

早樱种系基因组大小的研究

尤禄祥, 谢梦梦, 伊贤贵, 王华辰, 段一凡, 王贤荣*

(南京林业大学生物与环境学院, 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 南京 210037)

摘要: 早樱种系 (*Cerasus subhirtella*) 具有极高的观赏价值, 变异丰富, 在分类处理上也存在较多的争议。以番茄为内标, 用流式细胞仪对番茄和早樱种系相关材料的样品进行了基因组大小的测定。通过比较番茄与早樱不同材料样品峰值的倍数关系, 计算出不同早樱样品的基因组大小。经多次试验测得大叶早樱 (*C. subhirtella*) 基因组大小为 (512.260 ± 16.200) Mb, C 值 (0.54 ± 0.289) pg, 野生早樱 (*C. subhirtella* var. *ascendens*) 基因组大小为 (274.360 ± 13.920) Mb, 即 C 值为 (0.28 ± 0.014) pg (以 $1 \text{ pg} = 978 \text{ Mb}$ 计算)。研究结果支持将野生早樱作为变种处理的分类观点。

关键词: 流式细胞术; 基因组大小; 番茄; 大叶早樱; 野生早樱

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)06-1093-05

Study on the genome size of *Cerasus subhirtella*

YOU Luxiang, XIE Mengmeng, YI Xiangui, WANG Huachen, DUAN Yifan, WANG Xianrong

(Collaborative Innovation Center of the Southern Modern Forestry, College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037)

Abstract: The group of *Cerasus subhirtella* has a high ornamental value with rich variations. Disputes exist regarding its classification. In this experiment, taking tomato as an internal standard, we used flow cytometry (FCM) to determine the genome size of tomato and other samples of *C. Subhirtella*. By comparing the multiple relationship peak of tomato and other samples of *C. subhirtella*, the genome sizes of different *C. subhirtella* samples were calculated. After several experiments, the results showed that the genome size of *C. subhirtella* was about (512.260 ± 16.200) Mb, C-value about (0.54 ± 0.289) pg. The genome size of *C. subhirtella* var. *ascendens* was (274.360 ± 13.920) Mb, C-value about (0.28 ± 0.014) pg ($1 \text{ pg} = 978 \text{ Mb}$). Such a difference in genome size supports that *C. subhirtella* var. *ascendens* is another variety.

Key words: flow cytometry; genome size; tomato; *C. subhirtella*; *C. subhirtella* var. *ascendens*

在研究植物学的过程中, 流式细胞术主要是用来检测植物细胞中细胞核 DNA 的含量^[1]以及倍性水平^[2], DNA 的含量可以通过植物细胞的 G1 期的数量, 间接的反映植物细胞的倍性水平, 因此通过此方法可以获得植物的倍性分析。

C 值是生物体的单倍体基因组所含 DNA 总量。其单位可以用质量 (pg) 表示, 也可以用碱基对的数目 (Mb) 来表示, 之间的换算关系 $1 \text{ pg} = 978 \text{ Mb}$ 或 $1 \text{ Mb} = 1.022 \times 10^{-3} \text{ pg}$ ^[3]。植物学家通过比较植物间 C 值的大小, 对种群进化、物种分类和生态学研究进

行相关分析, 它是一种有用的分析工具和证据^[4]。由于近缘物种的 C 值极为相似, 因此通过 C 值获取基因组大小, 应用这一特征信息, 分析物种之间的亲缘关系^[5], 可以用来构建物种系统的进化树, 也可以进一步来鉴定杂交物种。目前测定基因组大小的方法有很多, 通常使用 Feulgen 分光光度法和流式细胞术。流式细胞术由于具有高效、快速和准确等方面的优点, 因此可以用于测定植物的基因组大小^[6]。

樱花是蔷薇科 (Rosaceae) 樱属 (*Cerasus*) 的植物, 分布在全世界共 200 余种, 樱花主要分布在

收稿日期: 2017-01-22

基金项目: 江苏省林业三新工程项目(LYSX[2015]17)和江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)共同资助。

共同第一作者简介: 尤禄祥, 高级工程师。E-mail: 496140746@qq.com; 谢梦梦, 硕士研究生。E-mail: 983260360@qq.com

