

少花龙葵与黄果龙葵染色体核型分析

蓝伟侦, 张海洋*, 徐秀芳

(湖州师范学院 生命科学院, 浙江 湖州 313000)

摘要: 利用 DAPI 显带技术对少花龙葵和黄果龙葵染色体进行了核型分析。结果表明, 少花龙葵染色体数目为 24, 为二倍体, 核型公式为 $K(2n)=24=6sm+18m$; 黄果龙葵染色体数目为 48, 为四倍体, 核型公式为 $K(4n)=48=48m$, 并进一步构建了这两个种的核型模式图。此外, 还初步探讨了染色体的 DAPI 带型及其异染色质的分布。为中国龙葵的系统分类和进化趋向研究, 以及育种和资源的开发利用提供帮助。

关键词: 少花龙葵; 黄果龙葵; DAPI 带; 核型分析

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)05-0599-04

Karyotype analyses of *Solanum photeinocarpum* and *Solanum nigrum* var. *suaveolens*

LAN Wei-Zhen, ZHANG Hai-Yang*, XU Xiu-Fang

(College of Life Sciences, Huzhou Teacher College, Huzhou 313000, China)

Abstract: Karyotypes of *Solanum photeinocarpum* and *S. nigrum* var. *suaveolens* were studied by using DAPI banding technique. Somatic chromosome numbers of *S. photeinocarpum* are $2n=24$ (diploid), the karyotype formulas being $K(2n)=24=6sm+18m$; however, the chromosome numbers of *S. nigrum* var. *suaveolens* are $4n=48$ (tetraploid), the karyotype formulas being $K(4n)=48=48m$, and karyotype idiograms were established of the two species. The DAPI banded pattern and distribution of heterochromatic were also discussed that to improve the systematic classification and evolutionary trends research, breeding and exploiting the resources of *S. nigrum* in China.

Key words: *S. photeinocarpum*; *S. nigrum* var. *suaveolens*; DAPI band; karyotype analysis

龙葵 (*Solanum nigrum*) 为茄科 (Solanaceae) 茄属 (*Solanum*), 一年生草本植物, 广布于欧、亚、美洲的温带至热带地区, 国内大部分省区均有分布, 多为野生杂草。目前龙葵已被各国植物学家定名的有 20 多个种, 构成了龙葵复合系统 (*S. nigrum complex*) (杨永年等, 1994)。文献报道中国龙葵有 2 个种及 1 个变种, 分别为龙葵 (*S. nigrum*)、少花龙葵 (*S. photeinocarpum*) 和黄果龙葵 (*S. nigrum* var. *suaveolens*) (张海洋等, 2004)。龙葵性寒、味苦、微甘, 全草均入药, 有清热、解毒、活血、消肿等功能, 主治感冒、牙痛、慢性支气管炎、痢疾、乳腺炎和癌症等

病。种子可治急性扁桃体炎、疔疮等。果实可食用或加工饮品、果酒等, 具有极好的开发利用前景 (张海洋等, 1999; 米拉等, 2002)。

目前, 国外报道较多的主要是关于杂交龙葵、多倍体龙葵, 在减数分裂中染色体行为的研究, 探讨龙葵复合种的形成、进化及系统分类等 (Khan 等, 1977; Tandon & Rao, 1966)。在我国已有报道中国龙葵复合种内存在染色体倍性差异研究, 即少花龙葵是二倍体 ($2x=24$), 黄果龙葵是四倍体 ($4x=48$), 龙葵是六倍体 ($6x=72$) (徐秀芳等, 2004)。但国内仅对六倍体龙葵染色体进行了核型研究 (杨德

收稿日期: 2008-03-11 修回日期: 2008-12-10

基金项目: 湖州师范学院人才引进项目 [Supported by the Project for Talent Introduction of Huzhou Teacher College]

作者简介: 蓝伟侦 (1980-), 男 (畲族), 浙江武义人, 硕士, 实验师, 主要从事植物体细胞遗传学研究, (E-mail) lanweizhen@hutc.zj.cn,

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: haiyangzh@hutc.zj.cn)

