

五节芒基因组大小测定

邓果特, 刘清波, 蒋建雄, 陈智勇, 艾 辛, 肖 亮, 易自力

(湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128)

摘要: 五节芒 (*Miscanthus floridulus*) 属于禾本科 (Poaceae) 芒属 (*Miscanthus* Andersson), 被认为是一种开发潜力巨大的生物质能源植物。本研究以水稻日本晴 (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) 为内标, 采用流式细胞仪测定 6 份来自中国不同地区的五节芒基因组大小。结果首次确定了五节芒的基因组大小平均为 2596.59 Mb, 即 2 C DNA 含量为 5.31 pg (以 1 pg = 978 Mb 计算)。

关键词: 流式细胞仪; 基因组大小; 五节芒; 水稻

Estimation of Genome Size of *Miscanthus floridulus*

DENG Guo-te, LIU Qing-bo, JIANG Jian-xiong, CHEN Zhi-yong, AI Xin, XIAO Liang, YI Zi-li

(College of Bioscience & Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

Abstract: *Miscanthus floridulus* is a species of the *Miscanthus* Andersson genus, which has received worldwide attention as the most potential bioenergy plant. In this study, the genome size of *M. floridulus* from various regions of China was determined by flow cytometry using rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) as an internal standard. The average genome size of *M. floridulus* was about 2596.59 Mb, namely 2 C DNA = 5.31 pg (1 pg = 978 Mb).

Key words: flow cytometry; genome size; *Miscanthus floridulus*; *Oryza sativa*

基因组大小 (又称 C 值), 是指一个物种单倍体核的 DNA 含量, 其单位可以是质量 (pg), 或是碱基对的数目 (Mb), 其换算关系为 1 pg = 978 Mb 或 1 Mb = 1.022×10^{-3} pg。基因组反映了生物物种全部和特定的遗传信息^[1]。测定基因组大小可以估测物种的 DNA 含量, 不仅对该物种的分子遗传与细胞遗传等研究具有重要意义, 而且也为植物的基因组学及其亲缘进化研究提供基础资料。目前测定基因组大小的方法通常有 2 种, 即 Feulgen 分光光度法和流式细胞术^[2-3]。流式细胞术由于具有高效、准确等优点, 因此目前比较频繁地用于基因组大小的测定研究。

五节芒 (*Miscanthus floridulus*) 属于禾本科 (Poaceae) 芒属 (*Miscanthus* Andersson)^[4], 是一种高光效的 C₄ 植物, 具有生物质产量高、抗逆性强、纤维素含量高、燃烧充分等特点, 被认为是一种开发潜力

巨大的生物质能源植物, 在我国主要分布在热带和亚热带地区^[5]。在五节芒的染色体数目与核型研究方面, S. Adati 等^[6-7]曾报道了日本产的五节芒染色体数目为 $2n = 2x = 38$ 。陈少风等^[8]对我国五节芒的核型也进行了分析, 发现其染色体数目同样为 $2n = 38, x = 19$, 核型为 2B 类型。相比之下, 有关五节芒基因组大小的研究尚未见报道。本试验以水稻日本晴 (*Oryza sativa* L. Var. Nipponbare) 为内标, 用流式细胞仪对来自全国不同地区五节芒种质资源的基因组大小进行了测定分析, 旨在为今后开展五节芒及芒属植物的基因组测序、基因组文库建立以及基因组学的研究等工作提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

用于细胞流式分析的五节芒 (*M. floridulus*) 分

收稿日期: 2012-04-04 修回日期: 2012-07-08 网络出版日期: 2013-01-30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130130.1618.014.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30971832); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2011AA10020903)

作者简介: 邓果特, 硕士。研究方向: 细胞遗传学。E-mail: guote128@yahoo.cn

通信作者: 易自力, 教授。研究方向: 芒属植物种质资源开发与利用。E-mail: yizili889@163.com

别采自湖南、湖北、江西、福建等地,均为二倍体($2n = 2x = 38$),保存于湖南农业大学芒属植物种质资源圃内。作为内标的水稻品种日本晴由中国国家杂交水稻工程技术研究中心谭炎宁提供。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞核悬液制备 选取五节芒嫩叶 20 mg,在滴有 1 mL Galbraith's buffer(含 45 mmol/L $MgCl_2$, 30 mmol/L 柠檬酸钠, 20 mmol/L 3-(N-吗啡啉)丙磺酸(pH7.0), 0.1% Triton X-100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNaseA)的培养皿中,用锋利的刀片迅速将其切碎,用 400 目的尼龙网过滤除去悬浮物,150 g 离心 5 min,弃去上清液,沉淀再加入 500 μL Galbraith's buffer,振荡混匀后获得细胞核悬液,置于冰上备用。采用同样方法获得水稻幼嫩叶片的细胞悬液,置于冰上备用。

