of <i>D. officinale</i> (A)	CV/%	G_2/M Peak value of <i>D. officinale</i>	CV/%
Galbraith	604 928.53±10 337.48 ^a	2.42±0.085	186 176.81±1 252.78 ^a	5.57±0.64	386 725.69±1 0171.14	3.40±0.39
Tris-MgCl ₂	576 879.40±6 975.99 ^b	3.25±0.97	181 881.51±5 190.22 ^b	5.61±0.17	373 424.07±5 980.01	3.74±0.30
LB01	580 607.49±3 924.19 ^b	3.29±0.80	176 105.93±1 837.98 ^b	5.16±0.26	366 220.44±403.57	3.49±0.05
GPB	579 149.02±1 691.18 ^b	3.47±0.21	175 710.70±4 040.21 ^b	4.69±0.20	368 285.26±1 042.42	3.78±0.58

注:不同字母表示差异显著($P<0.05$),每个样品重复 3 次,表中值为数据的平均值和标准差。

Note: The different letters show significant difference($P<0.05$),each sample is repeated three times,values are given as mean and standard deviation of the mean(SD).

液作为试验材料制备的裂解液,用以铁皮石斛为外参,进行蕙兰基因组大小的测定较为适宜的。

2.2 以铁皮石斛为参照的蕙兰基因组大小测定

铁皮石斛(*D. officinale*)属兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)植物,其全基因组测序已于 2013 年完成,大小为 1.35 Gb^[12]。在预备试验中,铁皮石斛材料在流式分析中出峰稳定,故被选择作为外参用以测

定蕙兰基因组大小。铁皮石斛、蕙兰流式细胞仪测定结果见图 2、3 所示。在流式分析中,铁皮石斛 3 次流式细胞仪检测结果均出现了双峰现象,且双峰出峰位置比列保持稳定。由表 1 可知,发现第 2 个峰的出峰位置为第 1 个峰的 2 倍。由此可见,第 1 峰为 G_0/G_1 期的 DNA 含量,第 2 个峰为 G_2/M 期的 DNA 含量。

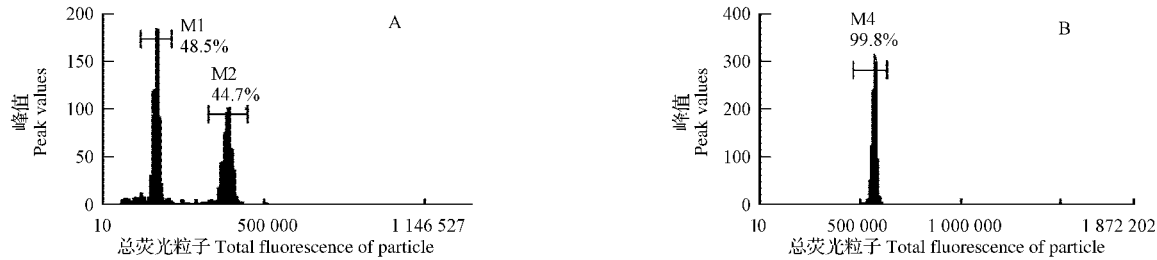
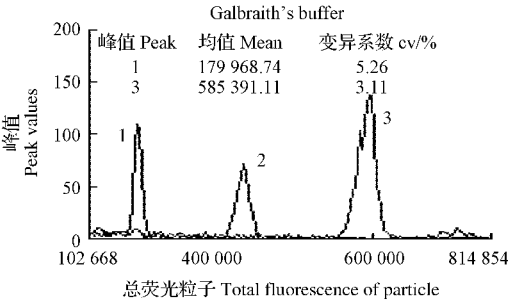


图 2 铁皮石斛(A)、蕙兰(B)流式细胞仪直方图

Fig. 2 Typical histogram obtained after flow cytometric analysis of PI-stained nuclei isolated from *D. officinale* (A) or *C. faberi*(B)

通过比较蕙兰样品与外参铁皮石斛 G_0/G_1 期的峰值大小可以发现,二倍体蕙兰基因组大小大于铁皮石

斛,是铁皮石斛的 3.25 倍(表 2),由此可估计蕙兰基因组大小为(4.39±0.12)Gb,或相对 DNA 含量为 4.49 pg (以 1 pg DNA=0.978×10⁹ bp 计算^[13])。