奎等,1996),尚无其它两个种的核型研究。

荧光显带技术是利用具有碱基特异性结合的荧光染料,分析染色体的细胞化学特性。该技术的发展和应用为染色体核型分析带来了更多的特性和标记,如运用到松科植物属间、种间及种以下水平的关系及科内的进化水平的研究(徐进等,1997),以及君子兰属 4 个种和牵牛属 薤菜 荧光显带核型分析(Ran 等,1999;刁英等,2005)。本文利用 DAPI(4,6-二脒基-2-苯基吡啶)荧光显带技术,对二倍体少花龙葵和四倍体黄果龙葵染色体数目和核型进行分析,构建其核型模式图谱,为其资源鉴定和保存、系统学分类,以及遗传育种提供更为详细的细胞学依据。

1 材料和方法

供试材料为少花龙葵和黄果龙葵,分别来源佳木斯大学和沈阳农业大学校园,凭证标本藏于黑龙江省佳木斯大学植物标本室。

染色体制片参照 Ren 等(1997)的方法。浸种 1d 后,将种子放在铺有潮湿滤纸的培养皿中,25~28℃ 黑暗培养,根尖长至 1 cm 左右时,切下投入新鲜配制的卡诺固定液(无水乙醇 3:冰乙酸 1)固定过夜。将固定好的根尖取出,用蒸馏水洗净,然后放

入质量分数 2% 的纤维素酶和果胶酶的混合酶液中,28℃ 酶解 4 h。洗尽酶液后,利用火焰干燥法制片。染色体制片于 20 μg/mL DAPI 荧光染料复染, Olympus BX51 荧光显微镜观察及拍照。通过拍照选择染色体分散良好的有丝分裂中期细胞 50 个进行染色体计数, SPOT advanced 软件测量染色体长度, Photoshop 软件图片处理。核型分析采用李懋学等(1985)的方法,选择 5 个完整的中期染色体进行测量统计,取平均值。

2 结果与分析

2.1 少花龙葵染色体核型分析

少花龙葵为二倍体,体细胞染色体数目为 $2n=24$ (图 1)。SPOT advanced 软件测量染色体长度,并进行相关统计,其核型分析见表 1。染色体的总长为 39.48 μm,绝对长度变化范围 2.48~4.76 μm,平均长度 3.29 μm,臂比幅度 1.08~2.53。6、9 和 12 号染色体为近中着丝粒染色体(sm),其余为中部着丝粒染色体(m)。未发现随体染色体。核型公式为 $K(2n)=24=6sm+18m$ 。染色体相对长度变异范围为 6.27~11.96,最长染色体与最短染色体的比值为 1.91,臂比大于 2:1 的染色体的比

表 1 少花龙葵和黄果龙葵的核型分析

Table 1 Karyotype analyses of *S. photeinocarpum* and *S. nigrum* var. *suaveolens*

编号 No.	少花龙葵 <i>S. photeinocarpum</i>			黄果龙葵 <i>S. nigrum</i> var. <i>suaveolens</i>		
	臂比 AR±SD ^{a)}	相对长度 RL±SD ^{b)}	着丝粒位置 PC	臂比 AR±SD	相对长度 RL±SD	着丝粒位置 PC ^{c)}
1	1.27±0.31	11.96±0.56	m	1.32±0.19	12.72±0.31	m
2	1.56±0.25	10.07±0.23	m	1.29±0.45	10.65±0.25	m
3	1.19±0.33	9.61±0.17	m	1.26±0.36	9.82±0.39	m
4	1.25±0.17	9.11±0.37	m	1.43±0.17	9.30±0.55	m
5	1.47±0.23	8.33±0.19	m	1.40±0.27	9.11±0.48	m
6	1.91±0.26	7.98±0.24	sm	1.27±0.23	8.32±0.12	m
7	1.39±0.10	7.83±0.33	m	1.31±0.23	7.69±0.47	m
8	1.63±0.32	7.76±0.25	m	1.13±0.44	7.18±0.19	m
9	2.53±0.51	7.59±0.46	sm	1.61±0.39	7.06±0.49	m
10	1.36±0.16	7.20±0.39	m	1.51±0.31	6.77±0.53	m
11	1.08±0.45	7.09±0.51	m	1.41±0.18	6.46±0.17	m
12	2.42±0.33	6.26±0.35	sm	1.47±0.33	4.73±0.26	m

^{a)} AR; arm ratio; ^{b)} RL; relative length; ^{c)} PC; position of centromere.