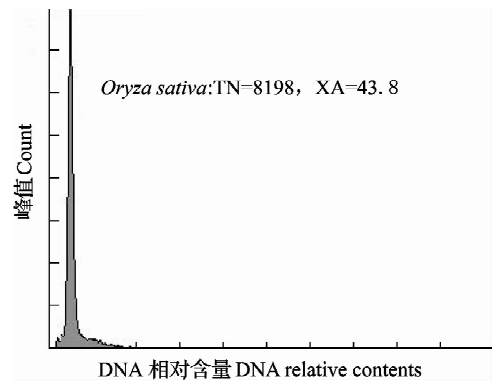
1.2.2 DNA 特异性染色 将五节芒细胞核悬液和水稻细胞核悬液混匀,获得混合细胞悬液。向制备好的细胞核悬液中滴加碘化丙啶溶液(PI, propidium iodide)至终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,置于冰上,避光染色 20 ~ 30 min。

1.2.3 基因组大小的测定与计算 基因组的大小采用 Epics XL 流式细胞仪(Beckman Coulter Company)进行测定。采用 488 nm 的蓝光激发,收集 FL3 通道的荧光,检测 PI 的发射荧光强度。每个待测样本至少收集 1 万个细胞。每个样本重复测定 3 次。测定所得的图像和数据由流式细胞仪自带软件(EXPO32 ADC analysis)进行处理分析。

2 结果与分析

PI 是一种荧光染料,能够嵌入双链 DNA 的碱基对中,在着色过程中的嵌入量与 DNA 含量成正比,因而可以用荧光强度表示 DNA 的相对含量。由五节芒和水稻基因组单独检测的结果可知,水稻基因组大小测定峰(图 1)与五节芒基因组大小测定峰(图 2)无重叠,表明在本试验中,混合样品区分度良好,保证了用已知基因组大小的水稻品种日本晴作为内标计算五节芒基因组大小结果的准确性。

对五节芒与水稻混合样品的 PI 发射荧光强度的测定结果分析表明,水稻 2C DNA 含量峰峰值平均为 42.5,五节芒 2C DNA 含量峰峰值平均为 253.3(图 3)。本研究利用流式细胞仪对五节芒细胞 DNA 含量进行测定,共获得 6 组数据(表 1)。水稻日本晴 2C DNA 含量为 $0.900 \pm 0.020 \text{ pg}^{[9]}$,比较水稻与五节芒样品峰峰值的倍数关系,可计算出五节



TN: 流式细胞仪检测细胞总数;
XA: DNA 含量在 X-轴上的均值,下同
TN: Total number of effective cells in the analysis,
XA: Average C-value on the X-axis. The same as below

图 1 水稻样品(日本晴)的细胞流式检测结果
Fig. 1 The C-value measurement of rice sample (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare)

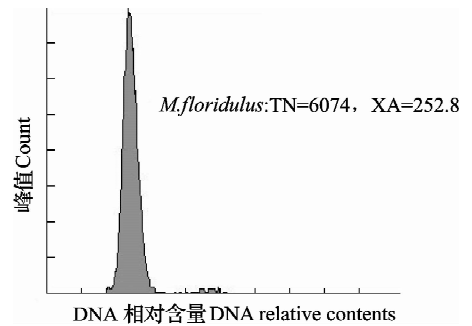


图 2 五节芒样品的细胞流式检测结果

Fig. 2 The C-value measurement of *M. floridulus* sample

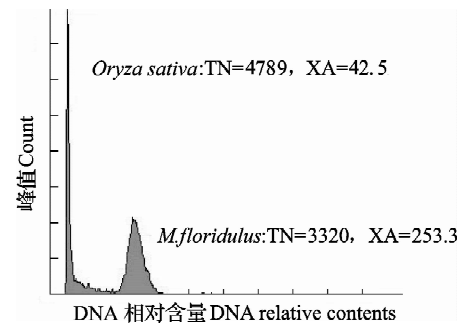


图 3 水稻与五节芒混合样品流式细胞仪检测结果

Fig. 3 The C-value measurement of the mixed samples of *M. floridulus* and rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare)

芒的基因组大小(2C DNA 含量)平均为 $5.310 \pm 0.140 \text{ pg}$,变异系数为 2.7%。对采自全国不同地区五节芒的 2C DNA 含量采用 SPSS 18.0 数据分析软件进行方差分析,结果表明(表 1),按 $\alpha = 0.05$ 的水平, $P < 0.05$,来源于不同地区的五节芒 2C DNA 含量之间存在显著差异。

