

文章编号: 1005-0906(2006)02-0013-03

摩擦禾与玉蜀黍属内物种间的分子显带分析

韩永华¹, 陈志坚¹, 李冬郁², 宋运淳³

(1. 广西师范大学生命科学学院, 桂林 541004; 2. 广西畜牧研究所, 南宁 530001;

3. 武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 分子显带是一种研究物种间共享的重复序列在染色体上分布特征的简便方法, 它是通过比较基因组原位杂交进行的。本研究中, 我们以摩擦禾基因组 DNA 为探针, 对玉蜀黍属的几个种的染色体进行了比较基因组原位杂交分析。在玉蜀黍属的几个种中都检测到了信号明显的 4 种带, 分别为中间带(interstitial band)、着丝粒带(cen-tromeric band)、端粒带(telomeric band)和染色组(knob)。通过分子显带与 DAPI 显带比较, 阐明了供试种间保守的重复 DNA 序列的分布特征。

关键词: 摩擦禾; 玉蜀黍属; 分子显带**中图分类号:** S513.01**文献标识码:** A

Molecular Banding Analysis Among *Tripsacum Dactyloides* and Several Species in Genus *Zea*

HAN Yong-hua¹, CHEN Zhi-jian¹, LI Dong-yu², SONG Yun-chun³

(1. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004;

2. Guangxi Livestock Institute, Nanning 530001;

3. The Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Molecular banding undertaken with comparative genomic *in situ* hybridization(cGISH) is a simple approach which generates chromosome characteristic signals in heterologous FISH experiments at regions with conserved repeated sequences. In this study, cGISH was undertaken with labeled total genomic DNA of *Tripsacum dactyloides* (2n=72) to chromosomes of several species in genus *Zea*. Four kinds of bands including interstitial band, centromeric band, telomeric band and knob were detected on all species. Compared to DAPI banding, the distributional characteristics of conserved repeated DNA sequences were illustrated among tested species.

Key words: *Tripsacum dactyloides*; Genus *Zea*; Molecular banding

为了研究物种基因组之间的同源性, 人们主要利用 RFLP、RAPD 等各种分子标记技术进行基因组比较遗传作图^[1,2]。然而, 这一技术仅仅是用一部分标记来探测整个基因组的关系, 难免有一定的局限性, 不能全面地反映基因组之间的关系, 特别是不能反映它们重复 DNA 序列的特点。因为在真核生物基因组中重复序列占有很大比例, 它们比编码序列更容易发生变异, 特别是近缘物种间重复序列的异同可以有效地反映它们的进化距离^[3]。许多重复序列在

近缘种甚至不同属间是共享的, 但在不同基因组中分布模式是不同的, 而有些重复序列是基因组甚至染色体特异的^[4,5]。

一种新的基因组原位杂交显带方法, 利用一个物种的基因组 DNA 作探针对该物种或其它物种染色体进行原位杂交, 其杂交信号检出程序是专门用于检出重复 DNA 顺序的, 因此可以直观地显示该物种及不同物种间共享的重复序列在染色体上的分布。它是研究不同种基因组间重复序列的变异性和保守性的一种简便方法。Jutta 等^[6]把这种方法称为比较基因组原位杂交(comparative genomic *in situ* hybridization)的分子显带(molecular banding)方法。他们以拟南芥总基因组 DNA 为探针, 对 10 个其它物种的染色体进行比较基因组原位杂交, 检测到种间保守的重复 DNA 序列的杂交信号, 信号的分布特点在

收稿日期: 2005-04-24**基金项目:** 国家自然科学基金(39870423)和广西师范大学生态博士授权点建设项目资助**作者简介:** 韩永华(1971-), 女(蒙古族), 吉林双阳人, 副教授, 博士, 从事植物分子细胞遗传学研究。Tel:0773-5833710

E-mail: hanyh329@163.com

不同种或不同染色体是不同的。

玉米(*Zea mays* L.) 的基因组大约有 $2.3 \sim 2.7 \times 10^9$ bp, 其中 80% 以上是重复序列^[7]。在分类学上, 玉米属于禾本科(*Gramineae*)玉蜀黍族(*Maydeae*)的玉蜀黍属(*Zea*)。在玉蜀黍族中, 与玉蜀黍属亲缘关系最近的是摩擦禾属(*Tripsacum*)^[8]。