率为 0.17。其相应的染色体核型模式图见图 2。

2.2 黄果龙葵染色体核型分析

黄果龙葵为四倍体,染色体数目为 $4n=48$ (图 1),染色体核型分析见表 1。染色体的总长为 70.39 μm,绝对长度变化范围 1.67~4.48 μm,平均长度

为 2.93 μm,臂比幅度为 1.13~1.61。黄果龙葵的 12 组染色体均为中部着丝粒染色体。未发现随体染色体。核型公式为 $K(4n)=48=48m$ 。染色体相对长度变异范围为 4.74~12.72,最长染色体与最短染色体的比值为 2.68,染色体核型模式图见图 2。

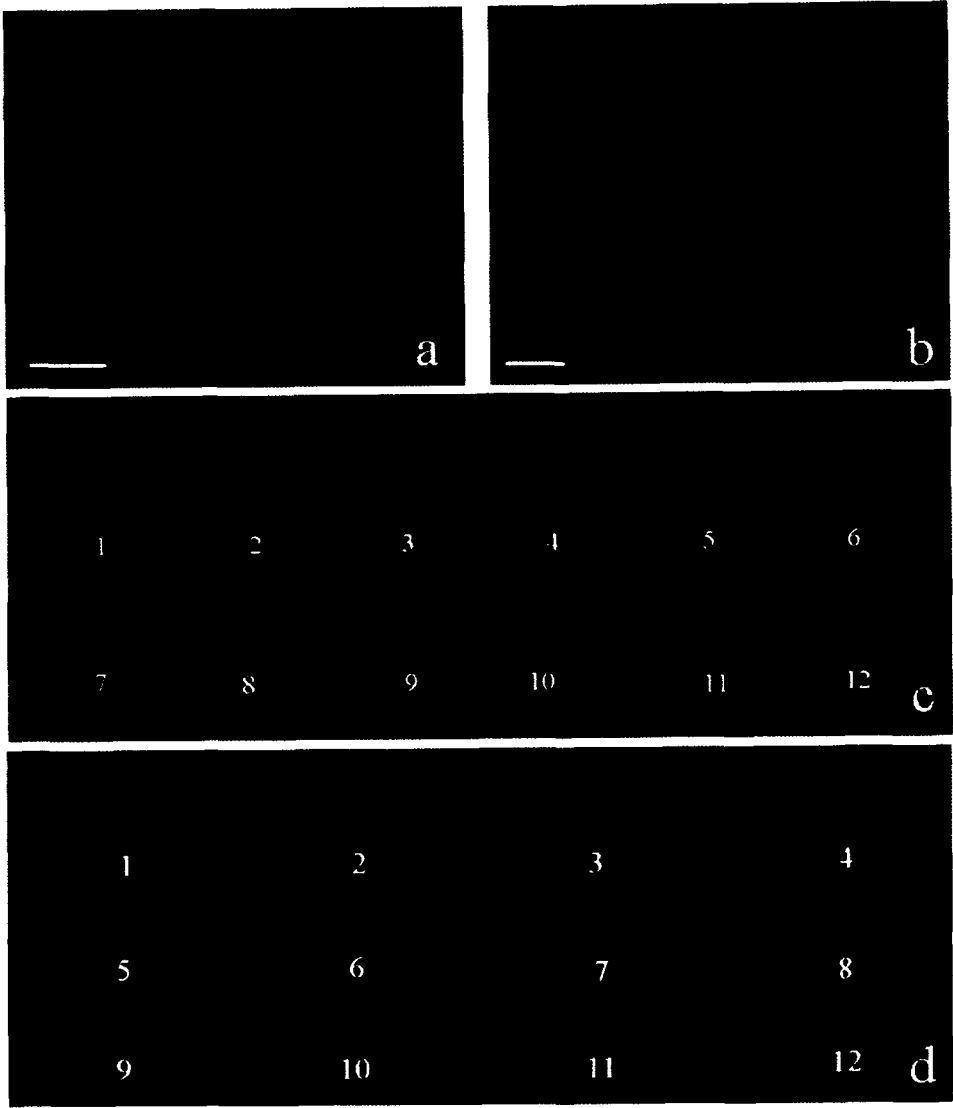


图 1 少花龙葵和黄果龙葵中期染色体分裂相及核型图

Fig. 1 Photomicrographs of chromosomes and karyograms of *S. photeinocarpum* and *S. nigrum* var. *suaveolens*

a. 少花龙葵有丝分裂中期染色体; b. 黄果龙葵有丝分裂中期染色体; c. 少花龙葵染色体核型; d. 黄果龙葵染色体核型。Bar=5 μm。

a. Mitosis metaphase chromosomes of *S. photeinocarpum*; b. Mitosis metaphase chromosomes of *S. nigrum* var. *suaveolens*;

c. Karyotype of *S. photeinocarpum*; d. Karyotype of *S. nigrum* var. *suaveolens*. Bar=5 μm.

