

## 葱的CPD染色和45S rDNA FISH核型分析

刘良科,赵丽娟,李彬

(民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室/湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室  
/怀化学院生命科学系,湖南怀化 418008)

**摘要:**为给葱的染色体的识别提供新标记,建立葱的分子细胞遗传学核型,本研究采用去壁火焰干燥法制备了分散且形态良好的葱中期染色体,并进行了CPD(PI和DAPI组合)染色和45S rDNA荧光原位杂交(FISH),根据葱染色体的形态特征,结合CPD染色和FISH结果,对葱进行了核型分析。CPD染色结果:葱所有染色体臂末端都显示CPD带。FISH结果:有一对45S rDNA位点(在第5对染色体上)。葱的核型公式: $2n=2x=16=2sm+12m+2st(SAT)$ 。研究表明:利用CPD染色和45S rDNA FISH,不仅能为染色体识别提供新标记,还能了解染色体GC丰富区的分布,为葱属植物的物种鉴定、系统分类与进化等研究提供DNA分子方面的证据。

**关键词:**葱;染色体;CPD染色;FISH;核型

中图分类号:S633.1

文献标志码:A

论文编号:2010-2762

### Karyotype Analysis of *Allium fistulosum* L. Using CPD Staining and 45S rDNA Fluorescence in Situ Hybridization

Liu Liangke, Zhao Lijuan, Li Bin

(Key Laboratory of Hunan Province for Study and Utilization of Ethnic Medicinal Plant Resources/  
Key Laboratory of Hunan Higher Education for Hunan-western Medicinal Plant and Ethnobotany/  
Department of Life Sciences, Huaihua University, Huaihua Hunan 418008)

**Abstract:** To provide new marker for the identification of the chromosome of the *Allium fistulosum* L. and establish of molecular cytogenetic karyotype of the *A. fistulosum* L., this study prepared good dispersed metaphase chromosomes of *A. fistulosum* L. by removing the walls and flame drying, and carried out CPD (PI and DAPI combination) staining and 45S rDNA fluorescence in situ hybridization (FISH). Then karyotype analysis of *A. fistulosum* L. was finished according to chromosome morphology of *A. fistulosum* L., combined with the results of CPD staining and FISH. The result of CPD staining indicated that all ends of the chromosome hands of the *A. fistulosum* L. were CPD bands. The result of FISH showed that there was a pair of situs of 45S rDNA (on the 5<sup>th</sup> pair of chromosome), and the formula of *A. fistulosum* L. was  $2n=2x=16=2sm+12m+2st(SAT)$ , the karyotype types was 2A. The results showed that the use of CPD staining and 45S rDNA FISH not only provided new marker for the identification of chromosomes, but also contributed to understanding of the distribution of chromosomal GC rich region, providing molecular evidence for the research on the identification, classification and evolution of *Allium* species.

**Key words:** *Allium fistulosum* L.; chromosome; CPD Staining; FISH (fluorescence in situ hybridization); karyotype

## 0 引言

葱 (*Allium fistulosum* L.) 属于百合科 (Liliaceae)

葱族 (Allieae) 葱属 (*Allium*), 是一种重要的经济作物, 中国各地均有栽培。葱作蔬菜食用, 鳞茎和种子亦入药<sup>[1]</sup>。

**基金项目:**湖南省科技厅重大专项“侗族药用植物资源及其利用研究”(2009FJ2008)。

**第一作者简介:**刘良科,男,1963年出生,湖南会同人,教授,本科,主要从事植物分子细胞遗传学研究。通信地址:418008 怀化学院生命科学系, E-mail: liuliangke209@163.com。

**收稿日期:**2010-09-20, **修回日期:**2010-12-07。

葱的香味浓郁,辣味柔和,含有较高的碳水化合物、蛋白质、维生素等营养物质,具有增进食欲、防止心脏病的作用<sup>[2]</sup>。国内外对葱的研究主要在其成分与药用方面,如Sang S等<sup>[3]</sup>研究了葱的抗真菌成分,Lai W等<sup>[4]</sup>研究了葱的有效成分的抗脑缺血功能。在葱的细胞遗传学研究方面,利容千和陈瑞阳对葱(*A. fistulosum* L.)的核型进行过分析<sup>[5-6]</sup>,Peffley E B等<sup>[7]</sup>对葱的G带进行了研究。但是,单凭染色体的长度、着丝粒的位置和随体的有无等形态学特征难以准确识别全部的染色体,尽管G带技术的应用使葱的一些染色体得以准确识别,但由于其染色体经显带程序处理后产生的带纹数有限,葱的染色体仍难全部被准确识别,而染色体的准确识别和精确的核型分析是植物基因组研究的基础。本研究选用45S rDNA作为荧光原位杂交(FISH)探针,此序列在植物基因组中广泛分布且非常保守,不仅能为染色体识别提供有效标记,还能研究许多物种的染色体的形态结构特征、物种进化及亲缘关系。并且,本研究将CPD带(代表染色体GC丰富区)、45S rDNA序列FISH信号(代表45S rDNA序列物理位置)、染色体形态特征(染色体大小、臂比等)结合起来,对葱的染色体进行识别,以建立更加精确而详细的核型;同时,这些染色体的CPD染色和FISH结果,还能对葱属植物的属下分类问题的解决提供新的方法和新的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用实验材料是北京亚太农业有限公司生产的四季小香葱,四季小香葱属葱的变种分葱。

