

蓝猪耳 45S rDNA 荧光原位杂交作图及其核型分析

陆 续, 罗锐敏, 高 峰*

(华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631)

摘 要: 以番茄 45S rDNA 为探针, 结合核型分析和荧光原位杂交 (FISH) 技术, 对蓝猪耳染色体的核型以及 45S rDNA 在染色体上的定位进行了研究。结果表明, 蓝猪耳染色体的核型为 1A 型, 核型不对称系数为 57.46, 染色体相对长度变异范围为 4.455% ~ 6.990%, 最长染色体与最短染色体的比值为 1.57, 染色体相对长度组成为 $2L + 4M_2 + 12M_1$, 核型公式为 $2n = 2x = 18 = 14m + 4sm$ (2SAT)。在蓝猪耳体细胞有丝分裂中期染色体和间期核中, 均发现 45S rDNA 有 2 个杂交信号, 且信号在有丝分裂中期位于第 5 对染色体短臂近着丝粒处。基于上述结果绘制了蓝猪耳染色体的核型图。

关键词: 蓝猪耳; 染色体; 荧光原位杂交; 45S rDNA; 核型

中图分类号: S 681 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 07-1081-04

45S rDNA-FISH Mapping and Karyotype Analysis of *Torenia fournieri* L.

LU Xu, LUO Rui-min, and GAO Feng*

(Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Karyotype analysis and 45S rDNA-florescence *in situ* hybridization (FISH) mapping of *Torenia fournieri* L. were performed by using *Lycopersicon esculentum* 45S rDNA as a probe. The *T. fournieri* karyotype was classified into the type 1A in the Stebbins' category. The asymmetry index was 57.46. Variation in chromosome relative length ranged from 4.455% to 6.990%. The ratio of the longest over the shortest length of chromosomes (L/S) was 1.57. Chromosome constitution of relative length was $2L + 4M_2 + 12M_1$. The karyotype formula can be represented as $2n = 2x = 18 = 14m + 4sm$ (2SAT). Two hybridized signals were found on the fifth pair of chromosome near the centromere at the metaphase and in the interphase nucleus of *T. fournieri*. An idiogram was obtained based on these findings.

Key words: *Torenia fournieri* L.; chromosome; florescence *in situ* hybridization; 45S rDNA; karyotype

蓝猪耳 (*Torenia fournieri* L.) 是玄参科蝴蝶草属植物, 作为一种优良草花, 是夏季重要的盆栽观赏花卉, 同时因其生活周期短, 胚珠裸露, 是研究被子植物受精机理、胚胎发育以及花卉分子生物学与转基因技术的理想试验材料。

由于蓝猪耳的染色体属于小染色体, 难以获得可进行核型分析的染色体制片标本。迄今, 只有 Kikuchi 等 (2006) 对蓝猪耳的核型进行了初步探讨, 并尝试以 45S rDNA 和 5S rDNA 为探针, 对蓝猪耳有丝分裂中期染色体进行了荧光原位杂交定位研究, 但未列出有关蓝猪耳染色体的分类、相对长度和长度比等基本数据以及核型公式。

作者通过改进蓝猪耳染色体制片方法, 并采用来自番茄的 45S rDNA 为探针的荧光原位杂交技术, 对蓝猪耳的染色体核型以及 45S rDNA 在蓝猪耳染色体上的信号位点数和位置进行研究, 旨在为

收稿日期: 2008-04-03; 修回日期: 2008-06-12

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: peak0041@vip.sina.com)

致谢: 本研究中 FISH 试验在武汉大学生命科学院分子细胞遗传学实验室完成, 承蒙李立家教授的大力帮助, 特此表示感谢。

其细胞遗传学研究提供基础数据和稳定有效的染色体识别标记。

1 材料与方法

蓝猪耳种子为美国泛美种子子公司生产, 购于广州三力园艺公司。

采用去壁低渗—火焰干燥法制备体细胞染色体标本, 镜检, -20°C 保存备用。

含有 45S rDNA 序列的质粒由武汉大学李立家教授实验室保存并惠赠。45S rDNA 序列来源于番茄, 片段长度为 9.1 kb。碱裂解法提取含有 45S rDNA 序列的质粒 DNA, 采用罗氏切口平移试剂盒以地高辛-dUTP (Digoxin-dUTP, Roche) 标记探针。

