

DOI:10.11937/bfyy.201602029

瓠瓜基因组测定

吴新义, 徐 沛, 吴晓花, 汪宝根, 鲁忠富, 李国景

(浙江省农业科学院 蔬菜研究所, 浙江 杭州 310021)

摘 要:以 4 份来自中国不同地区的瓠瓜(*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.) 纯系为试材, 采用流式细胞术测定其基因组大小。结果表明: 6 种细胞核裂解液对瓠瓜嫩叶进行处理, 发现 Otto I 最适合瓠瓜细胞裂解; 从 5 种候选内标作物中筛选出水稻日本晴(*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) 为最适内标作物; 4 份中国瓠瓜种质资源的基因组大小为 329.11~344.56 Mb。

关键词:瓠瓜; 基因组; 流式细胞术; 水稻

中图分类号:S 642.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)02-0110-03

瓠瓜(*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.) 属葫芦科(Cucurbitaceae) 葫芦属(*Lagenaria*), 又名瓠子、长瓜、蒲瓜、夜开花、葫芦等。瓠瓜起源于非洲, 随后可能在亚洲和非洲得到独立驯化, 目前在全世界各地均有种植^[1-2]。瓠瓜雌雄异花同株, 其果实形状变异很大^[3]。瓠瓜成熟果可作容器、乐器或工艺品; 瓠瓜也是传统的药用植物, 其蔓、须、叶、花、子、壳均可入药^[1]。近年来瓠瓜常作为黄瓜、西瓜等作物嫁接用砧木, 以增强后者的抗病性^[4]。在我国瓠瓜栽培已经有 7 000 多年的历史, 主要以嫩果做蔬菜用, 是我国南方地区重要的瓜类蔬菜作物之一。

瓠瓜为同源二倍体植物, 染色体数目为 $2n=2x=22$ ^[5]。由于缺乏基因组信息, 瓠瓜分子生物学研究远落后于黄瓜、西瓜、甜瓜等其它葫芦科作物。随着测序技术的发展和测序成本的大幅降低, 使得对瓠瓜等我国传统特色蔬菜作物进行全基因组测序成为可能。评估一个物种基因组大小是对该物种进行全基因组测序的前提, 基于该物种的基因组大小信息, 可以估算测序成本, 并为基因组文库构建、测序深度和基因组组装提供理论依据。基因组大小是指一个物种单倍体核的 DNA 含量, 常用质量(pg) 和碱基对的数目(Mb) 来量化, $1 \text{ pg}=978 \text{ Mb}$ 或 $1 \text{ Mb}=1.022 \times 10^{-3} \text{ pg}$ ^[6]。目前测定基因组大小的

方法通常有 2 种, 即 Feulgen 分光光度法和流式细胞术。流式细胞术由于高效、准确等优点, 目前被广泛应用于测定物种的基因组大小^[7]。现以 4 份中国瓠瓜种质资源为材料, 采用流式细胞术测定其基因组大小, 以期对瓠瓜分子生物学研究提供理论参考。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

以 4 份来自中国不同地区的瓠瓜纯系作为供试材料, 编号为 J7③、I77①、G8-2①、G6-3-5②; 水稻(日本晴)、番茄、黄瓜、甜瓜、萝卜作为候选内标。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞核裂解液配方 6 种细胞核裂解液配方见表 1, 裂解效果最高的将用于流式细胞术试验。

1.2.2 样品处理及 DNA 特异性染色 选择 1 cm^2 大小的瓠瓜嫩叶组织置于培养皿上, 加入 1 mL 的细胞核裂解液, 用锋利的刀片迅速将其切碎, 用 400 目的尼龙网过滤除去悬浮物, $5\ 000 \text{ r/min}$ 离心 2 min, 弃去上清液后再次离心, 用移液器将多余的上清液吸走, 加入 200 μL 的碘化丙啶溶液(BD Biosciences), 反复吸打后制成细胞核悬浮液备用, 整个过程均在冰上操作。采用同样的方法获得内标作物的细胞核悬浮液备用。

