

对几种百合科植物基因组大小的评价

杨 勇 陈克成

孙天恩

(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

(武汉大学分析测试中心 武汉 430072)

提 要 利用孚尔根显微分光光度法测定了洋葱 (*Allium cepa* L.)、蒜头 (*A. chinese* G. Don.)、分葱 (*A. ascalonium* L.) 和黄花 (*Hemerocallis citrina* Baroni) 4 种百合科植物根尖的细胞核 DNA 含量, 并根据各自的核型得出了每个物种的基因组大小。它们分别为: 洋葱 18.16×10^9 bp、蒜头 12.84×10^9 bp、分葱 10.44×10^9 bp 和黄花 7.48×10^9 bp。由此认为, 基因组是生物体维持其生存所需的全套基因。它反映了生物物种全部的、特定的遗传信息。与胞核 DNA 含量相比较, 基因组大小更适合作为生物研究的特征参数。这不仅对细胞学、分类学和遗传学, 而且对分子生物学亦有一定的意义。

关键词 孚尔根显微分光光度法, 核 DNA, 基因组大小

经典细胞学对某种生物的细胞核 DNA 含量和基因组大小研究只停留在定性说明上, 为了清楚地认识细胞核 DNA, 对其定量分析是很必要的。随着对生物细胞核型研究的深入和细胞学染色技术的发展, 不仅细胞, 甚至单个染色体已能清晰地显现。越来越多的物种染色体核型图见诸于报道, 染色体组或基因组的研究也更引人瞩目^[1~4]。这些均为核 DNA 定量分析提供了必要基础。近年来, 显微分光光度术和计算机在生物科学领域的应用, 为细胞核 DNA 从定性转到定量研究提供了可能。现在, 部分物种的细胞核 DNA 含量已被精确地测量, 而且单个染色体上 DNA 含量的测定已进行过尝试, 从而为基因组大小的评价提供了更直接的数据和更新的途径^{[5~7], [1]}。同一物种的基因组大小是相当稳定的, 是各个物种固有的特征参数。因此对基因组大小(即染色体组大小)的评价就可以为物种的系统进化、分类和遗传等研究提供客观的证据^[8~12]。

在本实验中, 利用孚尔根显微分光光度法测定了百合科 4 种植物的细胞核 DNA 含量, 并对它们的基因组大小作出了评价。

用显微分光光度术测定 Feulgen 染色的细胞核 DNA 含量时, 为了避免误差, 国际上采用鸡红血细胞核 DNA 含量作为一种内部标准^[13], 从而使求得的绝对值更为直观。由于洋葱根尖细胞制片技术的成熟, 它已作为另一种参考标准。本实验同时采用这两种标准使测量数值更具说服力。

收稿日: 1995-04-24, 修回日: 1995-10-17。第一作者: 男, 26 岁, 硕士。

1) 孙天恩、赵宇编。显微镜光度计与细胞分析。武汉大学分析测试科学系讲义, 1988。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 洋葱(*Allium cepa* L.), 市售。

(2) 蒜头(*Allium chinese* G. Don.)、分葱(*Allium ascalonium* L.)均取自武汉大学生命科学学院植物细胞实验室。

(3) 黄花(*Hemerocallis citrina* Baroni)取自武汉大学生命科学学院植物生理实验室。

(4) 鸡红血细胞, 取自武汉大学生命科学学院鸡场成年公鸡静脉血。

1.2 方法

1.2.1 植物制片方法

将上述4种材料洗净, 剪去原来生长的根, 在室温(20℃)下重新发根。待根尖长1 cm左右时, 取根尖。用卡诺固定液(无水乙醇: 冰醋酸=3: 1 V/V)室温下固定3 h, 再用双蒸水洗3次(3×10 min)。然后按1: 1(V/V)加入2%果胶酶和1%纤维素酶, 于30℃温箱中酶解1 h后用双蒸水洗3次(3×10 min)。酶解后的根尖放在60℃水浴中用1 mol/L HCl 酸解10 min, 取出, 水洗3次(3×10 min)。洗净的根尖用Schiff's 试剂染色1 h。染色后再用SO₂水和蒸馏水各洗3次。每次10 min。将已染色的根尖加1滴45%醋酸压片, 然后放入冰箱冷藏室冰冻。待结冰后揭片, 室温下晾干, 用中性树胶封片, 待测。

