

文章编号: 100121498(2009)0520691205

# 龟甲竹染色体 C2分带、荧光原位杂交及其核型分析

徐川梅, 郑华威, 王 骢, 汤定钦\*

(浙江省现代森林培育技术重点实验室, 浙江林学院, 浙江 临安 311300)

**摘要:** 利用 Giemsa C2分带和荧光原位杂交的方法对龟甲竹根尖细胞有丝分裂中期染色体进行了研究。结果表明: 龟甲竹的核型公式为  $2n=48=26m+14sm+4st(2SAT)+4t$  核型分类属  $\dot{0}$  B型; 带型公式为  $2n=48=4CI+2CI_T+2CT_+10CT^++4I+2I^++6T^++6C+8T+2II+2L_T$ , 每条染色体都显示出了可以明显区别的特征带, 带纹强弱差异明显。以 45S rDNA 为探针对龟甲竹根尖染色体进行了荧光原位杂交, 杂交位点定位于 1 对染色体上。将染色体 C2带带型和 45S rDNA FISH 带型相结合可以将龟甲竹的每条染色体区分开。

**关键词:** 龟甲竹; 染色体; C2分带; 荧光原位杂交

**中图分类号:** S763.42 **文献标识码:** A

## Giemsa C2banding FISH and Karyotype Analysis of *Phyllostachys pubescens* var. *heterocyclus* Chromosome

XU Chuanmei, ZHENG Hua wei, WANG Cong, TANG Ding qin

(Key Lab for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry University, Lin An 311300, Zhejiang China)

**Abstract** Giemsa C2banding and FISH analysis of the *Ph. pubescens* var. *heterocyclus* chromosomes from root tips were carried out in this research. The results showed that the C2banding karyotype would be  $2n=48=4CI+2CI_T+2CT_+10CT^++4I+2I^++6T^++6C+8T+2II+2L_T$ . The specific C2banding points on each chromosome could be distinguished and the differences of C2banding intensity also could be recognized. 45S rDNA was used as probe for FISH analysis, and one couple of hybridization signals was displayed on the chromosome centromere. In this research we have a conclusion that chromosomes of *Ph. pubescens* var. *heterocyclus* can be easily distinguished and identified by Giemsa C2banding and FISH approaches.

**Key words** *Phyllostachys pubescens* var. *heterocyclus*; chromosome; C2banding; fluorescent in situ hybridization (FISH)

竹子是重要的森林资源, 根据竹鞭的延伸性质可分为散生竹、丛生竹和混生竹三大类。中国是一个竹子种质资源丰富的国家, 共有竹类 40 余属 500 余种, 变种变型 100 种。龟甲竹 (*Phyllostachys pubescens* var. *heterocyclus* (Carr.) Mazel ex H. de Lehaie) 属于散生竹刚竹属 (*Phyllostachys* Sieb et Zucc.) 竹

种, 是毛竹的一个变种, 与毛竹区别在于从基部开始, 下部竹秆的竹节歪斜, 相互粘连交错, 节间斜面突出, 交互连接呈龟甲状。龟甲竹是重要的观赏竹种, 由于其稀少又珍奇, 为观赏竹中的珍品。

染色体是细胞核内遗传物质的载体, 在不同的物种间其特性和数目相对稳定。对不同物种的染

收稿日期: 2008212203

基金项目: 国家自然科学基金 (30771753) 和浙江林学院启动基金 (2351000838) 及浙江林学院森林培育重中之重学科开放基金 (20016) 项目