1.2.3 基因组大小的测定与计算 采用 BD FACSCalibur 流式细胞仪进行基因组大小测定。设定参数为: 488 nm 蓝光激发, 收集 FL2 通道的荧光, 检测 PI 的发射荧光强度。每个样本至少收集 1 万个细胞, 每个样品重复测定 3 次。

1.3 项目测定

样本基因组大小计算采用 DOLEŽEL 等^[8] 的公式计算, 即: 样品基因组大小 = 内标基因组大小 \times (样品 2C DNA 峰值 / 内标 2C DNA 峰值)。

第一作者简介:吴新义(1984-), 男, 河南南阳人, 博士, 助理研究员, 研究方向为瓠瓜和豇豆基因组学及分子育种。E-mail: wuxinyi@mail. zaas. ac. cn.

责任作者:李国景(1966-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为蔬菜育种与栽培技术。E-mail: ligj@mail. zaas. ac. cn.

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY14C150004); 浙江省农业新品种选育重大科技专项资助项目(2012C12903)。

收稿日期:2015-10-08

表 1 6 种细胞核裂解液配方

裂解液 Isolation buffer	配方 Component	参考文献 Reference
Otto I	0.1 mol/L citric acid, 0.5% (v/v) Tween 20	[8]
Galbraith's	20 mmol/L MOPS, 45 mmol/L MgCl ₂ · 6H ₂ O, 30 mmol/L sodium citrate, 0.1% Triton X-100, pH 7.0	[9]
Chopping	44.8 mmol/L MgCl ₂ , 46 mmol/L citric acid, 20 mmol/L MOPS, 0.1% Triton X-100, 50 μg/mL RNaseA	[9]
LB01	15 mmol/L Tris, 2 mmol/L Na ₂ EDTA, 0.5 mmol/L spermine · 4HCl, 80 mmol/L KCl, 20 mmol/L NaCl, 0.1% Triton X-100, 15 mmol/L β-巯基乙醇, pH 7.5	[8]
GPB	0.5 mmol/L spermine · 4HCl, 30 mmol/L sodium citrate, 20 mmol/L MOPS, 80 mmol/L KCl, 20 mmol/L NaCl, 0.5% (v/v) Triton X-100, pH 7.0	[10]
Solution A	MgSO ₄ Buffer, (10 mmol/L MgSO ₄ · 7H ₂ O, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L HEPES, pH 8.0), 10% (w/v) Triton X-100, 1 mg/mL DTT	[11]

1.4 数据分析

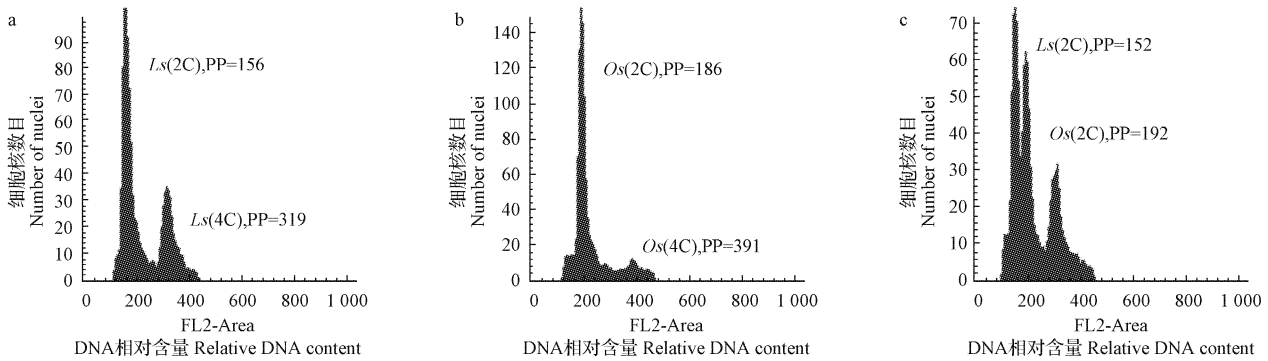
利用流式细胞仪自带软件(CellQuest Pro Analysis)分析和处理所得的图像和数据。

