

莪术 CPD 染色和 45S rDNA 荧光原位杂交核型分析

赵丽娟,唐菲菲,刘良科

(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)

摘要:为了对莪术 [*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe] 的染色体进行识别并对该物种基因组的结构及进化进行初步研究,利用改进的火焰干燥法及荧光原位杂交技术,对莪术中期染色体的长度,着丝粒的位置及随体的数目进行分析。PI 和 DAPI 组合 (CPD) 染色后和相继的 45S rDNA 探针荧光原位杂交结果显示,莪术具有五对 45S rDNA 位点,三对位于 8, 22, 31 号染色体末端的 CPD 带区,二对位于 4, 30 号染色体的短臂上。第五号短臂为富含 GC 对的非 45S rDNA 位点。该实验建立了莪术的经典核型,为非整倍体,核型公式为 $2n = 62+1=40m+12sm+1m$, 其核型不对称性为 2A 型。

关键词:莪术;核型;rDNA;CPD 染色;荧光原位杂交

中图分类号:Q37

文献标志码:A

论文编号:2010-3088

Karyotype Analysis of *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe by Using CPD Staining and FISH with 45S rDNA

Zhao Lijuan, Tang Feifei, Liu Liangke

(Key Laboratory of Research and Utilization of Ethnomedicinal Plant Resources of Hunan Province

Key Laboratory of Xiangxi Plant and Ethnobotany of Hunan Higher Education

Department of Life Sciences, Huaihua University 418000)

Abstract: The aim of the study was to identify the chromosomes of *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe, and know something initially of the genome structure and evolution. In this study, mitotic metaphase chromosomes of *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe were well prepared by using an advanced chromosome preparation method. A classic karyotype of *Pennisetum* was constructed according to chromosome length, centromere position, and the occurrence of NOR. By fluorescent analysis and CPD staining we found that there were five pairs of 45S rDNA signals located on different chromosomes, three pairs signals are on the NORs of the chromosomes 8, 22 and 31, the other two pairs are on the shorts arms of the chromosomes of 4 and 30, corresponding the location of CPD staining bands; the last sites of CPD staining was on the short arm of the chromosome 5. The result of this study was that *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe was aneuploid, and the karyotype was $2n = 62+1=40m+12sm+1m$, belonging to 2A.

Key words: *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe; karyotype; rDNA; CPD staining; fluorescence in situ hybridization

0 引言

姜科 (Zingiberaceae) 单子叶植物纲姜目的 1 科。多年生草本,通常有芳香。具匍匐或块状的根状茎,或有时根的末端膨大呈块状。染色体基数 $x=8\sim 12, 14,$

17, 21, 25。约 52 属 1200 种,分布于热带、亚热带地区,以亚洲热带地区的种类最为繁多,常生于林下阴湿处;中国约有 21 属近 200 种^[1-2],分布于东南部至西南部各省区,以广东、广西和云南的种类最多。莪术

基金项目:湖南省教育厅一般项目“姜属植物的分子细胞遗传学研究”(07C503)。

第一作者简介:赵丽娟,女,1979 年出生,硕士,研究方向为遗传学,通信地址:418000 湖南省怀化学院生命科学系, Tel: 0745-2851037, E-mail: fishheather@hotmail.com。

收稿日期:2010-11-01, **修回日期:**2011-01-07。

[*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe], 姜黄属, 姜科 (Zingiberaceae), 100 种以上, 分布于热带亚洲, 中国莪术 *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe 产西南部至东南部。成晓静等^[3]研究了 3 种莪术不同部位挥发油成分比较; 王健等^[4]广西莪术两个新品种进行了鉴定; 吴顺俭等^[5]对莪术的药用价值进行了阐述; 曹利娟等^[6]莪术油的研究进展进行了介绍。

目前, 国内关于姜科植物染色体和核型分析的相关文献很少, 多是关于化学成分和临床应用的报道。莪术研究的报道极少, 多是从形态解剖和物种繁殖方面及其成分和药用价值对莪术进行研究, 核型分析目前还未见报道, 因此分子细胞遗传学研究的前景非常大。

本实验采用改良的 CPD 染色程序^[7], 对莪术的染色体进行荧光显带分析, 剖析其基因组的结构特征, 并为染色体的识别提供新的标记。采用双色荧光原位杂交技术对莪术中期染色体进行 45S rDNA 物理定位, 对其进行分子细胞遗传学鉴别。