作者简介: 徐川梅 (1979), 女, 硕士, 实验师, 从事植物细胞生物学研究。

\* 通讯作者: 汤定钦, 博士, 教授. E-mail: tang@zjfc.edu.cn

染色体进行研究,可以更好地了解物种间的遗传信息并解释众多的遗传现象。竹类植物染色体的研究始于 20 世纪 30 年代<sup>[1-2]</sup>,国内从 90 年代才开始大规模对散生竹、丛生竹的染色体数目开展较为系统的研究<sup>[3-4]</sup>。陈瑞阳等<sup>[5]</sup>对多种竹种进行了染色体核型分析,研究表明:竹类植物染色体多为中小染色体,染色体数目比较多,且有些竹种的染色体形态不规则,因此,这在一定程度上增加了竹类植物同源染色体配对分析的难度。染色质分为异染色质和常染色质 2 种, Giemsa C 分带可以显示异染色质在染色体上的分布区域,由于不同物种及同一物种的不同染色体个体,其异染色质在染色体上的分布区域并不相同,因此,可以根据带纹在染色体上的位置,正确地辨别出各条染色体,提高核型分析的准确性。本研究采用 C 分带,结合荧光原位杂交技术 (FISH),对龟甲竹染色体进行了核型分析,旨在为龟甲竹的染色体工程研究奠定细胞遗传学基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本研究所用的龟甲竹采集于浙江林学院翠竹园,采用当年生竹笋下面的新根根尖作为压片材料。

### 1.2 根尖细胞有丝分裂中期染色体制片

将采集的龟甲竹根尖在 0℃ 冰水中预处理 22~24 h 后,用卡诺氏固定液 (95% 乙醇:冰乙酸 = 3B:1) 固定, 2~7 d 后在 45% 乙酸中压片,在 Olympus BX51 生物显微镜下观察。取有中期分裂相的制片, -70℃ 冷冻揭片,冷冻揭片经 100% 酒精脱水,气干备用。

### 1.3 染色体 Giemsa C 分带

染色体 C 分带程序参照 Gill 等<sup>[6-7]</sup>的方法。C 分带带型分析参照李懋学等<sup>[8]</sup>的方法,即根据 C 带分布的位置,分为 5 种类型,即着丝点带、中间带、末端带、次缢痕带和随体带,并分别记做 C、I、T、N 和 S。若带位于长臂上则在字母的右侧下标为 / + 0,若在短臂上有带,则在右侧上标为 / + 0,若长短臂上都有带,则不需要注明。

### 1.4 染色体荧光原位杂交及检测

1.4.1 染色体制片预处理 为了清除背景噪音,原位杂交前需利用 RNA 酶 Ñ 和胃蛋白酶对染色体制片进行预处理,具体处理程序参照刘光欣等<sup>[9]</sup>的方法。

1.4.2 探针标记 45S rDNA 探针由南京农业大学王秀娥教授提供。通过缺口平移法用 Digoxigenin 112dUTP (德国 Boehringer Mannheim 公司) 标记。

1.4.3 荧光原位杂交及检测 参照陈佩度<sup>[10]</sup>和 Jiang 等<sup>[11]</sup>程序。用经地高辛标记的 45S rDNA 作探针,杂交信号经抗地高辛抗体 2 号丹明 (Anti-digoxigenin 2rhodamine Fab fragments 11207750910) 检测, 45S rDNA 杂交信号呈现红色。在 Olympus BX60 荧光显微镜下观察、照相。

### 1.5 核型分析

采用 Motic Images Advanced 3.2 高级图像处理软件测量龟甲竹染色体的相对长度。核型分析参照 Levan 等<sup>[12]</sup>、李懋学等<sup>[8]</sup>的方法,核型分类及核型不对称系数分别参照 Stebbins<sup>[13]</sup>的核型分类标准和 Arano<sup>[14]</sup>公式。