注:图 3 中 1 代表铁皮石斛 2C DNA 含量峰,2 代表铁皮石斛 4C DNA 含量峰,3 代表蕙兰 2C DNA 含量峰,mean 为道数的平均值,CV 为变异系数。所使用的裂解液为 Galbraith's buffer。

Note: Peak 1 corresponds to the nuclei in G_0/G_1 (with 2C DNA content), Peak 2 corresponds to the nuclei in G_2/M (with 4C DNA content) of *D. officinale*; Peak 3 corresponds to the nuclei in G_0/G_1 (with 2C DNA content) of *C. faberi*. The mean is for mean channel number, CV for the coefficient of variation. Galbraith's buffer was used as nuclear isolation buffer.

图 3 铁皮石斛及蕙兰流式细胞仪直方图结果叠加图

Fig. 3 Histograms of relative fluorescence intensities (PI fluorescence) obtained after simultaneous analysis of nuclei isolated from *D. officinale* and *C. faberi*

3 讨论

深圳兰科植物保护研究中心、清华大学、深圳华大基因研究院、中国科学院植物所、台湾成功大学等单位科学家于 2009 年 7 月正式启动世界上首个兰科植物全基因组和转录组测序和分析研究计划“兰花基因组计划”(Orchid Genome Project),已在 2009 年 11 月宣布完成“兰花基因组框架图”,并进一步绘制蝴蝶兰基因组精细图,通过 11 种兰花的基因比较分析构建兰科植物的进化体系^[14]。2013 年 9 月,云南农业大学等利用第 2 代测序技术和第 3 代单分子测序技术,绘制了铁皮石斛的全基因精细图谱^[12]。目前对兰科植物分子水平的研究多集中在如蝴蝶兰(*Phalaenopsis* ssp.)、文心兰(*Oncidium* ssp.)及石斛兰(*Dendrobium* ssp.)等洋兰上,对中国兰尤其是中国地生兰的分子水平研究也仅集中在某些功能基因的克隆及原核表达等方面^[15]。而作为观赏价值,经济价值最高的兰花之一^[16]的蕙兰的基因组学研究目前尚鲜见报道。

表 2

流式细胞仪测定的样品(蕙兰)和外参(铁皮石斛)结果

Table 2

Test results of *D. Officinale* and *C. faberi* using flow cytometry in Galbraith's buffer

测定重复 repetition	样品峰值(G_0/G_1 峰) G_0/G_1 Peak value of sample(<i>C. faberi</i>)	变异系数 CV /%	外参峰值(G_0/G_1 峰) G_0/G_1 Peak value of external reference (<i>D. officinale</i>)	变异系数 CV /%	(G_0/G_1 峰)蕙兰/铁皮石斛 (G_0/G_1) Peak value of sample/Peak value of external reference	蕙兰基因组大小 Genome size of <i>C. faberi</i> /Gb	蕙兰相对 DNA 含量 Relative content of DNA/pg
1	595 550.50	2.50	186 442.25	4.83	3.19	4.31	4.41
2	616 013.09	2.43	187 275.60	6.02	3.29	4.44	4.54
3	603 222.01	2.33	184 812.59	5.85	3.26	4.41	4.51
平均值 Average	603 222.01±9 044.66	2.38	186 176.81±1 252.78	4.83	3.25±0.05	4.39±0.12	4.49±0.07