1 材料与方法

供试材料来自云南的姜科莪术, 种植于怀化学院生物园温室。

45S rDNA 探针来自番茄基因组 (perry and palukaitis 1990), 由美国 Nebraska 大学 Arumuganathan 教授提供。45S rDNA 片段长度为 9.1 kb, 包括 5.8S, 18S 和 25S 亚单位和非转录的间隔区 (IGS), 克隆载体为 pUC18, 酶切位点为 Kpn I。

莪术生长喜阴, 将其置于沙土中于温室中培养, 待根长到 1~1.5 cm 的时候取根尖, 先将根尖放置于装有双蒸水的青霉素瓶里, 待根尖取完后, 将双蒸水吸出放入预处理液 α -溴代萘。盖上瓶盖, 贴上标签, 于室温下处理约 1.5 h。之后将预处理液吸出, 用双蒸水漂洗根尖 10 min, 吸出双蒸水, 加入固定液, 放置于 4℃ 的冰箱内固定过夜。火焰干燥法制片, 再经前处理, CPD 染色并观察和图像的拍摄, 然后再将该片清洗, 与地高辛标记好的 45S rDNA 共变性, 杂交。再在荧光显微镜下观察, 通过 matmorph 软件获取图片信息。

2 结果与分析

用 Adobe Photoshop 软件对拍摄的染色体照片进行分析, 核型分析按李懋学、陈瑞阳^[8-9]的方法进行。

相对长度以百分比表示, 计算方法以 Levan (1964) 的公式为准, 即: 相对长度 = (染色体长度/染色体组总长度) × 100。

臂比 = 长臂/短臂, 根据臂比确定染色体的着丝粒位置类型 (表 1)。

表 1 臂比值与着丝粒位置分类

| 臂比值 | 着丝粒位置 | 简写 |
|-----------|------------------------------|----|
| 1.00 | 正中部着丝粒 (median point) | M |
| 1.01~1.70 | 中部着丝粒区 (median region) | m |
| 1.71~3.00 | 近中部着丝粒区 (submedian region) | sm |
| 3.01~7.00 | 近端部着丝粒区 (subterminal region) | st |
| 7.01 以上 | 端部着丝粒区 (terminal region) | t |
| ∞ | 端部着丝粒区 (terminal point) | T |

核型分类: 根据 Stebbins (1971) 提出的方法为标准, 以染色体长度比和臂比两项确定, 用以区分核型的对称和不对称程度 (表 2)。

表 2 长度比值和臂比值与核型分类

| 最长/最短 | 臂比大于 2:1 的染色体的百分比 | | | |
|-------------|-------------------|----------|-----------|-----|
| | 0.0 | 0.01~0.5 | 0.51~0.99 | 1.0 |
| <2:1 | 1A | 2A | 3A | 4A |
| (2:1)~(4:1) | 1B | 2B | 3B | 4B |
| >4:1 | 1C | 2C | 3C | 4C |

2.1 核型建立

观察了五个分裂相, 在软件中测量染色体的长度, 臂比等, 取其平均值得到表 3 的数据, 根据表 3 中的数据, 可对莪术的染色体进行准确的区分, 配对得出图 1, 莪术的染色体数目为 $2n=62+1$, 其中 1~11、14~15、17~19、21~24、26~27、29~31 号均为中部着丝粒染色体, 12、13、16、20、26、28 号为近中部着丝粒, 第 32 号染色体属于中部着丝粒染色体。从表 3 中可知莪术的核型公式为 $2n=62+1=40 m+12 sm+1 m$ 。32 号染色体只有一条 (图 1), 因此判断, 此物种为非整倍体。最长染色体相对长度为 4.01, 最短染色体相对长度为 2.49, 最长和最短染色体的比值是 1.61, 臂比大于 2 的染色体的比例 (% of Chromosome of Arm Ratio > 2) 为 0.06, 核型不对称性属 2A 型。

表 3 莪术的核型分析参数表

| 编号 | 相对长度/% | 臂比(L/S) | 类型 | 编号 | 相对长度/% | 臂比(L/S) | 类型 |
|----|----------------|---------|----|----|----------------|---------|----|
| 1 | 1.57+2.45=4.01 | 1.56 | m | 17 | 1.42+1.81=3.23 | 1.28 | m |
| 2 | 1.69+2.15=3.84 | 1.27 | m | 18 | 1.59+1.61=3.20 | 1.02 | m |