### 1.2 方法

1.2.1 材料的采集 取适量四季小香葱种子,室温中浸种4~8 h,在培养皿里铺上大小合适的二层滤纸,用水浸湿。将浸泡过的种子均匀地铺在滤纸上,贴上标签,于25℃~28℃的HPG-280H人工气候箱中培养,培养中需换2~3次水,以洗掉其产生的代谢废物。待主根长至1~2 cm,取其根放入装有水的干净的青霉素瓶(贴上标签,注明名称与时间)中,水洗1~2次。将水吸干加入1%秋水仙素溶液,预处理4 h。预处理后水洗3次,吸干水分,再加入新配制的卡诺氏固定液固定4 h以上,冰箱(4℃)中保存备用。

1.2.2 酶解 取固定好的根尖,先用双蒸水水洗3×5 min,再用柠檬酸缓冲液洗2×5 min,用保安刀片切取根尖0.5 mm,于青霉素瓶中27~28℃下酶解3.5~4 h。

1.2.3 制片与选片 吸出酶液,切掉200 μL移液枪枪尖的一小部分,用移液枪小心吸取根尖置于载玻片中央,

滴1滴固定液在玻片上,用镊子反复小心地敲打根尖至糊状,如在敲打时固定液干了,应再滴加少量固定液(每次半滴),最后再围着糊状物快速滴一圈固定液,随后迅速用镊子将中央的糊状物敲打涂开,使材料分散开来,在酒精灯火焰上烤片,以通过火焰5~8次、固定液着火、火熄灭后载玻片上形成成串小液珠为宜。火焰干燥后,肉眼观察应为干净的小雨点状,若小雨点上像有一层不透明的薄层,说明酶解时间不够。制好的染色体装片经空气干燥后放入切片盒内。制好的染色体装片在olympus BX51相差显微镜下镜检,选取分裂相较多、染色体形态较好、背景干净的装片置-20℃贮存备用。

1.2.4 制片的CPD染色和荧光原位杂交 参照余朝文<sup>[8]</sup>的方法进行。

1.2.5 核型分析 参照李懋学和陈瑞阳<sup>[9-10]</sup>的标准进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 CPD染色结果

CPD染色后,葱的8对染色体的短臂末端和长臂末端都显示了清晰的红色CPD带纹(图1A)。根据CPD带的位置结合常规染色体测量可以更好地给染色体配对和区分各染色体。

### 2.2 荧光原位杂交结果

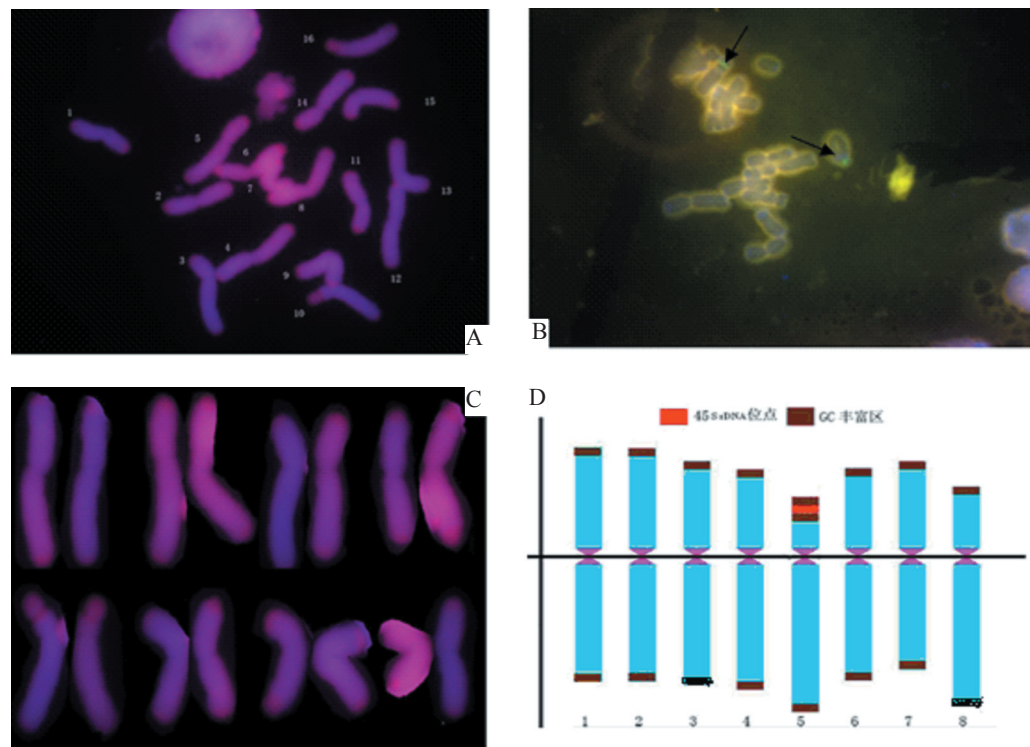
对CPD染色的分裂相进行了45S rDNA荧光原位杂交。在葱第5对染色体短臂近末端处出现了强的45S rDNA信号(用dig-16-dUTP标记的45S rDNA显示绿色信号),即葱具有一对45S rDNA位点,且位于第5对染色体的短臂近末端处(图1B)。