基因组大小(又称 C-值)反映了生物物种全部和特定的遗传信息,不仅对该物种的分子遗传和细胞遗传等研究有重要意义,而且为植物的基因组学及亲缘进化研究提供基础资料。该研究以蕙兰为研究对象,测定其基因组大小并进行裂解液的筛选,目的是建立一个流式分析技术测定蕙兰基因组大小的平台。碘化丙啶(PI)是一种荧光染料,可被最大吸收在 488 nm 的可见光激发,其可插入双链 DNA 碱基对中,其流式结果稳定、可靠^[17]。样品通过核酸染料 PI 标记 DNA,在高速液流下逐个通过激光照射区时,受到激光照射会以细胞核为中心向空间 360°立体角的整个空间散射光线,发射产生荧光信号,散射光的强度及空间分布与细胞大小、形态、质膜和细胞内部结构密切相关,荧光强弱与 DNA 含量成正比,荧光信号经光电倍增管接受转换为电信号和可被计算机识别的数字信号被接收,故可用于估计生物基因组的大小^[2]。通过流式细胞仪分析可以得到细胞各个时期的分布状态,整个复制周期可以描述为 G_0/G_1 , S 及 G_2/M 。通过检测分辨率或精确度由 G_0/G_1 峰的变异系数 CV 来反映。该研究中 CV 值均控制在 5% 左右,表明试验结果是可靠的。该研究在选定外参时,采纳 Johnston 等^[17]的建议在进行植物基因组大小测定时,采用植物材料作为参照物。课题组曾尝试选用模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia))作为参照物。结果显示,由于拟南芥的基因组大小是 157 Mb^[18],太小,以其为外参测得的蕙兰 C-值是通过铁皮石斛作为参照物测得的蕙兰 C 值结果的 3.09 倍,差距太大。而铁皮石斛与蕙兰同属兰科植物,且其基因组大小已知。选用与蕙兰苗龄相同的铁皮石斛作为参照物得到的数据应更为准确^[19]。即蕙兰基因组大小为 4.39 Gb,且 3 次测定结果均可重复。

样品前期处理在流式细胞仪分析中是影响分析结果的重要因素之一。该研究从取材、机械破碎、染色时间等几方面对样品前期处理的条件进行探索。最终确定以下处理方式:第一,选用新鲜组织,取材后立即制样;第二,对组织进行机械破碎是目前植物基因组大小测定中最普遍的方法,机械破碎程度直接影响核分离程度,适合的机械破碎(强度和时间)可使峰形更好,从而得到更好的分析结果。该研究最终选定冰浴中用锋利

的手术刀片迅速切碎材料的方法;第三,避光,4℃,染色时间为 30 min。

总之,该研究利用流式细胞术,对蕙兰基因组大小的测定方法进行探索,测定蕙兰基因组大小,估测该物种的 DNA 含量,为该物种全基因组测序工作前期预算的评估提供指导。

参考文献

- [1] Doležel J, Bartoš J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size[J]. Ann Bot, 2005, 95(1): 99-110.
- [2] 桂毅杰, 王晨, 金艳丽, 等. 毛竹基因组大小和序列构成的比较分析[J]. 中国科学 C 辑(生命科学), 2007, 37(4): 488-492.
- [3] 孙永星, 李素花, 魏小丽, 等. 适合流式细胞仪分析的小麦细胞核提取方法比较[J]. 生物学杂志, 2012, 29(3): 88-91.
- [4] 李蔚, 刘莉莎, 李仁, 等. 十字花科蔬菜基因组含量的测定与分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(1): 103-106.
- [5] 吴丽萍, 唐岩, 李颖岳, 等. 枣和酸枣基因组大小的测定[J]. 北京林业大学学报, 2013, 35(3): 77-83.
- [6] 张志珂, 王永清, 林顺权, 等. 借助流式细胞仪进行枇杷基因组测序材料的倍性分析[J]. 果树学报, 2012, 29(3): 498-504.
- [7] 邓果特, 刘清波, 蒋建雄, 等. 五节芒基因组大小的测定[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(2): 339-341.
- [8] Galbraith D W, Harkins K R, Maddox J R, et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues[J]. Science, 1983, 220: 1049-1051.
- [9] Pfosser M, Amon A, Lelley T, et al. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines [J]. Cytometry, 1995, 21(4): 387-393.
- [10] Doležel J, Binarová P, Lucetti S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry[J]. Biol Plant, 1989, 31(2): 113-120.
- [11] Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, et al. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species[J]. Ann Bot, 2007, 100(4): 875-888.
- [12] 黎燕萍. 云南首绘铁皮石斛全基因组图谱解生命密码拓产业先机[N]. 大公报, 2013-09-20.
- [13] Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, et al. Nuclear DNA content and genome size of trout and human [J]. Cytometry A, 2003, 51(2): 127-128.
- [14] 贾少强, 卢博林. 兰花基因组框架图在深完成[N]. 深圳商报, 2009-11-16.
- [15] 田云芳, 蒋素华, 袁秀云, 等. 蕙兰 GAPDH 基因的全长克隆及生物信息学分析[J]. 江西农业学报, 2013, 35(4): 870-877.
- [16] 李小玲, 赵娜, 华智锐. 商洛山区野生花资源及其生境土壤特性调查[J]. 河南农业科学, 2011, 40(1): 112-114.
- [17] Johnston J S, Bennett M D, Rayburn A L, et al. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei[J]. Am J Bot, 1999, 86(5): 609-613.