## 2 结果与分析

### 2.1 龟甲竹染色体 C 分带及核型分析

由图 1 可看出:龟甲竹每条染色体上都显示出明显的特征带,且强带和弱带区分明显。根据龟甲竹各染色体的 C 分带主要特征,带型公式可描述为:

$$2n=48=4CI+2CI.T+2CT.+10CT.+4I+2I.+6I.+6C+8T+2II+2I.T.$$

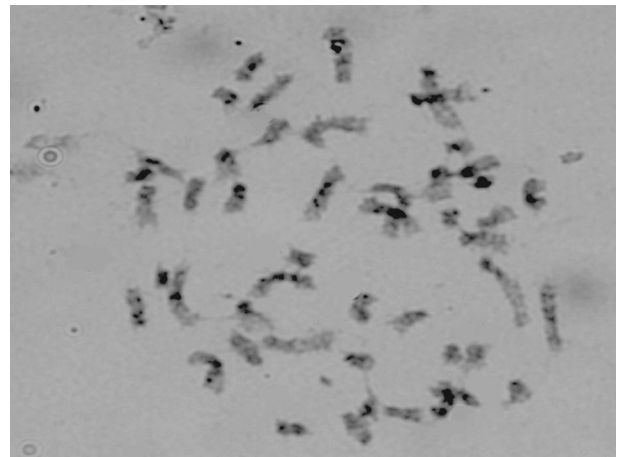


图 1 龟甲竹的染色体 Giemsa C 分带结果

根据龟甲竹的 C 分带结果,采用 Adobe PhotoShop 7.0 图像处理软件对龟甲竹染色体进行剪贴、排列和同源染色体的配对,根据 Motic Images Advanced 3.2 高级图像处理软件所测得的龟甲竹染色体的相对长度,计算出染色体的相对长度系数和臂比,并将龟甲竹 24 对染色体按照着丝点位置类

型, 结合相对长度系数进行分组 (A 组着丝点位置类型为 *m*, 相对长度系数 > 1.4; B 组着丝点位置类型为 *sm*; C 组着丝点位置类型为 *t*; D 组着丝点位置类型为 *m*, 相对长度系数 < 1.4), 将每组染色体由长到短的顺序分别排列并依次定名为 1~24。其染色体 C2 带型分析如图 2, 图 3 是其对应的核型模式图。根据 Levan 等<sup>[12]</sup> 的命名法则, 对龟甲竹各对同源染色体的类型进行确定 (表 1)。龟甲竹的核型公式为

$$2n = 48 = 26m + 14sm + 4st(2SAT) + 4t$$

染色体相对长度变化范围为 2.068~7.160, 染色体臂比值的变化范围为 1.052~21.725, 其中属于 *m* 类型的染色体有 13 对, 其臂比值为 1.0~1.7, 属于 *sm* 类型的染色体有 7 对, 其臂比值为 1.7~3.0, 属于 *st* 类型的染色体有 2 对, 其臂比值为 3.0~7.0, 臂比值大于 7.01 的染色体有 2 对, 在染色体分类上属于 *t* 类型。最长染色体与最短染色体相对长度比为 3.46, 臂比 > 2 的染色体占 29%, 核型不对称系数为 0.615, 核型分类为 2B。染色体相对长度组成为:

$$13L + 6M_2 + 15M_1 + 14S.$$

表 1 龟甲竹染色体核型参数

序号	相对长度			相对长度系数 %	臂比 (长臂/短臂)	着丝点位置	
	短臂	长臂	总长				
A	1	3 228	3 605	6 833	1.640	1.117	<i>m</i>
	2	2 856	3 602	6 458	1.550	1.261	<i>m</i>
	3	2 760	3 232	5 992	1.438	1.171	<i>m</i>
	4	2 809	3 104	5 913	1.419	1.105	<i>m</i>
B	5	2 106	5 054	7 160	1.718	2.400	<i>sm</i>
	6	1 744	2 994	4 738	1.137	1.717	<i>sm</i>
	7	1 622	2 933	4 555	1.093	1.808	<i>sm</i>
	8	1 370	3 120	4 490	1.078	2.277	<i>sm</i>
	9	1 317	2 335	3 652	0.877	1.773	<i>sm</i>
	10	1 136	2 215	3 351	0.804	1.950	<i>sm</i>
	11	1 170	2 125	3 295	0.791	1.816	<i>sm</i>
C	12	0 232	2 770	3 002	0.721	11.940	<i>t</i>
	13	0 449	2 175	2 624	0.630	4.844	<i>st</i>
	14	0 532	2 067	2 599	0.624	3.885	<i>st</i>
	15	0 091	1 977	2 068	0.496	21.725	<i>t</i>
D	16	2 430	3 271	5 701	1.368	1.346	<i>m</i>
	17	2 160	2 699	4 859	1.166	1.250	<i>m</i>
	18	1 796	1 945	3 741	0.898	1.083	<i>m</i>
	19	1 745	1 985	3 730	0.895	1.138	<i>m</i>
	20	1 668	2 012	3 680	0.883	1.206	<i>m</i>
	21	1 499	1 708	3 207	0.770	1.139	<i>m</i>
	22	1 547	1 627	3 174	0.762	1.052	<i>m</i>
	23	1 123	1 627	2 750	0.660	1.449	<i>m</i>
	24	1 078	1 350	2 428	0.583	1.252	<i>m</i>