表 1 五节芒 2C DNA 含量测定结果

Table 1 Result of the 2C values for the *M. floridulus*

编号 Code	采集地 Collection areas	2C DNA 含量 (pg) 2C Nuclear DNA content (means ± sd)	最小显著差异 LSD grouping	平均值 Average value (means ± sd)	变异系数 (%) CV
1	湖南郴州	5.450 ± 0.007	a		
2	湖北红安	5.440 ± 0.040	a		
3	江西修水	5.420 ± 0.050	a	5.310 ± 0.140	2.7
4	广东连山	5.210 ± 0.070	b		
5	江苏连云港	5.160 ± 0.040	b		
6	福建永安	5.150 ± 0.010	b		

LSD: 最小显著差异; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); CV: 2C DNA 含量变异系数

LSD: Least significant difference. The different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). CV: Coefficient of variation of 2C Nuclear DNA content

3 讨论

本研究首次测定了五节芒的基因组大小, 为其基因组学研究提供基础数据。在选定内标时, 早期流式细胞仪进行基因组大小测定中, 通常采用鸡血红细胞作为内标。但研究表明, 植物和鸡的细胞核水解速率不一样, 在进行植物基因组大小测定时, 应该采用植物作为内标^[10], 因此本试验中采用与五节芒同属禾本科, 且基因组大小已知的水稻品种日本晴为内标。试验结果也表明五节芒与水稻的测定峰无重叠, 区分度良好, 充分保证了用已知基因组大小的水稻品种作为内标来测定五节芒基因组大小结果的准确性。在采用流式细胞仪进行分析时, 样品前期处理是影响分析结果重要因素之一, 本研究对取材、机械破碎、细胞核悬液制备、染色时间等前期处理过程中的条件进行了摸索。选取新鲜幼嫩叶片, 不经过低温贮藏等环节, 取材后立即制样, 保证样品的鲜活性, 可获得较好的峰形图。机械破碎采用刀片切割法处理样品, 也是目前流式细胞仪用于检测植物细胞最为普遍的方法。但本研究发现不同强度的机械破碎可影响细胞核的提取效果, 机械破碎程度不够充分, 则细胞核较少, 峰形图不明显; 若适当增加机械破碎强度和ación, 则可获得较好的峰形图。本研究通过对各试验环节的摸索和优化, 确定用 Galbraith's buffer 细胞核提取液, 离心转速为 150 g, 离心 5 min, 染色时间 30 min 为最佳条件。

A. L. Rayburn 等^[11]曾采用高粱 (*Sorghum*) 基因组为内标, 使用流式细胞仪检测了芒和荻的基因组大小。测定结果表明, 芒 2C DNA 含量为 5.5 pg, 荻 2C DNA 含量为 4.5 pg。本研究以水稻日本晴为内标测得五节芒 2C DNA 含量为 5.310 ± 0.140 pg。五节芒、芒、荻同为芒属物种, 但五节芒与芒的亲缘关系更近, 而与荻的亲缘关系较远, 因此五节芒与芒

的基因组大小较为接近, 与荻的基因组大小差异较明显。

从方差分析结果可看出, 部分采自不同地区五节芒的基因组大小之间存在显著差异, DNA 含量变异系数为 2.7%。M. D. Bennett 等^[12]罗列出 24 种被子植物种内 DNA 含量变化在 4% ~ 28% 之间, 并得出种内 DNA 含量变化很普遍这一结论。本研究结果表明五节芒存在种内 DNA 含量变异, 造成种内 DNA 含量变异的原因有多种, 例如染色体的多倍化、非整倍体、B 染色体等以及染色质变异、基因重复与丢失等都可能对 DNA 含量的种内变异起到一定作用^[13]。B. Charlesworth 等^[14]在果蝇中的研究表明, 转座子和微卫星 DNA 会影响基因组大小, 导致基因组大小种内变异。T. Eilam 等^[15]报道在小麦族群中, 异花授粉植株种内 DNA 含量变异率要高于自花授粉植株。芒和五节芒均为较严格的自交不亲和植物, 有性生殖以异花授粉为主, 因此异花授粉可能对五节芒种内 DNA 含量变异起到一定作用。在特定条件下, 基因组 DNA 含量会被某种特定的选择力所影响, 对于植物而言, 纬度、海拔、气候以及地区差异都可能造成 DNA 含量的变异^[16-17]。具体是哪一方面原因造成五节芒种内 DNA 含量变异, 还需进一步研究其周围环境因素、染色体组成、全基因组序列以及结构功能等。

参考文献

- [1] Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, et al. Nuclear DNA content and genome size of trout and human [J]. Cytom Part A, 2003, 51 (2): 127-128
- [2] Du B, Wang D. C-values of seven marine mammal species determined by flow cytometry [J]. Zool Sci, 2006, 23: 1017-1020
- [3] Kikuchi S, Tanaka H, Shiba T, et al. Genome size, karyotype, meiosis and a novel extra chromosome in *Torenia fournieri*, *T. baillonii* and their hybrid [J]. Chromosome Res, 2006, 14: 665-672