DOI:10.11937/bfyy.201511022

AtGDPD-Like 6 和 AtGDPD-Like 7 基因启动子表达特性及 AtGDPD-Like 6 蛋白定位

王 崇, 程 玉 祥

(东北林业大学 林木遗传育种国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要:以野生型(Col-0)拟南芥为试材,采用 RT-PCR 法,研究 AtGDPDL6 和 AtGDPDL7 基因组织表达特性。以 ProAtGDPDL6::GUS 和 ProAtGDPDL7::GUS 转基因拟南芥为试材,采用 GUS 组织化学染色法,研究 AtGDPDL6 和 AtGDPDL7 基因启动子表达模式,并以 Pro35S::AtGDPDL6-GFP 转基因拟南芥为试材,采用激光共聚焦显微镜进行荧光观察,研究 AtGDPDL6 蛋白的细胞内定位。结果表明:AtGDPDL6 基因在拟南芥花组织中特异表达;AtGDPDL7 基因在花和角果中特异表达。AtGDPDL6 和 AtGDPDL7 基因特异表达在拟南芥成熟的花粉囊和柱头中。AtGDPDL6 蛋白定位于细胞膜和细胞壁区域。

关键词:拟南芥;GDPD-Like;表达模式;蛋白定位

中图分类号:Q 945 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)11-0090-05

甘油磷酸二酯磷酸二酯酶(glycerophosphodiester phosphodiesterase,GDPD)催化甘油磷酸二酯类物质水

第一作者简介:王崇(1989-),男,黑龙江哈尔滨人,硕士研究生,研究方向为林木遗传育种。E-mail:nefuwangchong@163.com.

责任作者:程玉祥(1972-),男,教授,现主要从事树木分子遗传与育种等研究工作。E-mail:chengyuxiang@nefu.edu.cn.

基金项目:国家“863”计划课题资助项目(2013AA102702)。

收稿日期:2015-01-23

解为甘油-3-磷酸(G-3-P)和相对应的醇类。GDPD 家族蛋白在大肠杆菌中最先被发现,其代谢是大肠杆菌获取碳和磷营养的主要途径^[1-2]。之后,GDPD 家族基因被证实广泛地存在于细菌、酵母、动植物和人类当中^[3-5]。此外,植物界还包含一个与 GDPD 类似的基因家族 GDPD-Like(GDPDL)。该家族基因是植物界所特有的,在藻类、苔藓、蕨类及种子植物中均被发现。与传统 GDPD 蛋白不同,GDPDL 蛋白包含 2 个非典型 GDPD

[18] Bennett M D, Leitch I J, Price H J, et al. Comparison of *Caenorhabditis* (100 Mb) and *Drosophila* (175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be (157 Mb) and thus 25% larger than the *Arabidopsis* Ge-

nome Initiative estimate of 125 Mb[J]. *Ann Bot*, 2003, 91: 547-557.

[19] 弓娜,田新民,周香艳,等. 流式细胞术在植物学研究中的应用-检测植物核 DNA 含量和倍性水平[J]. *中国农业通报*, 2011, 27(9): 21-27.

Estimation of Genome Size of *Cymbidium faberi* Rolfe

WANG Chen-ying^{1,2}, ZHANG Kun³, LIANG Fang⁴, CUI Bo⁴, MA Run-lin⁵

(1. College of Life Science, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou, Henan 450044; 2. Molecular Biology Laboratory, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou, Henan 450044; 3. College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080; 4. Institute of Bioengineering, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou, Henan 450044; 5. Institute of Genetics and Development Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: Taking *Cymbidium faberi* as material, using *D. officinale* Kimura et Migo as an external reference, flow cytometry measurements were performed when the genome size of *Cymbidium faberi* was estimated. The results showed that, the estimated genome size of *C. faberi* was (4.39 ± 0.12) Gb, or the content of 2C DNA was about 8.98 pg. The present study described a modified method of genome size analysis by using flow cytometry in *C. faberi*. The data available of DNA content obtained in this study was helpful to the future genome sequencing research.

Keywords: *Cymbidium faberi*; genome size; flow cytometry; *Dendrobium officinale*