续表3

| 编号 | 相对长度/% | 臂比(L/S) | 类型 | 编号 | 相对长度/% | 臂比(L/S) | 类型 |
|----|----------------|---------|----|----|----------------|---------|----|
| 3 | 1.66+2.16=3.82 | 1.30 | m | 19 | 1.41+1.73=3.14 | 1.22 | m |
| 4 | 1.66+2.01=3.67 | 1.22 | m | 20 | 1.21+1.89=3.10 | 2.56 | sm |
| 5 | 1.69+1.94=3.64 | 1.15 | m | 21 | 0.87+2.23=3.10 | 1.56 | m |
| 6 | 1.55+2.03=3.57 | 1.31 | m | 22 | 1.42+1.61=3.03 | 1.13 | m |
| 7 | 1.52+1.92=3.44 | 1.27 | m | 23 | 1.21+1.82=3.03 | 1.51 | m |
| 8 | 1.41+2.00=3.41 | 1.41 | m | 24 | 1.38+1.64=3.01 | 1.19 | m |
| 9 | 1.62+1.76=3.39 | 1.10 | m | 25 | 1.05+1.96=2.89 | 1.87 | sm |
| 10 | 1.61+1.77=3.38 | 1.10 | m | 26 | 1.21+1.63=2.84 | 1.35 | m |
| 11 | 1.55+1.82=3.37 | 1.12 | m | 27 | 1.14+1.63=2.77 | 1.42 | m |
| 12 | 1.23+2.13=3.36 | 1.73 | sm | 28 | 0.95+1.77=2.72 | 1.87 | sm |
| 13 | 1.12+2.23=3.35 | 1.99 | sm | 29 | 1.19+1.52=2.71 | 1.28 | m |
| 14 | 1.43+1.89=3.32 | 1.32 | m | 30 | 1.25+1.44=2.69 | 1.15 | m |
| 15 | 1.52+1.73=3.25 | 1.14 | m | 31 | 1.23+1.26=2.49 | 1.28 | m |
| 16 | 0.96+2.28=3.24 | 2.39 | sm | 32 | 1.27+1.68=2.95 | 1.32 | m |

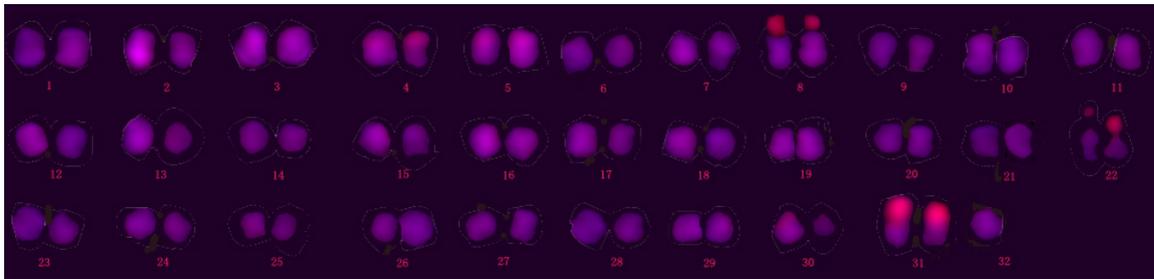


图1 莪术核型图

2.2 CPD 染色

CPD 染色后(图2), 显示出6对显著的CPD带(图中显示深红色部分)。根据图1的配对及染色体排列情况, 这些显著的CPD带, 分别位于第4, 5, 30号染色体的短臂末端和第8, 22, 31号染色体的随体上。