1.2.2 鸡红血细胞制片方法

取公鸡静脉血, 用肝素抗凝剂稀释, 涂片于1/2载玻片处, 用卡诺固定液(无水乙醇: 冰醋酸=3: 1 V/V)固定1 h, 再用95%乙醇洗2次, 每次10 min, 晾干后, 保存于4℃冰箱中备用。鸡红血细胞染色与封片方法与根尖相同。

1.2.3 细胞核DNA测量与计算

测量所用仪器为扫描显微镜光度计(Scanning microscope photometer, UNIVAR, Reichert-Jung, Austria)测量, 波长选定为650 nm, 用扫描法测量细胞核的光密度。每种材料测5张制片, 选择处于有丝分裂中、前期, 即4C核。每张制片测10个细胞核, DNA测量均由相应计算机软件控制操作。数据收集及处理亦由Commodore 计算机执行。求出平均值后, 再与鸡红血细胞核DNA含量比较, 换算出各种植物细胞核DNA绝对含量, 其公式为^[14]:

$$\text{细胞核DNA绝对含量(pg)} = \frac{\text{细胞核DNA相对含量}}{\text{同组鸡红血细胞核DNA相对含量}} \times 3.22 \text{ pg}$$

基因组大小计算用下列公式:

$$\text{基因组大小(bp)} = \text{绝对含量(1C)} \times 0.965 \times 10^9 \text{ bp}$$

本实验测出鸡红血细胞DNA含量2C值为3.22 pg。

2 结果和分析

2.1 几种不同植物核DNA含量

百合科几种不同植物细胞核DNA含量列于表1。从表1中可以看出, 不同种的细胞核DNA含量存在着很大的差异。按DNA含量的多少顺序排列为: 蒜头 106.47 pg、洋葱

75.30 pg、分葱 43.25 pg、黄花 30.99 pg。不同属间差异更大,蒜头、洋葱和分葱分别为黄花核 DNA 含量的 3.4、2.4 和 1.4 倍。但从同一物种相同组织的细胞来看,其处于同一分裂时期的细胞核 DNA 含量具有相对的稳定性。

Van't Hof^[15]对洋葱 2C 核 DNA 含量进行了测定,其值为 33.5 pg。本实验所测为 4C 值,换算成 2C 值为 37.6 pg,两者较为接近,但有一定差异。究其原因,除了测定方法之外,可能由于生境不同或品种差异而造成。这为了解物种(或品种)及其与生境的关系开拓了一条新思路。

表 1 4 种百合科植物核 DNA 含量

Table 1 The cell nuclear DNA contents of 4 species of Liliaceae (pg)						
材 料	序 号 No.					平均值
Material	1	2	3	4	5	Mean value
洋 葱 (4C) <i>A. cepa</i> L.	134 503	155 400	134 978	139 694	138 666	140 648.2
分 葱 (4C) <i>A. ascalonium</i>	74 646	82 970	84 136	84 733	77 406	80 778.2
蒜 头 (8C) <i>A. chinese</i> G.	185 432	212 326	198 726	226 239	171 610	198 866.6
黄 花 (4C) <i>H. citrina</i> B.	61 429	56 654	60 990	52 024	58 280	57 875.6
红血细胞(2C) RBC	5 419.8	6 222.8	6 090.7	5 874.6	66 462.7	6 014.1
						3.22