3 讨论

染色体具有两个区域,分别为常染色体区域和异染色体区域,常染色体区域通常富含 G-C 序列,许多编码的基因都位于 G-C 丰富的区域,而异染色质区域富含 A-T 序列,通常是重复序列含量最高的区域。荧光染料 DAPI 是一种 DNA 特异性染料,与 DNA 产生非嵌入式结合,并在荧光显微镜紫外

光的激发下发出荧光。刁英等(2005)研究表明,在 A-T 序列富有区,DAPI 与双链的小沟结合,其结合量大,发出较强的荧光;在 G-C 序列富有区,DAPI 则插入双链的 DNA 之间,其结合量小,而产生较弱的荧光或不发荧光。同时由于 DAPI 的结合也可能影响染色体上蛋白质结构从而产生染色体带。因此 DAPI 带纹在一定程度上反映了染色体 DNA 的分子序列和蛋白组成。

DAPI 荧光显带技术在染色体未经任何化学处

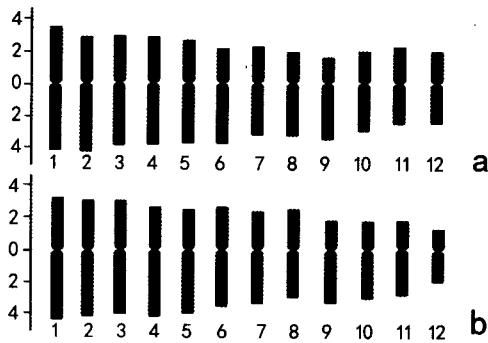


图 2 少花龙葵和黄果龙葵染色体核型模式图
Fig. 2 Karyotype idiograms of *S. photeinocarpum*
and *S. nigrum* var. *suaveolens*

a. 少花龙葵; b. 黄果龙葵。

a. *S. photeinocarpum*; b. *S. nigrum* var. *suaveolens*.

理的情况下,直接用配制的 DAPI 进行复染,利用荧光显微镜镜检,并结合相关分析软件,在其染色体上展示出类似 G 带的丰富带纹,且带纹稳定,无论大基因组植物还是小基因组的植物都能够很好的显示出带纹(图 1)。这种方法由于染色体未经化学处理,因此显示的带纹应该较忠实地反映了染色体的结构和异染色质的分布。先前研究中,我们曾利用龙葵幼果为材料,利用常规压片法制片,由于受细胞壁、细胞间质,以及卡宝品红染色处理等因素影响,使染色体分散不好及形状发生变化,因此对其核型分析带来了很大的困难(徐秀芳等,2004)。本文利用龙葵的根尖为材料,通过根尖酶解,消除细胞壁和细胞间质,促使各细胞能相互分开,并火焰干燥法制片使分裂相得以更好分散。另外,实验利用荧光显带技术对少花龙葵和黄果龙葵的染色体进行了分析,发现异染色质在染色体的着丝粒及其两侧有集中分布,这与着丝粒的结构和组成吻合,与其他植物中的情况相同;同时在这两个种染色体的短臂和长臂上也有较集中的异染色质分布(图 1)。

张海洋等(1999)对中国龙葵复合种三类型的 20 个形态特征进行聚类分析。少花龙葵为二倍体,分布于长江以南;黄果龙葵为四倍体,分布于东北和内蒙;龙葵为六倍体,分布于长江以北。从地理分布、染色体倍数、形态特征及聚类分析结果看,少花龙葵为二倍体类群,特征表现出一定的原始性。在本研究中,我们对同源染色体的识别是依据相似 DAPI 带型进行的,少花龙葵与黄果龙葵的染色体 DAPI 带纹具有一定的相似性(图 1),这进一步反映