在本研究中, 我们首次通过比较基因组原位杂交分子显带的方法, 分析了摩擦禾属的摩擦禾(*Tripsacum dactyloides*, $2n=72$) 和玉蜀黍属内的几个种基因组间重复 DNA 序列的同源性及其在染色体上的分布特征。

1 材料与方法

1.1 植物材料和染色体制片

供试材料包括玉蜀黍属内的栽培玉米亚种(*Zea mays* ssp. *mays*, $2n=20$) 玉米自交系黄早四、墨西哥玉米亚种(*Zea mays* ssp. *mexicana*, $2n=20$)、二倍体多年生类玉米(*Zea diploperennis*, $2n=20$)和摩擦禾属的摩擦禾(*Tripsacum dactyloides*, $2n=72$)。染色体制片参照 Song 和 Gustafson^[9]的方法。

1.2 基因组 DNA 的提取及标记

参照 Doyle^[10]的方法提取摩擦禾的基因组总 DNA。用枪头反复吹吸将 DNA 打断为 10 kb 左右, 用切口平移法对打断的 DNA 进行标记, 增加了 DNaseI 的比例并延长标记时间至 4 h, 0.5 mol/L Na_2EDTA 终止液终止。点印迹检测标记效果。

1.3 原位杂交及信号检出

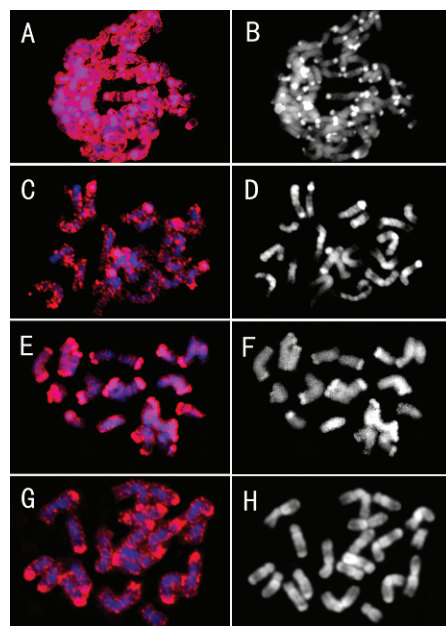
原位杂交及信号检出参照 Jutta 等^[6]的程序, 用链亲和素-Cy3(Kirkegaard Perry Laboratories)检出信号, 制片经 DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole)复染后, Olympus BX60 荧光显微镜下观察, 利用 Sensys CCD 1401E 系统和 V++ 软件合成照片。Photo-shop 软件进行图片处理。

2 结果与讨论

用摩擦禾基因组 DNA 对自身染色体杂交时, 每条染色体大部分被强的杂交信号所涂染, 少部分信号较弱, 没有清楚的带纹(图 1 中 A)。表明其基因组中重复顺序占很大比重。与 DAPI 带型比较(图 1 中 B), DAPI 亮度较大的异染色质区和近着丝粒区杂交信号一般较强。

当摩擦禾基因组 DNA 与玉蜀黍属的栽培玉米(图 1 中 C)、墨西哥玉米(图 1 中 E)和二倍体多年生类玉米(图 1 中 G)的染色体杂交时, 不同染色体区域信号的强度互有不同, 所得到的信号带大体分为染

色组(knob)、中间带(interstitial band)、着丝粒带(centromeric band)和端粒带(telomeric band)。



注: A 为摩擦禾, C 为玉米, D 为墨西哥玉米, G 为二倍体多年生类玉米。B、D、F 和 H 分别为相应的 DAPI 染色的染色体。

图 1 各实验材料的比较基因组原位杂交结果

在玉蜀黍属的不同种中, 与 DAPI 亮度大的染色组相对应的区域(图 1 中 D、F 和 H), 杂交信号很强, 且面积更大, 一些比较小的经 DAPI 显带不易识别的染色组通过分子显带能被清楚地显示(图 1 中 E 和 G)。但玉蜀黍属内供试不同种之间染色组的分布位置、大小和数目是不同的。在玉蜀黍属内栽培玉米的染色组一般位于近末端, 墨西哥玉米的染色组多数位于末端, 少数位于近末端, 二倍体多年生类玉米的染色组都位于末端。染色组的数目栽培玉米一般要少些, 而墨西哥玉米和二倍体多年生类玉米则明显地多些。我们的研究结果表明, 摩擦禾和供试玉蜀黍属不同种之间染色组重复顺序是高度同源的, 这与 Dennis 和 Peacock^[11]和 Blake 等^[7]的研究结果一致。Dennis 和 Peacock 指出, 摩擦禾异染色质组的卫星 DNA 成分与玉米、墨西哥玉米和二倍体多年生类玉米中异染色质组的卫星 DNA 成分高度同源, Blake 等的研究结果也表明玉米和摩擦禾异染色质组的重复顺序高度同源。