2 结果与分析

2.1 细胞核裂解液选择

根据 6 种细胞核裂解液制备的细胞核悬浮液在流

式细胞仪上显示的 DNA 峰图, Otto I 的裂解效果最好(图 1a、b), 获得的 2C 和 4C DNA 峰清晰可见, 峰图质量高而且同一材料的重复性较好。Galbraith's Buffer 和 LB01 的效果次之, 其余裂解液的效果均较差, 说明 Otto I 是最适合瓠瓜进行流式细胞术研究的细胞核裂解液。



注: a, 单独的瓠瓜样品; b, 单独的水稻样品; c, 瓠瓜和水稻的混合样品。

Note: a, Bottle gourd sample; b, Rice sample; c, Mixed samples of bottle gourd and rice.

图 1 部分分离后的细胞核的相对荧光含量(相对 DNA 含量)

Fig. 1 Relative fluorescence intensities (relative DNA content) of isolated plant nuclei

2.2 内标选择

采用 Otto I 裂解液, 测得瓠瓜、番茄、水稻、黄瓜、萝卜、甜瓜的 2C DNA 峰值分别为 161.5、438.0、214.5、184.5、299.0、217.0。从峰值的位置来看, 番茄与瓠瓜的 2C DNA 峰值相距较大, 可能增大最终的计算误差; 黄瓜与瓠瓜的 2C DNA 峰值有重叠, 表明二者混合后可能无法区分; 萝卜与瓠瓜的 2C DNA 峰值能够清楚地分开, 但与瓠瓜的 4C DNA 峰值可能有重叠; 水稻和甜瓜与瓠瓜的 2C DNA 峰值既能清楚地分开, 位置相距又不大(图 1c), 因而最适宜做为瓠瓜基因组测定的内标。

2.3 瓠瓜基因组大小计算

该研究选择水稻作为内标作物测定瓠瓜的基因组大小, 水稻的基因组大小约为 430 Mb^[12], 其 2C DNA 峰值平均为 195.31, 瓠瓜的 2C DNA 峰值平均为 151.85, 根据水稻和瓠瓜的峰值的倍数关系, 计算出瓠瓜的基因组大小约为 329.11~344.56 Mb, 且材料间基因组大小差异并不显著(表 2)。

表 2 瓠瓜基因组大小测定结果

Table 2 Results of genome size of bottle gourd

品种 Variety	瓠瓜峰值位置 Peak position of bottle gourd	水稻峰值位置 Peak position of rice	二者比值 Ratio	瓠瓜基因组大小 Genome size of bottle gourd/Mb	平均值 Mean value
J7③	1	148	0.762 9	328.05	329.11
	2	149	0.772 0	331.96	
	3	153	0.761 2	327.32	
I77①	1	156	0.757 3	325.64	333.72
	2	162	0.775 1	333.29	
	3	156	0.795 9	342.24	
G8-2①	1	161	0.851 9	366.32	344.56
	2	147	0.790 3	339.83	
	3	147	0.761 7	327.53	
G6-3-5②	1	157	0.773 4	332.56	332.96
	2	144	0.757 9	325.90	
	3	152	0.791 7	340.43	

3 讨论

该研究确定以水稻作为内标, 测定了 4 份中国瓠瓜的基因组大小, 为瓠瓜的全基因组测序及基因组学

研究提供了基础数据。在流式细胞术分析中,样品前处理至关重要,其中合适的细胞核裂解液起着关键的作用。ACHIGAN-DAKO 等^[13]曾使用 Galbraith's Buffer 测定瓠瓜基因组大小,该研究通过比较 6 种细胞核裂解液对瓠瓜嫩叶的处理效果,发现 Otto I 比 Galbraith's Buffer 的效果更好,不仅峰图质量高,而且不同材料间稳定性最强。在细胞核悬浮液的制备及染色上,传统的做法是对离心收集到的细胞核再次加入细胞核裂解液,制成细胞核悬浮液,然后加入染料染色 20~120 min^[14-15],该研究对离心收集到的细胞核加入 PI 染色液制成细胞核悬浮液,直接上机进行测定,与传统方法相比,节省了染色的时间,而且能最大限度的保持细胞核的完整性,使得测定结果更为准确。