* 通信作者: 王贤荣, 教授。E-mail: wangxianrong66@njfu.edu.cn

北半球的亚洲、欧洲和北美的温暖地带,中国拥有的观赏类樱花资源丰富,大约有48种^[7]。由于其变异丰富,因此分类处理争议较大,尤其是早樱种系,Miquel在1865年发表的 *Prunus subhirtella*, 为小乔木或灌木状,其高度为3~5 m,叶小,叶缘锯齿浅,齿尖有腺点,并且伴有二次开花的现象; $2n = 24$, 为多倍体,杂交起源。1916年, Wilson把采自湖北襄阳的 *P. pendula* var. *ascendens* Makino 模式标本作为 *P. subhirtella* 的野生种处理,组合为变种 *P. subhirtella* var. *ascendens*, 主要区别在于野生种为高大乔木,高5~20 m,小枝细密,叶较大,没有二次开花现象; $2n = 16$ ^[8]。1997年王贤荣和向其柏将野生早樱处理为大叶早樱的变种,并补充了形态描述和地理分布^[9]。《中国植物志》中英文版皆将其作为大叶早樱异名处理^[10],但在形态特征和地理分布方面的描述都比较模糊和矛盾,观点值得商榷。

目前在樱属植物的染色体数目与核型的研究方面研究不多。其中, Oginuma认为樱桃的染色体数目是不同的,其染色体数为 $2n = 24$ 、 32 ^[11],而陈瑞阳认为樱桃的染色体数目是 $2x$ 、 $3x$ 、 $4x$,得到不同的染色体倍性^[12]。顾宇等^[13]通过对樱属部分种进行核型分析研究,认为樱属植物的染色体基数 $x = 8$,有3种不同类型的染色体数目: $2n = 16$ 、 $2n = 24$ 和 $2n = 32$ 。根据研究发现:二倍体 $2n = 2x = 16$ 大多为野生种类,多倍现象主要是出现在经过人工栽培驯化的樱花种类^[13]。李祯通过流式细胞术,初步对

大叶早樱和野生早樱进行了倍性及基因组大小的研究测定^[14]。但由于材料的准确性、实验结果的误差较大,为了提高实验结果的准确度,本研究进一步开展了对大叶早樱和野生早樱的实验。

本实验使用番茄作为内标植物,对大叶早樱和野生早樱的基因组大小通过流式细胞仪进行了测定分析,可以从细胞学研究结果上为分类处理提供了一定的理论依据,进而为樱属植物的全基因组测序提供了数据资料。

1 材料与方法

1.1 材料

大叶早樱和野生早樱的材料采于日本,使用其新鲜、健康的叶子进行流式细胞术,番茄由江苏省林业科学研究院提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞核悬液制备 采集新鲜的樱花嫩叶10 mg,然后滴1 mL LB01在塑料培养皿中(见表1),然后用小刀片垂直、迅速的将其新鲜叶子切碎,除去尼龙网上的悬浮物,用400目的尼龙网过滤。将获得的滤液在4℃的离心机上设置转速 $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转离心10 min,用移液枪将上清液除去,然后收集沉淀于下方的植物细胞。采用同样方法获得番茄幼嫩叶片的细胞悬液,为了保持植物材料的新鲜,将实验材料放置于冰上进行。

表1 7种细胞核裂解液的配方
Table 1 Component of seven nuclear lysis buffer

裂解液 Lysis buffer	配方 Component	已测植物 Measured plant
LB01	15 mmol·L ⁻¹ Tris, 2 mmol·L ⁻¹ Na ₂ EDTA, 0.5 mmol·L ⁻¹ 四盐酸精胺, 80 mmol·L ⁻¹ KCl, 20 mmol·L ⁻¹ NaCl, 15 mmol·L ⁻¹ β-巯基乙醇, 0.1% Triton X-100, pH=7.5	蚕豆、番茄
Galbraith's Otto I	45 mmol·L ⁻¹ MgCl ₂ ·6H ₂ O, 20 mmol·L ⁻¹ MOPS, 30 mmol·L ⁻¹ 柠檬酸钠, 0.1% Triton X-100, pH=7.0	松属、番茄
Tris·MgCl ₂	0.1 mmol·L ⁻¹ 柠檬酸, 0.5% (V/V) Tween 20, 20 mmol·L ⁻¹ β-巯基乙醇, pH=2.3	瓠瓜
Chopping	200 mmol·L ⁻¹ Tris, 4 mmol·L ⁻¹ MgCl ₂ ·6H ₂ O, 0.5% TritonX-100, pH=7.5	矢车菊
GPB	45 mmol·L ⁻¹ MgCl ₂ , 20 mmol·L ⁻¹ MOPS, 30 mmol·L ⁻¹ 柠檬酸钠, 0.1% Triton X-100, pH=7.0	毛竹、 酢浆草
WPB	0.5 mmol·L ⁻¹ 四盐酸精胺, 30 mmol·L ⁻¹ 柠檬酸钠, 20 mmol·L ⁻¹ MOPS, 80 mmol·L ⁻¹ KCl, 20 mmol·L ⁻¹ NaCl, 0.5% Triton X-100, pH=7.0	胡杨、豌豆
	0.2 mmol·L ⁻¹ Tris-HCl, 4 mmol·L ⁻¹ MgCl ₂ ·6H ₂ O, 2 mmol·L ⁻¹ Na ₂ EDTA·2H ₂ O, 86 mmol·L ⁻¹ NaCl, 10 mmol·L ⁻¹ 焦亚硫酸钠, 1% PVP-10, 1% Triton X-100, pH=7.5	葡萄、垂柳、 虞美人