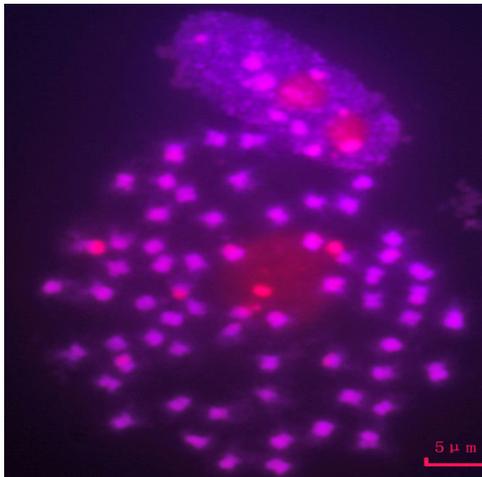
2.3 FISH 杂交

相继的45S rDNA FISH 结果如图3显示, 45S

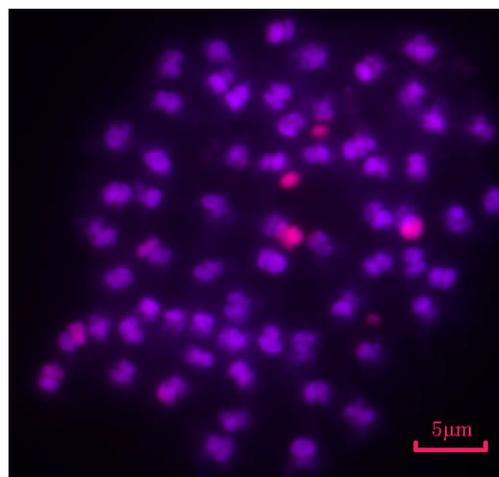
rDNA 信号有5对, 分别位于4, 30号染色体的短臂末端和第8, 22, 31号染色体的随体上, 对应于相应染色体上的显著的CPD带区。第5号为富含GC对的非45S rDNA位点。