### 2.3 核型分析

基于CPD带、45S rDNA FISH信号,结合常规的染色体测量,可对葱的染色体进行较准确的区分,在此基础上建立了体现葱的染色体基本形态特征、CPD带和45S rDNA位点的分子细胞遗传学核型。葱的核型公式为 $2n=2x=16=2sm+12m+2st(SAT)$ ,染色体的相对长度组成公式为 $2n=16=6M2+10M1$ ,最长的染色体的相对长度为14.07,最短的染色体相对长度为6.72;其中第5对染色体为近端部着丝粒染色体,第8对染色体为近中部着丝粒染色体,其他的6对染色体都为中部着丝粒染色体,从相对系数可以得出,第1、2、3对染色体为中长染色体,第4、5、6、7、8对染色体为中短染色体。核型2A型。核型分析参数见表1。

## 3 结论与讨论

(1)CPD染色是PI(碘化丙啶 Propidium iodide)和DAPI(4,6-二氨基-2-苯基吲哚,4,6-diamidino-2-phenylindole)组合荧光染色,本研究采用的CPD染色程序对



A:葱的CPD染色;B:葱的FISH;C:葱的核型图;D:葱的核型模式图

图1 葱的CPD染色、FISH和核型分析

表1 葱的染色体参数

染色体序号	相对长度/(长臂+短臂=全长)	臂比(臂/短臂)	类型
1	7.37+6.28=13.55	1.15	m
2	7.24+6.19=13.43	1.17	m
3	7.40+5.40=12.80	1.37	m
4	7.74+4.83=12.57	1.60	m
5	10.03+2.38=12.42	4.21*	st
6	7.19+4.94=12.13	1.46	m
7	6.52+5.32=11.84	1.22	m
8	7.81+3.45=11.26	2.27	sm

注:随体长度未计入短臂内。

植物基因组的GC丰富区具有专一性<sup>[11]</sup>。本实验结果表明,葱的染色体的末端都属于GC丰富区,同时葱的45S rDNA位点也属于GC丰富区。一般来说,染色体的45S rDNA位点都含有丰富的GC,但植物染色体的末端含有丰富的GC的情况因物种而异。余朝文对分属6个科的16种植物的染色体进行了分析,节节麦、大蒜、籼稻、药用野生稻、豌豆、黑麦、谷子、高粱、蚕豆和玉米等10个供试物种的CPD染色只专一地显示了NOR区(核仁组织区 nucleolar organizing region, NOR,是45S rDNA位点的活性部分),而大麦、洋葱、四棱豆、拟南芥、甘蓝和番茄等6个物种,除NOR区

外,还显示了其他CPD带;在同时属于葱属植物的大蒜和洋葱2个物种中,大蒜只在NOR区显示了CPD带,洋葱则还在4对染色体的短臂末端和1对染色体的长臂末端显示了CPD带<sup>[8]</sup>。而在本实验中,葱除了NOR区显示了CPD带外,葱的所有染色体的短臂和长臂的末端均显示了CPD带,因此,CPD染色不仅能了解不同物种间的分子差异(GC丰富区的数量和位置),还能识别同源染色体提供新的标记。事实上,很多文献也已经证明,相对于大多数其他的DNA区而言,45S rDNA序列都是GC丰富的<sup>[12]</sup>,洋葱的大多数染色体末端含有GC丰富的375 bp卫星序列<sup>[13]</sup>。而葱的