染色体原位杂交及杂交信号的检测参照 Li 和 Arumuganathan (2001) 的方法略做修改。

选择 30 个染色体分散较好的有丝分裂中期细胞进行染色体计数, 核型分析时取其中 5 个细胞的平均值。

染色体分类按 Levan 等 (1964) 的命名法, 核型分析按李懋学和陈瑞阳 (1985) 的方法, 按照 Stebbins 标准进行核型分类。核型不对称系数计算公式为: 长臂总长/全组染色体总长 $\times 100$ (Arano, 1963), 染色体相对长度系数的计算按 Guo 等 (1972) 的方法。

染色体玻片凭证标本保存于华南师范大学生命科学学院植物遗传学实验室。

2 结果与分析

2.1 核型分析

观察发现, 蓝猪耳体细胞染色体由 7 对中部着丝点染色体 (第 1、2、3、4、6、7、8) 和 2 对近中部着丝点染色体 (第 5 和 9) 组成 (图 1; 图 2, A ~ C)。

根据试验中的观察结果 (表 1), 确定蓝猪耳的核型为 $2n = 2x = 18 = 14m + 4sm$ (2SAT), 属于 “1A” 类型。

染色体相对长度变异范围为 4.455% ~ 6.990%, 最长染色体与最短染色体的比值为 1.57; 核型不对称系数为 57.46, 染色体相对长度组成为 $2L + 4M_2 + 12M_1$ 。

表 1 蓝猪耳的核型分析

Table 1 Karyotype analysis of *T. fournieri* L.

染色体序号 Pair No.	相对长度/% Relative length (S + L = T)	相对长度系数 I. R. L	臂比 (长臂/短臂) Arm ratio (Long/Short)	类型 Type
1	2.879 + 4.111 = 6.990	1.258	1.428	m
2	3.165 + 3.435 = 6.600	1.188	1.085	m
3	2.845 + 3.259 = 6.104	1.099	1.146	m
4	2.189 + 3.374 = 5.563	1.001	1.608	m
5*	1.906 + 3.428 = 5.334	0.960	1.799	sm
6	2.428 + 2.805 = 5.233	0.942	1.155	m
7	2.088 + 2.866 = 4.954	0.892	1.373	m
8	2.219 + 2.549 = 4.768	0.858	1.149	m
9	1.552 + 2.903 = 4.455	0.802	1.870	sm

* 随体长度计算在内。

* The length of satellites is included in the chromosome length.

2.2 染色体上 45S rDNA 的定位

用 Dig-dUTP 标记的 45S rDNA 探针与蓝猪耳染色体制片杂交, 分别对 50 个有丝分裂中期分裂相和间期的细胞核进行检测, 结果 (图 2) 显示, 在有丝分裂间期和 90% 中期染色体中具有 2 个 45S rDNA 杂交信号, 杂交位点在第 5 对染色体短臂近着丝粒处。