注: 1 随体长度未计算在内。相对长度为每条染色体长度占单倍体染色体总长度的百分值。

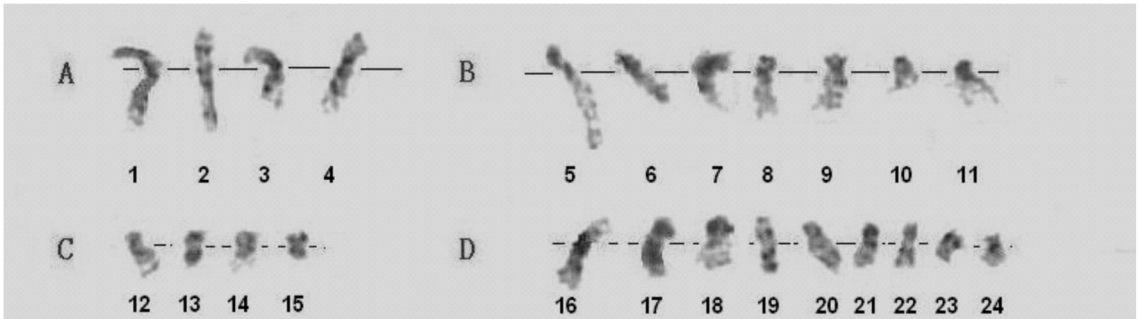


图 2 龟甲竹染色体 C2 带型图

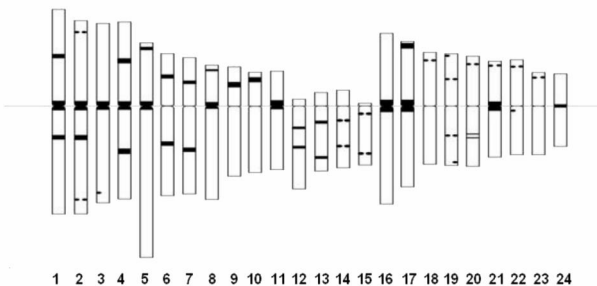


图 3 龟甲竹染色体 C2 分带模式图

组中一类高度重复并有转录活性的基因家族, 有 5S rDNA 和 45S rDNA 2 种类型, 45S rDNA 位点常常位于随体染色体的次缢痕区域, 因此, 可以作为随体染色体识别的一个染色体标记。竹类植物染色体多为中小染色体, 数目比较多, 因此, 在核型分析上存在一定的难度。为了提高核型分析的准确性, 进一步确定龟甲竹的随体染色体数目, 以 45S rDNA 为探针, 对龟甲竹染色体进行荧光原位杂交, 结果见图 4。杂交信号位于 1 对染色体近端部 (箭头所示), 进一步验证了龟甲竹只有 1 对随体染色体。