了这两个种具有相似的基因组结构。而杨德奎等(1996)的六倍体龙葵核型分析表明,其 12 组染色体均为中部着丝粒染色体,与黄果龙葵一致,是一个较对称的核型。这说明在染色体结构类型上,龙葵与黄果龙葵亲缘关系要比少花龙葵更近些。此外,已有的研究表明,多倍体的起源是由于在进化历史上频繁的发生杂交和多倍化(Wang 等,1992)。Lim 等(1998)也曾利用秋水仙素诱导二倍体形成多倍体进行过研究。黄果龙葵和龙葵的器官大于少花龙葵的器官,体现多倍体器官的肥大性,黄果龙葵和龙葵是由少花龙葵演化而来的不同多倍体种,少花龙葵可作为独立种,黄果龙葵作为龙葵的变种。

核型和带型是物种特有的再现性很高的细胞遗传学信息。染色体 DAPI 带型对这个种细胞遗传学研究的比较分析很有意义,为它们的系统分类和进化趋向研究,以及育种和资源的开发利用提供依据。

参考文献:

- Diao Y(刁英),Chen S(陈思),Huang YD(黄雨蝶),et al. 2005. DAPI banded karyotype of *Ipomoea aquatica* (L. reptans Poir) (蕹菜的 DAPI 显带核型)[J]. *Amino Acids Biotic Res*(氨基酸和生物资源),27(1):32-34
- Khan AH,Rao GR,Khan R. 1977. Biosystematics of the *Solanum nigrum* complex[J]. *Indian J Genetics Plant Breeding*,37(3):444-449
- Li MX(李懋学). 1985. Secondary constriction, nucleolar organizer region and satellite chromosome(染色体次缢痕、核仁组成区和随体)[J]. *Bull Biol*(生物学通报),7(1):12-14
- Lim KY,Leitch IJ,Leitch AR. 1998. Genomic characterization and the detection of raspberry chromatin in polyploid *Rubus*[J]. *Theor Appl Genet*,97:1 027-1 033
- Mi L(米拉),Yang QL,Na SMH(杨秋林),et al. 2002. Nutrition ingredient in *Solanum nigrum* fruit(野生龙葵果中营养成分的研究)[J]. *J Inner Mongolia Agric Univ*(内蒙古农业大学学报),23(1):98-100
- Ran Y,Murray BG,Hammitt KRW. 1999. Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and in situ hybridization[J]. *Euphytica*,106:139-147
- Ren N, Song YC, Bi XZ, et al. 1997. The physical location of genes *cdc2* and *prh1* in Maize (*Zea mays*) [J]. *Hereditas*,126(3):211-217
- Tandon SL,Rao GR. 1996. Inter relationship within the *Solanum nigrum* complex[J]. *Indian J Genetics Plant Breeding*,26(2):130-141
- Wang ZY,Second G,Tanksley SD. 1992. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs[J]. *Theor Appl Genet*,83:565-581
- Xu J(徐进),Chen TH(陈天华). 1997. Application of fluorescent (下转第 657 页 Continue on page 657)