染色体上除染色组之外的区域, 都分布有散在的点状信号, 这些信号的强度和大小互有不同, 沿染色体长轴信号点间保持一定的距离, 姐妹染色单体间多数信号点彼此对应, 同源染色体两成员之间的带型都可以彼此配对, 供试的不同种间这些区域都有类似的带型(图 1 中 C、E 和 G)。我们把分布在染

色体臂中间区域的这些点状带划分为中间带,而在着丝粒和近着丝粒区的为着丝粒带。显然,中间带在供试的种间是最为保守的。而着丝粒和近着丝粒这一重复顺序密集区,摩擦禾杂交时被强而连续的信号所涂布,而种间杂交则仅有类似中间带的点状信号,表明摩擦禾着丝粒和近着丝粒区的重复 DNA 只有少部分是与供试种同源的,保守程度低。供试不同种凡不具有染色体组带的染色体末端,都有明显可见的端粒顺序杂交信号,即端粒带,表明供试种之间端粒顺序同源性很高。具染色组信号的末端很可能端粒信号与染色组信号结合在一起,而不能被分辨,因此看不出端粒信号。

应用比较基因组原位杂交技术进行的分子显带,比常规的显带技术具有不可比拟的优越性,第一,它可直观地展示物种间重复基因组 DNA 的同源性及其在染色体上的分布特征;第二,杂交信号的分布与 DAPI 染色的带型相比较,可以划分出重复 DNA 中保守的和易变的部分;第三,分子显带的带纹比常规显带包括 C-显带、N-显带和荧光显带的带纹丰富,即使与难度很大而不易成功的 G-显带相比,带纹也要多些,因为端粒带只有通过分子显带才能显现;第四,分子显带的技术很稳定,且易于操作,重复性高。如果分子显带中采用近缘种 DNA 作为基因组原位杂交的探针,一般可以达到上述的效果,但采用关系很远的物种 DNA 作为基因组原位杂交的探针时,杂交信号或带纹的数目将明显地减少。Jutta

等^[9]的工作已证明了这一点。

参考文献:

- [1] Devos K M, Gale M D. Genome relationships: the grass model in current research. *The Plant Cell*, 2000, 12: 637-646.
- [2] Bennetzen J L. Comparative sequence analysis of plant nuclear genomes. Microcolinearity and its many exceptions. *The Plant Cell*, 2000, 12: 1021-1030.
- [3] Belyayev A, Raskina O. Heterochromatin discrimination in *Aegilops speltoides* by simultaneous genomic *in situ* hybridization. *Chromosome Research*, 1998, 6: 559-565.
- [4] Shibata F, Hizume M. The identification and analysis of the sequences that allow the detection of *Allium cepa* chromosomes by GISH in the allopolyploid *A. wakegi*. *Chromosoma*, 2002, 111: 184-191.
- [5] Raskina O, Belyayev A, Nevo E. Repetitive DNAs of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) and their relation to S-genome species: molecular cytogenetic analysis. *Genome*, 2002, 45: 391-401.
- [6] Jutta F Z, Yi Y, Reinhold G, et al. Comparative genomic *in situ* hybridization(cGISH) analysis on plant chromosomes revealed by labeled *Arabidopsis* DNA. *Chromosome Research*, 2001, 9: 357-375.
- [7] Blake C M, Scott V T, Michele M. Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Research*, 2001, 11(10): 1660-1676.
- [8] 刘纪麟. 玉米育种学[M]. 北京: 农业出版社, 1991.
- [9] Song Y C, Gustafson J P. The physical location of fourteen RFLP markers in rice(*Oryza sativa* L.). *Ther Appl Genet*, 1995, 90: 113-119.
- [10] Doyle J J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1998, 12 (1): 13-15.
- [11] Dennis E S, Peacock W J. Knob heterochromatin homology in maize and its relatives. *J. Mol. Evol.*, 1984, 20(3-4): 341-350.