1.2.2 DNA 特异性染色 将获得的樱花细胞核悬液和番茄细胞核悬液混合在一起,获得混合的细胞悬液。然后滴加入100 μL 预冷的RNA酶在制备好的

细胞核悬液中,同时加入500 μL 预冷的PI染料,其中RNA酶和染料有效浓度为 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,然后将材料置于放置于4℃的冰箱中,进行20~30 min 避

光染色。

1.2.3 基因组大小的测定与计算 采用美国 BD 公司 Influx 的流式细胞仪对实验中的基因组大小进行检测分析。使其参数设定在 488 nm 的激发光下, 然后检测 PI 的发射荧光强度。并且使每个待测样本至少收集 1 万个细胞, 为了保证实验的准确性, 每个样本重复测 5 次。一般来说变异系数 (coefficient of variation, CV) 控制在 5% 以内, 但由于木本植物制备难度较大, CV 可控制在 8% 以内。测定所得的图像和数据由流式细胞仪自带的软件 (BD FACS software 1.0.0.650 软件) 进行数据处理。其中基因组大小计算公式如下:

$$\text{目标植物基因组大小} = \frac{\text{待测植物样品DNA荧光强度}}{\text{内标植物样品DNA荧光强度}} \times \text{内标植物基因组大小}$$

2 结果与分析

本实验中使用的 PI 染料, 是一种可以用于 DNA 染色的细胞核染色试剂, 可以在双链 DNA 的碱基对中进行均匀的插入, 并对细胞中的 DNA 进行特异性染色。将 RNA 酶放入待测样品中, 使细胞中的 RNA 去除, 因此 PI 可以对细胞核中 DNA 进行染色。在实验中发现, 细胞核中的 DNA 含量与 PI 的数量成正比关系, 因此 DNA 中相对含量可以用荧光强度来表示。因而可以通过比较两者之间的荧光强度, 来换算出其中的 DNA 含量比例关系。

Leitch 等^[15]分析基因组的大小变化基本趋势是基因组在增大, 越古老的植物基因组越小。Narayan 和 Rees^[16]对山豆属 (*Lathyrus*) 18 个二倍体种的 DNA 含量进行了分析研究, 认为种间进化明显伴随有 DNA 含量减少的趋势。Greilhuber^[17]对百合科 (Liliaceae) 绵枣儿属 (*Scilla*) 18 个二倍体种的研究也发现 DNA 含量呈递减趋势。

邓果特等^[18]测定了芒和荻的 2C DNA 含量。芒 2C DNA 含量为 5.5 pg, 荻 2C DNA 含量为 4.5 pg。五节芒、芒和荻都属于芒属, 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。周知里等^[19]测定了木棉和瓜栗的 2C DNA 含量。测定结果表明: 木棉的 2C DNA 含量平均 (1.55±0.03) pg, 瓜栗的 2C DNA 含量平均 (3.21±0.075) pg。从数据上可以看出, 同为木棉科植物, 瓜栗的基因组大小大约为木棉基因组大小的 2 倍。