- Chen X(陈训), Wu HM(巫华美). 1990. Karyotype analysis of *Cycas guizhouensis* (贵州苏铁核型分析)[J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 7(8): 45—48
- Dong CX(董彩霞), Zhou JM(周健民), Fan XH(范晓晖). 2004. Effects of different ways of casupplements on the cacontent and forms in mature fruits of tomato(不同施钙措施对番茄果实钙含量和钙形态的影响)[J]. *Plant Nutrition Fertilizer Sci* (植物营养与肥料学报), 10(1): 91—95
- Furuichi T, Cunningham KW, Muto SA. 2001. Putative twopore channel AtTPC1 mediates Ca^{2+} flux in Arabidopsis leaf cells [J]. *Plant Cell Physiol*, 42: 900—905
- Guan JF(关军锋), Li GM(李广敏). 2001. The relationship between Ca^{2+} and drought resistance in plants(Ca^{2+} 与植物抗旱性的关系)[J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 18(4): 473—478
- Hepler PK. 2005. Calcium, a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell*, 17: 2 142—2 155
- Hetherington AM, Brownlee C. 2004. The generation of Ca^{2+} signals in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 401—427
- Hirschi KD. 2004. The calcium conundrum, both versatile nutrient and specific signal. *Plant Physiol* 136: 2 438—2 442
- Liu JF(刘剑锋), Peng SA(彭抒昂), Cheng YQ(程云清). 2007. Studies on calcium transportation and its movement in pear fruit (梨果各部分(皮、肉、核)钙运转动态的研究初报)[J]. *Guihaia* (广西植物), 27(2): 240—243
- Liao Y(廖颖), Wu BH(伍炳华). 2001. The acquirement of stress response characteristics and signal transduction in plants(植物抗逆性的获得与信号传导)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 37(1): 71—75
- Long MH(龙明华), Tang XF(唐小付), Yu WJ(于文进). 2005. Effects of different calcium levels on photosynthesis and protective enzyme activities of melon leaves(不同钙素水平对厚皮甜瓜叶片光合和酶活性的影响)[J]. *Guihaia* (广西植物), 25(1): 77—82
- Shang ZL(尚忠林), Sun DY(孙大业). 2002. Calcium channels in plant cells(植物细胞内的钙通道)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 38(6): 625—630
- Luo ZQ(罗在柒), Yi Y(乙引). 2006. Study on the physiological adaptability of *Taxiphyllum taxiramenum* fleisch under water stress(喀斯特适生植物鳞叶蕨水分生理适应性研究)[J]. *Guizhou Fore Sci Tech* (贵州林业科技), 34(3): 29—32
- Ma JJ(马建军), Zhang LB(张立彬), Yu FM(于凤鸣). 2007. Contents and distribution of different forms of calcium in *prunus humilis* (野生欧李果实中不同形态钙的含量及分布)[J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 34(3): 755—759
- Ohat Y, Yamamoto K, Deguchi M. 1970. Mhemical fractionation of calcium in the fresh leaf blade and influences of deficiency or over supply of calcium and age of leaf on the content of each calcium fraction[J]. *Soil Manure Japan*, 41: 19—26
- Qu LH(屈良鹤), Yu XQ(余小强), Shi SH(施苏华), et al. 1991. Molecular evidence for the status of the cycad *Cycas revoluta* in seed-plant evolution(苏铁种子植物进化中的位置: 分子生物学证据)[J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni* (中山大学学报(自然科学版)), 3(1): 72—75
- Shigaki T, Hirschi KD. 2006. Dicerse functions and molecular properties emerging for CAX cation/ H^{+} exchangers in plants [J]. *Plant Biol*, 8: 419—429
- White PJ, Broadley MR. 2003. Calciu in plants[J]. *Ann Bot*, 92: 487—511
- Xiao LQ, Ge XJ, Gong X. 2004. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae) [J]. *Annals Bot*, 94: 133—138
- Zhang HC(张和臣), Yin WL(尹伟伦), Xia XL(夏新莉). 2007. The Mechanism of Ca^{2+} Signal Transduction under Abiotic Stresses in Plants(非生物逆境胁迫下植物钙信号转导的分子机制)[J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 24: 114—122
- Zhou W(周卫), Wang H(汪洪), Zhao LP(赵林萍). 1999. Study on characteristics of calcium uptake by young fruit of apple (*Malus pumila*) and Its regulation by hormone(苹果幼果钙素吸收特性与激素调控)[J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 32(3): 52—58

(上接第 602 页 Continue from page 602)

- banding in cytological research of Pinaceae(荧光显带在松科植物细胞学研究中的应用)[J]. *World Fore Res* (世界林业研究), (3): 18—22
- Xu XF(徐秀芳), Zhang HY(张海洋), Yuan QH(袁秋红), et al. 2004. Studies on chromosome of three types of *Solanum nigrum* in China(中国龙葵复合种三类型的染色体数目研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), 24(6): 544—545
- Yang DK(杨德奎), Zhou JY(周俊英), Miao MS(苗明升), et al. 1996. A study chromosome of *Solanum nigrum* (龙葵的染色体研究)[J]. *Shandong Sci* (山东科学), 9(1): 70—71
- Yang YN(杨永年), Zhang HY(张海洋), Wu GY(吴国宜). 1994. The cytological analyses and studies of geographic distribution in *Solanum nigrum* complex of China(中国龙葵复合种细胞学分析和地理分布的研究)[J]. *Bull Bot Res* (植物学研究), 14(2): 205—213
- Zhang HY(张海洋), Jiang XJ(姜祥君), Dong XW(董锡文), et al. 1999. Numerical taxonomic studies on *Solanum nigrum* in China(中国龙葵数值分类研究)[J]. *Bull Bot Res* (植物学研究), 19(2): 127—131
- Zhang HY(张海洋), Xu XF(徐秀芳), Zhang JF(张菊芬). 2004. Nutrition ingredient and exploitation of *Solanum nigrum* (龙葵的营养成分及其开发利用)[J]. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 23(1): 44—46