在该研究中,通过比较瓠瓜与番茄等其它 5 种作物的 2C DNA 峰图,认为水稻和甜瓜的 DNA 峰与瓠瓜差距不大且能清楚地区分,因而适合作为内标。水稻品种“日本晴”是已经测序且序列组装质量较高的品种,其基因组序列和大小得到了深入的研究,以该品种作为内标可以确保瓠瓜基因组大小测定的准确性。ACHIGAN-DAKO 等^[13]曾以萝卜为内标,利用流式细胞仪测定非洲和美洲瓠瓜的 2C DNA 含量为 0.683~0.776 pg,对应基因组大小约为 333~379 Mb,该研究还发现不同材料间的基因组大小存在 12% 的变异。该研究测定的瓠瓜基因组大小为 329.11~344.56 Mb,尽管使用的内标不一样,但 2 份独立的试验获得的结果较为一致。

(致谢:感谢浙江大学张宪银和李梅在细胞核提取液选择、试验方法优化方面提供的帮助。)

参考文献

- [1] HEISER C B. The gourd book; A thorough and fascinating account of gourds from throughout the world[M]. Norman; University of Oklahoma Press, 1979.
- [2] ERICKSON D L, SMITH B D, CLARKE A C, et al. An asian origin for a 10 000-year-old domesticated plant in the Americas[J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102: 18315-18320.
- [3] XU P, XU S Z, WU X H, et al. Population genomic analyses from low-coverage RAD-Seq data; a case study on the non-model cucurbit bottle gourd[J]. The Plant Journal, 2014, 177: 430-442.
- [4] YETISIR H, SARI N. Effect of different rootstock on plant growth, yield and quality of watermelon[J]. Aust J Exp Agric, 2003, 43: 1269-1274.
- [5] BEEVY S S, KURIACHAN P. Chromosome numbers of south Indian Cucurbitaceae and a note on the cytological evolution in the family[J]. J Cytol Genet, 1996, 31: 65-71.
- [6] DOLEŽEL J, BARTOŠ J, VOGLMAYR H. Nuclear DNA content and genome size of trout and human[J]. Cytometry A, 2003, 51: 127-128.
- [7] DOLEŽEL J, GREILHUBER J, SUDA J. Flow cytometry with plants: an overview. In Flow Cytometry with Plant Cells[M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2007: 41-65.
- [8] DOLEŽEL J, GREILHUBER J, SUDA J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry[J]. Nature Protocols, 2007(2): 2233-2244.
- [9] GALBRAITH D W, HARKINS R K, MADDOX M J, et al. Rapid flow cytometry analysis of the cell cycle in intact plant tissues[J]. Science, 1983, 220: 1049-1051.
- [10] LOUREIRO J, RODRIGUEZ E, DOLEŽEL J, et al. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry; a test with 37 species[J]. Annals of Botany, 2007, 100: 875-888.
- [11] ARUMUGANATHAN K, EARLE E D. Nuclear DNA content of some important plant species[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1991(3): 208-218.
- [12] YU J, HU S N, WANG J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) [J]. Science, 2002, 296: 79-92.
- [13] ACHIGAN-DAKO E, FUCHS J, AHANCHEDE A, et al. Flow cytometric analysis in *Lagenaria siceraria* (Cucurbitaceae) indicates correlation of genome size with usage types and growing elevation[J]. Plant Syst Evol, 2008, 276: 9-19.
- [14] 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.
- [15] 李祯, 伊贤贵, 顾宇, 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(S1): 17-19.

Estimation of Genome of Bottle Gourd

WU Xinyi, XU Pei, WU Xiaohua, WANG Baogen, LU Zhongfu, LI Guojing

(Institute of Vegetables, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021)

Abstract: Taking four Chinese bottle gourds from different areas as material, flow cytometry was used to determine the genome size of bottle gourd. The results showed that the treatment effect of 6 nuclei isolation buffers was compared and Otto I was found as the best buffer for bottle gourd; the rice variety Nipponbare was selected as the optimal internal standard from 5 candidate crops; the genome size of 4 Chinese bottle gourd germplasm was about 329.11—344.56 Mb.

Keywords: bottle gourd; genome; flow cytometry; rice