本实验利用流式细胞仪对樱花细胞 DNA 含量进行测定, 每个材料进行 5 组重复试验 (表 2)。从

图 1 上可以看出樱花和番茄的基因组单独测定的结果, 番茄的基因组大小的测定峰 (图 1), 与樱花的基因组大小测定峰 (图 2, 图 3) 相互分开, 没有重叠, 保证了用已知的基因组大小的番茄作内标, 使樱花的基因组大小结果更为准确。通过对番茄和大叶早樱混合样品的 PI 发射荧光强度的测定, 结果分析 (图 4) 表明, P3 为大叶早樱 2C DNA 含量峰, 峰值为 8 744, P4 为番茄 2C DNA 含量峰, 峰值为 15 830。对番茄和野生早樱混合样品的 PI 发射荧光强度的测定, 结果 (图 5) 表明, P3 为野生早樱 2C DNA 含量峰, 峰值为 9 534, P4 为番茄 2C DNA 含量峰, 峰值 32 096。

利用流式细胞仪对樱花细胞 DNA 含量进行测定, 比较番茄样品与樱花样品峰值的倍数关系, 可计算出樱花的基因组大小。大叶早樱基因组大小是番茄基因组大小平均值的 (0.540±0.017) 倍, 从而计算大叶早樱基因组大小为 (512.260±16.200) Mb, 即 C 值为 (0.540±0.017) pg; 野生早樱基因组大小是番茄基因组大小平均值的 (0.288±0.147) 倍, 从而准确的计算出野生早樱的基因组大小为 (274.360±13.920) Mb, 即 C 值为 (0.28±0.014) pg (以 1 pg DNA = 0.978×10⁹ bp 计算)。

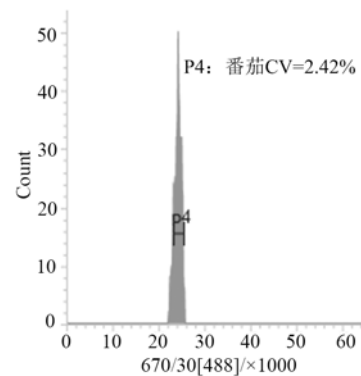


图 1 番茄样品 C 值测试结果

Figure 1 The C-value measurement of tomato sample

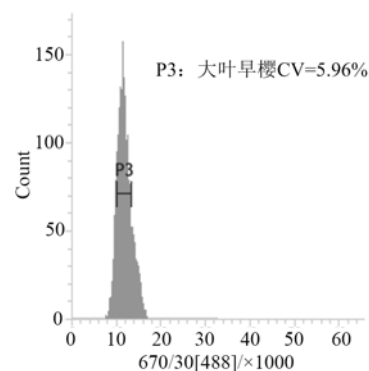


图 2 大叶早樱样品 C 值测试结果

Figure 2 The C-value measurement of *C. subhirtella*

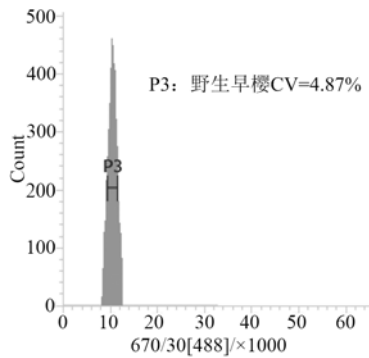


图 3 野生早樱样品 C 值测试结果
Figure 3 The C-value measurement of *C. subhirtella* var. *ascendens*

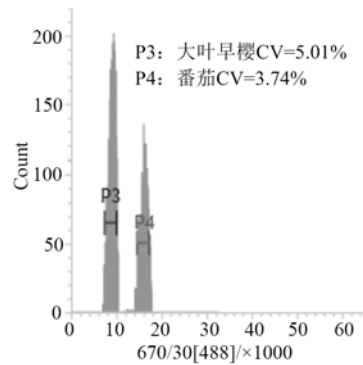


图 4 大叶早樱与番茄混合样品 C 值测试结果
Figure 4 The C-value measurement of the mixed samples of *C. subhirtella* and tomato

表 2 大叶早樱和野生早樱的基因组和 C 值测试结果

Table 2 The different genome size and C-value of *C. subhirtella* and *C. subhirtella* var. *ascendens*