## 2.2 龟甲竹随体染色体数目的进一步确定

核糖体 RNA 基因 (rDNA 基因) 是真核生物基因

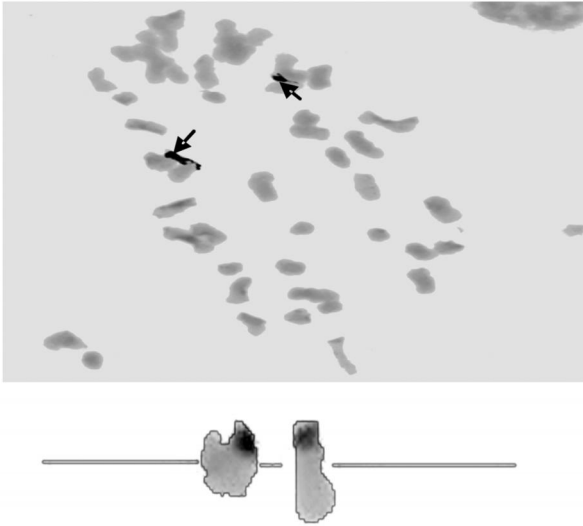


图 4 龟甲竹染色体荧光原位杂交结果,以标记的 45S rDNA 为探针,DAPI 套染,箭头所指黑色为杂交信号,灰色为染色体背景

### 3 结论与讨论

在生物进化过程中,常伴随着染色体的变化,包括染色体基数、染色体形态和染色体大小三方面的变化,因而,物种的核型也会随着生物进化而进化<sup>[15]</sup>。所以,通过对物种进行核型分析,在一定程度上可以了解物种间的进化关系。物种内特定染色体的识别有时可以借助于染色体的长度、臂比及随体的有无等来实现,但对于象竹类植物这样染色体数目比较多且形态较小的物种,仅依据染色体的长度和臂比特征进行核型分析,有时很难得到准确的结果。本实验结合 Gimsa C2 分带及荧光原位杂交技术对龟甲竹有丝分裂中期染色体进行了核型分析,结果表明,龟甲竹单套染色体显示出了 24 条带纹,强带和弱带差异明显,且每条染色体都显示出特征带。根据 C2 分带结果,对龟甲竹的同源染色体进行配对和核型分析,克服了传统核型分析中染色体区分难的缺点,进而准确而快捷地获得了龟甲竹的标准核型;同时,本研究的核型分析结果与陈瑞阳等<sup>[16]</sup>的核型分析结果相似,只是由于染色体测量长度上的略微差别,引起了部分不同,推测是由实验方法及测量方法等不同造成的。

Stebbins 等<sup>[13]</sup>根据染色体的形态和大小差异将核型分为对称核型和不对称核型 2 种类型,一般认为具对称核型的物种是比较原始的类型,而不对称的核型是比较进化的类型,是从对称核型衍生出来的。多年生龟甲竹的核型类型是不对称的 2B 型,其核型不对称系数为 0.615,在系统演化中属于较为

进化的类型。单从核型、不对称系数等参数看,与禾本科其他属的植物相比<sup>[16]</sup>,龟甲竹比小麦属 (*Triticum* L.)、大麦属 (*Hordeum* L.)、黍属 (*Panicum* L.) 进化,比燕麦属 (*Avena* L.) 原始,而与水稻属 (*Oryza* L.) 进化程度相似。樊龙江等<sup>[17]</sup>在探索竹类植物与水稻等其它禾本科作物的系统进化关系时,将竹类植物与水稻基因序列进行了比较和分析,其序列比对结果在一定程度上为本研究结果提供了旁证,这可为研究竹类植物的起源、进化以及育种提供细胞学上的参考。

核糖 RNA 基因 (rDNA) 是植物基因组中研究最广泛的遗传单元之一,其是一个串联重复序列,在真核生物中高度保守,成簇分布于一对或多对染色体上。45S rDNA 是核糖 RNA 基因的一员,主要位于染色体的次缢痕区域,由于其拷贝数很高,应用荧光原位杂交技术可以很方便的对其进行观察和定位。对于竹类植物这种小染色体物种来说,45S rDNA 是进行染色体组型分析非常好的细胞学标记。本研究首次利用荧光原位杂交的方法对龟甲竹根尖染色体进行了研究,45S rDNA FISH 的结果显示,在龟甲竹染色体上只检测到 1 对杂交信号,证明该方法所确定的随体染色体数目与其他方法所得到的数目是一致的<sup>[15]</sup>。