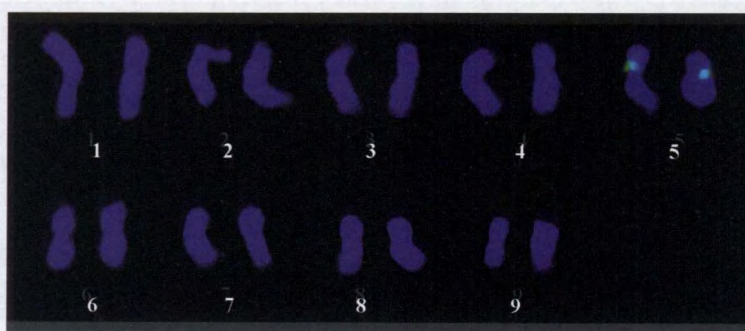


图1 蓝猪耳的染色体核型图

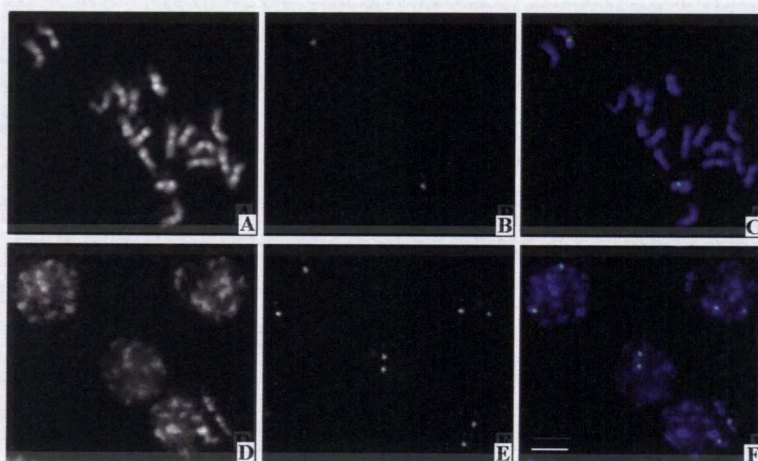
Fig. 1 The karyotype of *T. fournieri* L.

图2 45S rDNA(绿色)在蓝猪耳体细胞有丝分裂中期染色体和间期核上的定位

A. 有丝分裂中期染色体; B. 中期 45S rDNA 杂交信号; C. 中期 45S rDNA (绿色) 与 DAPI 复染的染色体 (蓝色) 的合成图; D. 有丝分裂间期核; E. 间期核 45S rDNA 杂交信号; F. 间期核 45S rDNA (绿色) 与 DAPI 复染的染色体 (蓝色) 合成图。标尺为 5 μm 。

Fig. 2 FISH localization of 45S rDNA on metaphase chromosomes and in interphase nucleus of somatic cells in *T. fournieri* L.

A. Metaphase chromosomes of *T. fournieri* L.; B. 45S rDNA FISH signals of the metaphase chromosomes; C. A merged image of the metaphase chromosomes and the FISH signals. D. The interphase nucleus of *T. fournieri* L.; E. 45S rDNA FISH signals of the interphase nucleus; F. A merged image of the interphase nucleus and the FISH signals. Bar = 5 μm .

2.3 蓝猪耳染色体核型模式图

根据蓝猪耳染色体的核型分析以及 45S rDNA 位点在其中期和间期染色体上的定位观测结果, 绘制出蓝猪耳染色体的核型模式图。

核型模式图见图 3。

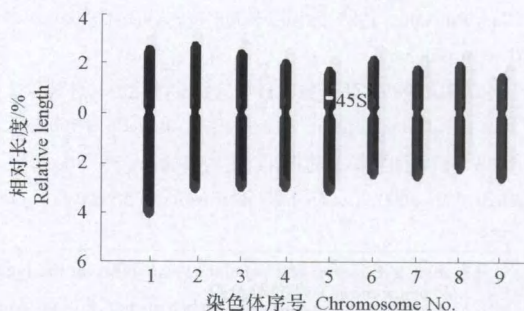


图3 蓝猪耳染色体的核型模式图

Fig. 3 The idiogram of *T. fournieri* L.