样品 Sample	样品峰值 Peak value of sample	番茄峰值 Peak value of tomato	样品峰值/番茄峰值 Peak value of sample/tomato	样品基因组大小/Mb Sample genome size	C 值/pg C-value
大叶早樱 <i>C. subhirtella</i>	8 744	15 830	0.552	524.40	0.536
	8 924	17 493	0.510	484.50	0.595
	9 038	16 425	0.550	522.50	0.534
	10 936	20 172	0.542	514.90	0.526
	12 450	22 886	0.544	516.80	0.528
野生早樱 <i>C. subhirtella</i> var. <i>ascendens</i>	9 991	32 911	0.304	288.80	0.295
	9 534	32 096	0.297	282.15	0.288
	9 708	32 788	0.296	281.20	0.288
	10 023	37 228	0.269	255.55	0.261
	12 801	46 126	0.278	264.10	0.270

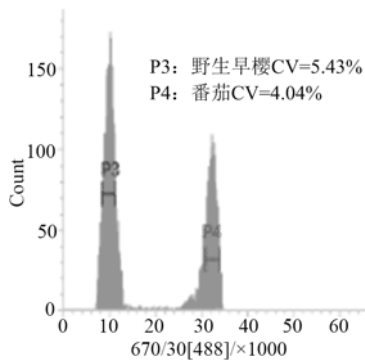


图 5 野生早樱与番茄混合样品 C 值测试结果
Figure 5 The C-value measurement of the mixed samples of *C. subhirtella* var. *ascendens* and tomato

由此可以看出，大叶早樱 C 值约为野生早樱的两倍，支持将野生早樱作为大叶早樱的变种处理。

3 结论

李祯通过比较不同樱属植物与大豆峰值大小的比较，得出结论：东京樱花基因组大小为 320.71 Mb，大岛基因组大小 551.83 Mb，八重红枝垂基因组大

小为 274.59 Mb，迎春樱基因组大小为 336.83 Mb 等^[14]。通过查阅植物 C 值数据库得知：蔷薇科植物的 C 值是 0.1~3.65 pg，其中苹果亚科 C 值是 1.09 pg，绣线菊亚科 C 值是 0.47 pg，蔷薇亚科 C 值是 0.61pg，李亚科 C 值是 0.66 pg。在本实验中，大叶早樱的基因组大小是 (512.260 ± 16.200) Mb，即 C 值为 (0.540 ± 0.017) pg，野生早樱基因组大小是 (274.360 ± 13.920) Mb，即 C 值为 (0.28 ± 0.014) pg。

Galbraith 等开创了利用流式细胞术来检测植物细胞中细胞核的 DNA 含量以及其植物倍性的先河^[20]。邓果特等采用 FCM 用水稻品种日本晴为内标，首次确定五节芒 (*M. floridulus*) 的基因组大小平均为 259.59 Mb^[18]。武荣花等使用 LB01 裂解液检测出 18 个中国古老月季品种的基因组大小，其基因组大小在 0.62~0.71 pg 之间^[21]。刘瑞瑞等使用流式细胞术检测出苦苣苔科的基因组大小，使用 LB01 裂解液所测物种中白花蛛毛苣苔的基因组最小^[22]。李祯等以大豆品种 William 82 为标准样品，首次测

定了山樱花 (*C. serrulata*) 的基因组大小为 336.67 Mb。并得出 LB01 为最适樱属 (*Cerasus*) 植物细胞裂解^[23]。

在本实验中, 选用了多种裂解液, 其中 LB01 裂解液最适合樱花的解离, LB01 裂解液的细胞核悬浮液质量最好, 碎片峰与样本峰可以明显的区分开来, WPB 次之。找出适合待测植物的裂解液, 可以确保其植物的完整性, 如果裂解液不适合, 会使溶液粘稠, 并且游离不出完整的细胞核。

Bennet 和 Leitch^[24]内标的选择对流式细胞仪测定结果有着重要的影响。内标法是将待测样品与内标样品按一定的细胞数混悬在一起进行染色, 这种方法可以避免外标法引入的误差, 可以使测量误差降低到最小限度。因而选取内标样本应满足: (1) 已知内标样品的 DNA 含量, 并且具有一定的稳定性; (2) 待测样品与内标样品的染色体结构相似; (3) 待测样品与内标样品的峰值不能重叠。

本实验曾尝试使用模式植物水稻作为内标, 由于客观上其基因组大小与樱花太过接近, 测定混合样品樱花峰和水稻峰常会部分重叠, 对实验结果的准确性造成一定的影响。理想的内标应选用与待测样品基因组大小比较相近、可以相互区分且容易获得的样品。