本课题组曾对多种散生竹和丛生竹种开展了染色体制片和 45S rDNA 荧光原位杂交研究<sup>[18]</sup>,结果发现,竹类植物染色体数目比较多且非常小,不同染色体个体在大小方面差异比较大,特别是丛生竹,其染色体比散生竹更小,不同的竹种间在染色体数目上存在着差异,因此有时很难对竹类植物的染色体进行有效的鉴定。本研究将 C2 分带和 FISH 分型结合,在一定程度上提高了竹类植物核型分析的准确性,同时为竹类植物系统演化、杂交育种后代鉴定、外源染色体追踪等提供了技术平台。

### 参考文献:

- [1] Hunter A W S. A karyo systematic investigation in the Gramineae [J]. Canadian Journal Research 1934 11(4): 213- 241
- [2] McClure F A. New genera and species of Bambusoideae from eastern [J]. Asia Lingnan Science Bulletin, 1940, 9: 66- 67
- [3] 李秀兰,刘松,宋文芹,等. 40 种散生竹的染色体数目 [J]. 植物分类学报, 1999, 37(6): 541- 544
- [4] 李秀兰,林汝顺,冯学琳,等. 中国部分丛生竹类染色体数目报道 [J]. 植物分类学报, 2001, 39(5): 433- 442
- [5] 陈瑞阳,宋文芹,李秀兰,等. 中国主要经济植物基因组染色体图谱(第四册:中国竹类染色体图谱) [M]. 北京: 科学出版

- 社, 2003
- [ 6 ] Gill B S. Giemsa banding technique for cereal chromosome [ J ]. Cereal Research Communication 1974, 2: 87- 94
- [ 7 ] Gill B S, Friebe B, Endo T R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum* L.) [ J ]. Genome 1991, 34: 830- 839
- [ 8 ] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准问题 [ J ]. 武汉植物学研究, 1985, 3(4): 297- 302
- [ 9 ] 刘光欣, 胡凤荣, 席梦利, 等. 岷江百合根尖染色体的 C2 分带和 FISH 分析 [ J ]. 分子植物育种, 2008, 6(1): 95- 99
- [ 10 ] 陈佩度. 用分子原位杂交 (GISH) 鉴定小麦簇毛麦双二倍体、附加系、代换系和易位系 [ J ]. 遗传学报, 1995b, 22(5): 380- 386
- [ 11 ] Jiang J M, Friebe B, Gill B S. Recent advances in alien gene transfer in wheat [ J ]. Euphytica 1993, 73: 199- 212
- [ 12 ] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosome [ J ]. Hereditas 1964, 52: 201- 220
- [ 13 ] Stebbins G L. Chromosomal evolution in higher plants [ M ]. London: Edward Arnold Ltd 1971: 87- 89
- [ 14 ] Arano H. Cytological studies in subfamily Carduoideae of Japan Ⅱ: The karyotype analysis and phylogenetic consideration on *Pertya* and *Ainslia* (2) [ J ]. BotMag Tokyo 1963, 76: 32- 39
- [ 15 ] 刘大钧. 细胞遗传学 [ M ]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 10- 11
- [ 16 ] 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰, 等. 中国主要经济植物基因组染色体图谱 (第二册: 中国农作物及其野生近源植物染色体图谱) [ M ]. 北京: 科学出版社, 2003
- [ 17 ] 樊龙江, 郭兴益, 马乃训. 竹类植物与水稻等其它禾本科作物的系统进化关系及基因序列组成的比较 [ J ]. 林业科学研究, 2006, 19(2): 165- 169
- [ 18 ] 徐川梅, 卢江杰, 汤定钦. 利用 FISH 技术研究 45S rDNA 在部分竹种染色体上的分布 [ J ]. 林业科学 (待发表)