3 讨论

在本文的染色体核型图中,第5对染色体的其中一个同源染色体的长臂有一定的折叠,在核型分析时难于确定其长臂的长度。通过45S rDNA在染色体上的定位,可清晰的观察到在其短臂上有一个45S rDNA杂交信号,因此判断其与另一短臂上有一个45S rDNA杂交信号的染色体为同源染色体,长臂长度按其同源染色体的长度来计算。

Kikuchi等(2006)将蓝猪耳带有45S rDNA位点的染色体单独命名为染色体A,而将其余染色体按照长度分别命名为B、D、E、F、G、H和I。本文的研究证实了蓝猪耳染色体组成为 $2n=2x=18$ 的结论,并且按照植物染色体核型分析标准(李懋学和陈瑞阳,1985)对染色体进行了统一排序和编号,确定了蓝猪耳染色体的核型公式和带有45S rDNA标记的FISH核型图。这不仅有利于蓝猪耳染色体分析的规范化和标准化,而且进一步丰富了蓝猪耳染色体分析的基础资料。45S rDNA参与核仁组织区(NOR)的构成,且核仁组织区通常被认为是随体染色体的次缢痕(Martins & Galetti, 2000)。前人的研究表明,蓝猪耳染色体A是一个具有随体的染色体(sat-chromosome),45S rDNA位于该染色体短臂的近着丝点处(Kikuchi et al., 2006)。本文结合上述研究结果,推测蓝猪耳第5对染色体上的45S rDNA杂交位点为该随体染色体的次缢痕。

一般认为,端部和近端部着丝粒染色体是由中部或近中部着丝粒染色体演化来的(李雅轩, 2001)。本试验结果表明,蓝猪耳的染色体组成只有中部着丝粒和近中部着丝粒的染色体,因此应属于本科中较原始的类群。此外,蓝猪耳核型具有较高的对称性,为“1A”型,核型不对称系数为57.46。Stebbins(1957)认为,高等植物核型进化的基本趋势是由对称向不对称方向发展。因此,笔者认为,在玄参科植物的系统进化中,具有对称核型的蝴蝶草属植物蓝猪耳应该处于相对原始的地位。这与蓝猪耳在玄参科系统分类表中位置相对靠前的结论(李光照,1994)相一致。

References

- Arano H. 1963. Cytological studies in subfamily Carduoideae (Compositae) of Japan. Botany Magazine (Tokyo), 76: 32–39.
- Guo X R, Wang T T, Huang T C. 1972. Karyotype analysis of some formosan gymnosperm. Taiwan, 17: 66–80.
- Kikuchi S, Tanaka H, Shiba T, Mii M, Tsujimoto H. 2006. Genome size, karyotype, meiosis and a novel extra chromosome in *Torenia fournieri*, *T. baillonii* and their hybrid. Chromosome Research, 14: 665–672.
- Levan A, Fredga K, Sandberg A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52: 201–220.
- Li Guang-zhao. 1994. Notes on some taxa and characteristics of geographical distribution of *Scrophulariaceae* from Guangxi. Guihaia, 14: 133–143. (in Chinese)
- 李光照. 1994. 广西玄参科简志及其地理分布特点. 广西植物, 14: 133–143.
- Li Li-jia, Arumuganathan K. 2001. Physical mapping of sorted chromosomes 45S and 5S rDNA on maize metaphase and sorted chromosomes by FISH. Hereditas, 134: 141–145.
- Li Mao-xue, Chen Rui-yang. 1985. A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants. Journal of Wuhan Botanical Research, 3: 297–302. (in Chinese)
- 李懋学, 陈瑞阳. 1985. 关于植物核型分析标准化的一些建议. 武汉植物研究, 3: 297–302.
- Li Ya-xuan. 2001. Evolution of plant cell karyotype. Bulletin of Biology, 36: 16–17. (in Chinese)
- 李雅轩. 2001. 植物细胞核型的进化. 生物学通报, 36: 16–17.
- Martins C, Galetti P M. 2000. Conservative distribution of 5S rDNA loci in schizodon (*Pisces anostomidae*) chromosomes. Chromosome Research, 8: 353–355.
- Stebbins G L. 1957. Self fertilization and population variability in the higher plants. American Naturalist, 91: 337–354.
- Stebbins G L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Aronld (London), 85–104.