另外, 用番茄做内标得到的粒子团区分明确清晰, 表明采用番茄作为内标样品测定效果较好。因此, 本研究以番茄作为内标来测定樱花基因组大小, 结果更为准确可靠。

参考文献:

- [1] MALLÓN R, RODRÍGUEZ-OUBIÑA J, GONZÁLEZ M L. In vitro propagation of the endangered plant *Centaurea ultriae*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis[J]. Plant Cell Tiss Org (PCTOC), 2010, 101(1): 31-39.
- [2] MIYASHITA T, ARAKI H, HOSHINO Y. Ploidy distribution and DNA content variations of *Lonicera caerulea* (Caprifoliaceae) in Japan[J]. J Plant Res, 2011, 124(1): 1-9.
- [3] GÓMEZ-CAMPO C, PRAKASH S. Origin and domestication [M]//Gómez-Campo C. Biology of Brassica Coenospecies. Developments in Plant Genetics and Breeding. Amsterdam: Elsevier Science, 1999: 33-58.
- [4] LOURERIO J, TRÁVNÍČEK P, RAUCHOVÁ J, et al. The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants[J]. Preslia, 2010, 82(1): 3-21.
- [5] GROTKOPP E, REJMANEK M, SANDERSON M J, et al. Evolution of genome size in pines (*Pinus*) and its life-history correlates: supertree analyses[J]. Evolution, 2004, 58(8): 1705-1729.
- [6] VON BOTHMER R, GUSTAFSSON M, SNOGERUP S, et al. *Brassica* sect. *Brassica* (*Brassicaceae*) II. Inter- and intraspecific crosses with cultivars or *B. oleracea* [J]. Genet Resour Crop Ev, 1995, 42(2): 165-178.
- [7] 刘晓莉. 14 个樱花品种观赏性状综合评价和樱花园林应用研究[D]. 临安: 浙江农林大学, 2012.
- [8] 谢春平. 不同居群野生早樱形态特征及其群落学研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2007.
- [9] 王贤荣, 向其柏. 樱属植物分类订正[J]. 南京林业大学学报, 1998, 22(4): 60-62.
- [10] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 38 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1986: 73.
- [11] OGINUMA K. Karyomorphological studies on *Prunus* in Japan[J]. J Sci Hiroshima Univ, Ser B Div 2, 1987, 21: 1-66.
- [12] 陈瑞阳. 中国主要经济植物基因组染色体图谱: 第 3 册 中国园林花卉植物染色体图谱[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [13] 顾宇, 史港影, 王贤荣, 等. 樱属植物核型参数及种间亲缘关系分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2014, 38(增刊): 25-29.
- [14] 李祯. 樱属部分种倍性及基因组大小研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2015.
- [15] LEITCH I J, SOLTIS D E, SOLTIS P S, et al. Evolution of DNA amounts across land plants (*Embryophyta*)[J]. Ann Bot-London, 2005, 95(1): 207-217.
- [16] NARAYANR K J, REES H. Nuclear DNA variation in *Lathyrus*[J]. Chromosoma, 1976, 54(2): 141-154.
- [17] GREILHUBER J. Evolutionary changes of DNA and heterochromatin amounts in the *Scilla bifolia* group (*Liliaceae*)[J]. Plant Syst Evol, 1979, 2: 263-280.
- [18] 邓果特, 刘清波, 蒋建雄, 等. 五节芒基因组大小测定[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(2): 339-341.
- [19] 周知里, 熊智, 马焕成, 等. 两种木棉科植物基因组大小测定[J]. 西部林业科学, 2014, 43(2): 98-101.
- [20] GALBRAITH D W, HARKINS K R, MADDOX J M, et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues[J]. Science, 1983, 220(4601): 1049-1051.
- [21] 武荣花, 葛蓓蓓, 王茂良. 应用流式细胞术测定 18 个中国古老月季基因组大小[J]. 北京林业大学学报, 2016, 38(6): 94-100.
- [22] 刘瑞瑞, 周太久, 盘波. 39 种苦苣苔科植物的基因组大小报道[J]. 陇东学院学报, 2016, 27(1): 54-58.
- [23] 李祯, 伊贤贵, 王贤荣, 等. 山樱花基因组大小的测定[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2014, 38(增刊): 17-19.
- [24] BENNETT M D, LEITCH I J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects[J]. Ann Bot-London, 2005, 95(1): 45-90.