综合表3的统计结果及CPD和45S rDNA的杂交结果, 得出了莪术的核型模式图(图4)。

A



B



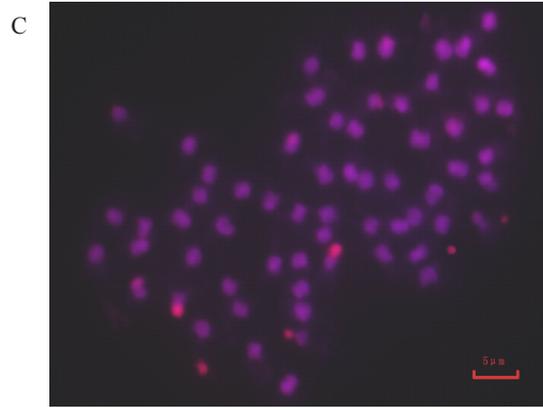


图2 莪术 CPD 染色图

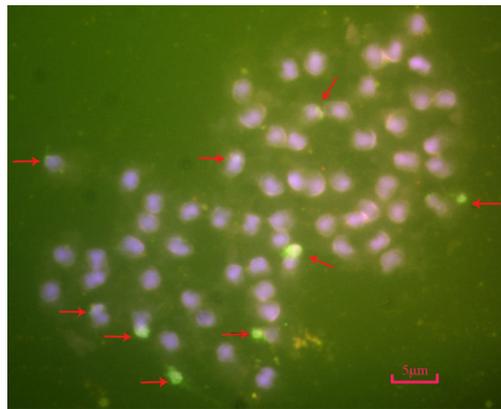


图3 莪术 45S rDNA 信号杂交图

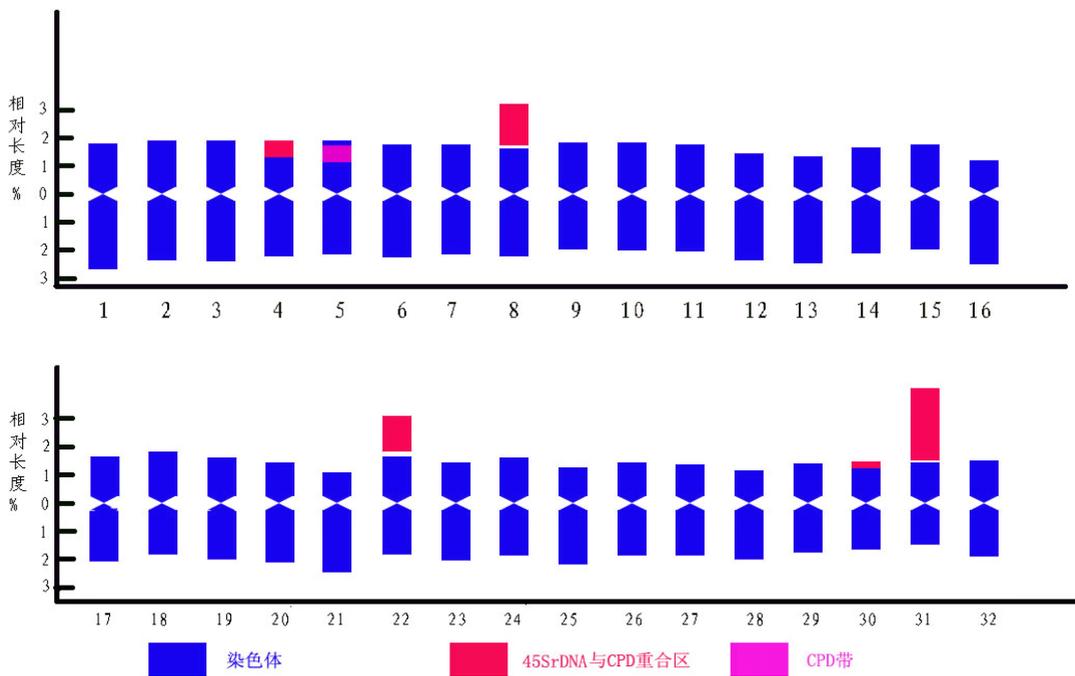


图4 莪术核型模式图

3 结论与讨论

本研究采用 CPD 染色法对莪术的染色体进行染色。。 CPD 染色能够精确的显示植物基因组的 GC 丰

富的 45S rDNA 位点,也能够对基因组的其他 GC 丰富的染色体区进行有效的定位^[10-13]。结果表明,大部分的 45S rDNA 的杂交位点都出现在相应染色体位置的

CPD 红色带纹区,说明 CPD 染色能有效地对 45S rDNA 进行物理定位。较 FISH 而言,CPD 染色程序简单,可以极大的节省实验经费,在植物染色体的初步识别和分析有广泛的应用价值。

选取的材料来自于温室沙土培养,不易收集根尖。经过初步实验研究,发现姜科植物的杂质较多,染色质不易凝缩,较难获得分裂相理想的装片,同时发现莪术染色体短小,着丝粒不明显,核仁明显。因此 CPD 染色结合 FISH 的结果能够为染色体识别提供依据,其中 8、22、31 这三对随体显示出丰富的 GC 分布,且在相应位置上出现 45S rDNA 的信号,但着丝粒部位没观察到 GC 丰富的分布 32 号染色体只有一条,找不到与它配对的染色体,根据 CPD 染色和 FISH 杂交结果,观察了上百个分裂相,可初步推测该物种为非整倍体。可能是因为其祖先种丢失一染色体形成,与《染色体图谱》(陈瑞阳所编),稍有差别,不排除新种出现的可能;另外莪术与姜黄在外形上有明显区别,但在《染色体图谱》中莪术、姜黄甚至姜黄属的另外一个种-温郁金都用同一个种名,由此可知现今姜黄属植物的命名比较混乱,只有从染色体和外形上综合分析才能得到确切结果。

根据文献可知姜科植物的染色体组成复杂,染色体基数从 $X=11-21$ 不等,其中占姜科植物 50% 以上的属和 90% 的种仍未做细胞学的研究通过观察和分析^[1-2],本实验建立的莪术核型,是通过选取了 5 个分裂相通过求平均值得到了相对长度,采用了 CPD 显带和 FISH 杂交技术,使得染色体配对更加准确,保证了核型分析结果的准确性。首次建立莪术的核型。

姜科的染色体计数及核型分析方面还有大量的工作有待完成,该实验结果为进一步研究莪术和其他姜黄属乃至整个姜科植物的基因组提供了初步的分子细胞遗传学依据,也将为姜科植物的系统研究提供更大的帮助。

参考文献

- [1] 孔继君,刘刚.姜科植物研究进展[J].西北植物学报,2005,25(8):1692-1699.
- [2] 谢建光等.姜科植物的引种[J].热带亚热带植物学报,2000,8(4):282-290.
- [3] 成晓静,刘华刚,廖月葵等.3种莪术不同部位挥发油成分比较[J].中药材,2009,32(10):1551-1553.
- [4] 王健,陆善旦,赵应学.广西莪术两个新品种的特征特性简介[J].中药材,2009,32(8):1191-1192.
- [5] 吴顺俭.姜黄、片姜黄、莪术、郁金的药用解感[J].北京中医,1999,1:35-36.
- [6] 曹利娟,刘华钢,刘丽敏,等.莪术油近五年的研究进展[J].中医中药,2010,16(3):447-450.
- [7] 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. *Biotechnic & Histochemistry*, 2006,81(1):13-21.
- [8] 李懋学,陈瑞阳.关于植物核型分析的标准化问题[J].武汉植物研究,1985,3(4):297-302.
- [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.
- [10] 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.
- [11] She C W, Liu J Y. CPD Banding Patterns and Identification of 45SrDNA Sites in Tomato[J].遗传学报,2005,32(10):1101-1107.
- [12] Liu J Y, She C W, Hu Z L, et al. A new chromosome fluorescence binding technique combining DAPI staining with analysis in plants [J]. *Chromosome*,2004,113(1):16-21.
- [13] She C W, Liu J Y, Xiong Z Y, et al. Karyotype analysis of *Psophocarpus tetragonolobus*(L.) DC by chromosome banding and fluorescence in situ hybridization[J]. *Caryologia*,2004,57(4):387-394.