染色体末端的GC丰富区的具体序列还未见报道,有待于进一步研究。

(2)FISH是利用标记的DNA探针在染色体、间期核和DNA纤维上直接定位特定DNA序列的一种有效而精确的分子细胞遗传学方法<sup>[14]</sup>。本实验利用45S rDNA探针直接确定葱的45S rDNA位点的数量和位置。结果显示,葱的染色体组中有一对45S rDNA位点。而大蒜则有2对45S rDNA位点,洋葱则有5个45S rDNA位点<sup>[8]</sup>。可见,在葱属植物中,45S rDNA位点数量有种的差异性,这可为种的鉴别和分类提供参考。

(3)葱属植物是广义百合科、葱族的重要类群,其种类丰富,分布极广。但目前,葱属植物亚属与组的划分以及组间与种间的亲缘关系尚存在不少分歧。由于缺乏明显的总体形态学共有衍征,因而亚属与组的划分具有很大的人为性。许介眉教授在《中国植物志》<sup>[1]</sup>中将国产的110种葱属植物直接分为9组:宽叶组、洋葱组、葱组、粗根组、根茎组、单生组、长齿组、多籽组、合被组。Hanelt<sup>[15]</sup>主要根据形态和解剖学性状将世界葱属的700余种植物划分为6亚属,30组,13亚组。周颂东等<sup>[16]</sup>根据对国产葱属植物 *trnK* 基因片段的RFLP结果,认为可将中国葱属的138种划分成6亚属级的新分类等级;在部分亚属级下再分组。许多学者的属下分类群的区别特征都以一些细微的形态学差异组合而成,有时这些特征在腊叶标本上几乎无法观察到或难以确认,因此该属的分类学问题一直是一个难题。因此要建立葱属植物的更为准确的系统发育树,还需要对葱属的形态、细胞和分子等方面作进一步的综合研究,更需要对葱属植物的分子细胞遗传学进行深入研究。从已做的关于葱属植物的分子细胞遗传学研究表明,葱属植物的染色体的CPD染色和45S rDNA FISH具有种的差异性,因此,随着这方面工作的积累,可以为葱属植物的属下系统的建立提供新的依据。

该研究表明,利用CPD染色和45S rDNA FISH,不仅能在葱属植物的核型分析中为染色体的识别提供新的标记,还能了解葱属植物的分子特性(GC丰富区和45S rDNA位点的数量与位置),为葱属植物的物种鉴定、系统分类与进化等方面的研究提供DNA分子方面的证据。

## 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第十四卷)[M].北京:科学出版社,1980,256-257.
- [2] 中国科学院植物研究所.中国高等植物图鉴(第二册)[M].北京:科学出版社,2002,513-515.
- [3] Sang S, Lao A, Wang Y, et al. Antifungal constituents from the seeds of *Allium fistulosum* L. [J]. *J Agric Food Chem*, 2002 Oct 23;50(22): 6318-21.
- [4] Lai W, Wu Z, Lin H, et al. Anti-ischemia steroidal saponins from the seeds of *Allium fistulosum*. [J]. *J Nat Prod*, 2010 Jun 25;73(6): 1053-7.
- [5] 利容千.中国蔬菜植物核型研究[M].武汉:武汉大学出版社,1989, 186-189.
- [6] 陈瑞阳.中国主要经济植物基因组染色体图谱(第二册)[M].北京:科学出版社,2003,531-532.
- [7] Peffley E B, de Vries J N. Giemsa G-banding in *Allium* [J]. 1993 Mar;68(2):83-6.
- [8] 余朝文.几种植物与模式植物基因组的分子细胞遗传学比较分析[D].武汉:武汉大学,2005.
- [9] 李懋学,张敦方.植物染色体研究技术[M].哈尔滨:东北林业大学出版社,1991.112-113.
- [10] 李懋学,陈瑞阳.关于植物核型分析的标准化问题[J].武汉植物学研究,1985,3(4):297-302.
- [11] She C W, Liu J Y, Song Y C. CPD staining: an effective technique for detection of NORs and other GC-rich chromosomal regions in plants [J]. *Biotechnic & Histochemistry*. 2006,81(1):13-21.
- [12] She C W, Liu J Y, Song Y C. CPD banding patterns and identification of 45s rDNA sites in tomato [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005,32 (10):1101-1107.
- [13] Pich U, Fuchs J, Schubert I. How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences? [J]. *Chromosome Res*, 1996,4:207-213.
- [14] 余朝文,宋运淳.植物荧光原位杂交技术的发展及其在植物基因组分析中的应用[J].武汉植物学研究.2006,24(4):365-376.
- [15] Havey M J. Restriction enzyme analysis of the chloroplast and nuclear 45S ribosomal DNA of *Allium* Sections *Cepa* and *Phyllodolon* (Alliaceae) [J]. *Pl Syst Evol*, 1992,183:17-31.
- [16] 周颂东,何兴金,葛颂.基于 *trnK* 基因的葱属植物分子系统研究[J].西北植物学报,2006,26(5):906-914.