2.2 几种不同植物的基因组大小

利容千等^[3]报道了供试的几种植物材料核型,其染色体数目为:洋葱 $2n=2x=16$ 、分葱 $2n=2x=16$ 、蒜头 $2n=4x=32$ 、黄花 $2n=2x=22$ 。根据公式计算出各自的细胞核基因组大小(1C 值)。它们分别为,洋葱 18.16×10^9 bp、蒜头 12.84×10^9 bp、分葱 10.43×10^9 bp、黄花 7.48×10^9 bp。从图 1 可以看出,各种植物染色体数目存在差异。但染色体数目多少不能直接反映细胞核 DNA 含量的高低,胞核 DNA 含量只与基因组大小和染色体倍性有关。在本实验中,从胞核 DNA 含量来看,蒜头大于洋葱;而从基因组大小来看则洋葱大于蒜头。基因组是生物体维持其生存所需的全套基因,它反映了物种的特征,而染色体倍性则不是物种本质的特征。因此,对于细胞核 DNA 资料来说,基因组大小是一个很重要的生物学参数。

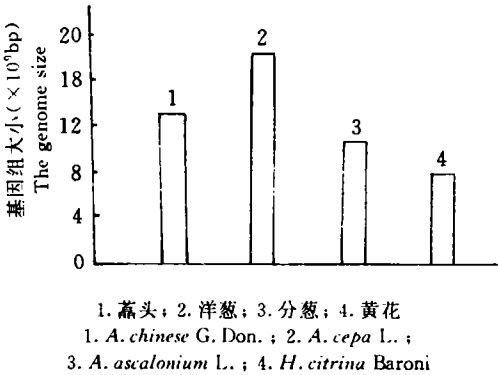


图 1 4 种百合科植物基因组大小

Fig 1 The genome size of four species of Liliaceae

3 讨论

3.1 胞核 DNA 含量的意义

Benett^[16]认为,胞核 DNA 含量提供了一个种间差异的特征常数,与生物种的表现型

和生态型特征有很强的正相关,可以作为系统发育、遗传研究的重要参考依据。

Price^[17]也认为,裸子植物在种下、居群间及居群内核 DNA 含量可出现有意义的变化。这为生物系统与进化研究提供了新的证据,同时也给经典的系统分类、进化研究带来了新的方法。

Price 等^[18]认为,在一个种内不同亚种或品种间,核 DNA 值亦有不一致的情况。甚至有人在对花生的核 DNA 进行测量时,发现在不同组织中分布也有倍性差异,说明核 DNA 含量在实际问题中的相对性和复杂性。

3.2 基因组大小评价的意义

基因组大小与核 DNA 含量具有相关性,因而对基因组大小的评价同样可以得到 DNA 的全部资料,而且测量基因组大小比测量核 DNA 值更优越。首先,测量不受细胞分裂时期的影响,结果准确可靠。其次,基因组大小更为稳定,表现在一个个体中不受组织分布的影响,同时受外界环境的影响较小。

严格地说,基因组大小的评价应以单倍体细胞(配子细胞)为对象进行测定。但是同一物种基因组大小是恒定的,因此无论测 4C 或 8C 甚至 2C 细胞都能得到 1C 值。选择 4C 核是 DNA 已经复制处于有丝分裂前、中期的细胞核,易于制片和测量。

Stebbins^[19]认为,葱属中染色体数目与 DNA 含量关系复杂,物种的进化包括了 DNA 含量的增加与减少,强调指出物种进化与 DNA 含量的关系是复杂的。本实验中,由于物种数量有限,只有葱属 3 个种和萱草属的 1 个种(黄花),因此还不能就基因组大小与进化,或某些问题作出相关分析,只能作为科学资料的积累。

基因组是生物体维持生存所需的全套基因。可以认为,它反映了生物种全部的、特定的遗传信息,从根本上决定了遗传物质的传递。所以,与核 DNA 含量相比,基因组大小更适合于作生物研究的特征参数。这不仅对细胞生物学、分类学、遗传学,而且对分子生物学研究亦有一定的意义。

参 考 文 献

- 1 李国珍主编. 染色体及其研究方法. 北京:科学出版社,1977
- 2 李正理编. 植物制片技术. 第2版. 北京:科学出版社,1987
- 3 利容千著. 中国蔬菜植物核型研究. 武汉:武汉大学出版社,1989
- 4 Banerjee S. Cytophotometric estimation of nuclear DNA in different species and varieties of agave. *Cytologia*, 1987, **52**:85~90
- 5 孙天恩. 湖北光周期敏感核不育水稻定量细胞学研究. 华中农业大学学报, 1990, **9**(4):23~27
- 6 陈寿珍. 应用国家分析仪及显微分光光度计分析转化细胞的一些生物学特征. 细胞生物学杂志, 1988, **10**(1):30~33
- 7 Greilhuber J. Genomic size of man and animals relative to the plant *Allium cepa*. *Can J Genet Cytol*, 1983, **25**:554~560
- 8 李万良. 核酸资料在植物系统与进化研究中的意义. 植物学通报, 1989, **6**(1):17~19
- 9 Van Prooijen-Kengt A C. Quantitative aspects of the cytochemical Feulgen-DNA procedure studied on model systems and cell nuclei. *Histochemistry*, 1980, **69**:1~17
- 10 Van Qost Veldt P. Absorption cytophotometry: Evaluation of three methods for the determination of DNA in

- Feulgen stained nuclei. *Histochemistry*, 1976, **50**(2): 147~159
- 11 Jones R N. Nuclear DNA variation in *Allium*. *Heredity*, 1968, **23**(4): 591~605
- 12 Hesemann E V. Methodik cytochemischer analysen bei pflanzlichen objekten IV. Einfluss methodischer faktoren auf cytophotometrische kern DNA-bestimmungen von vicia faba wurzel spitzen-zellen. *Cytologia*, 1982, **47**(2): 279~286
- 13 Dhillon S S. Requirement of an internal standard for microspectrophotometric measurements of DNA. *Amer J Bot*, 1977, **64**(1): 117~121
- 14 Dhillon S S, Rake A V, Miksche J P. Reassociation kinetics and cytophometric charatenzation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) DNA. *Plant physl*, 1980, **65**: 1 121~1 127
- 15 Vant Hof J. The duration of chromosomal DNA synthesis of the mitotic cycle and of meiosis of higher plants. In: P. C. King ed. *Handbook of genetics*, Vol 2. New York and London Plenum Press, 1975. 363~377
- 16 Bennett M D, Smith J B. Nuclear DNA amounts in angiospermes. *Phil Trans R Soc Lond*, 1976, B **274**: 227~274
- 17 Price H J. Evolution of DNA content in higher plants. *Bot Rev*, 1976, **42**(1): 27~52
- 18 Price H J, Chambers K L, Bachmann K. Geographical and ecological distribution of genomic DNA content varia-
tion in *Microserisdouglassi* (Asterceae). *Bot Gaz*, 1981, **142**: 415~426
- 19 Stebbins G L. Chromosome variation and evolution. *Science*, 1966, **152**: 1 463~1 469

DISCUSSION ON THE GENOME SIZE OF SEVERAL SPECIES OF LILIACEAE

Yang Yong Chen Kecheng

Sun Tianen

(College of Life Sciences, Wuhan
University Wuhan 430072)

(Department of Analytical and Testing
Science, Wuhan University Wuhan 430072)

Abstract The cell nuclear DNA contents in the root tip of several species of Liliaceae were measured by the Feulgen microspectrophotometry. The genome size of each species was calculated according to their nuclear types. They were as follows; *A. cepa* L. 18.16×10^9 bp, *A. chinese* G. Don. 12.84×10^9 bp, *A. ascalonicum* L. 10.44×10^9 bp and *H. citrina* B. 7.8×10^9 bp. The results suggested that the genome size should be more suitable to be used as a characteristic index of biological research than the nuclear DNA contents, because the genome contained all genes which maintain the organisms' survival and refelected the entire specific genetic informations. This study will provide valuable reference not only to Cytology, Taxonomy and Genetics, but also to Molecular biology.

Key words Feulgen microspectrophotometry, Nuclear DNA, Genome size