

陇东野生紫花苜蓿的核型分析

张雪婷¹, 师尚礼¹, 张小甫²

(¹甘肃农业大学草业学院/草业生态系统教育部重点实验室/中美草地畜牧业可持续发展研究中心, 兰州 730070)

(²中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所/农业部兰州黄土高原生态环境重点野外科学观测试验站, 兰州 730050)

摘要: 采用 0.15% 秋水仙素和 0.002mol/L 8-羟基喹啉的混合液对陇东野生紫花苜蓿萌发种子的根尖预处理 3h, 室温条件下用 1% 果胶酶和 1% 纤维素酶酶解 1.5h 得到清晰染色体制片。核型分析结果显示, 陇东野生紫花苜蓿染色体数目为 32 条, 具有 1 对随体, 为 2B 核型, 染色体核型组成公式为 $2n = 32 = 30m(2SAT) + 2sm$, 染色体长度组成公式为 $2n = 2L + 18M2 + 8M1 + 4S$ 。

关键词: 紫花苜蓿; 野生; 核型分析

Karyotype Analysis in *Wild Medicago sativa* L.

ZHANG Xue-ting¹, SHI Shang-li¹, ZHANG Xiao-fu²

(¹College of Grassland Science, Gansu Agricultural University/Key Laboratory of Grassland Ecosystem/Sino-U. S. Center for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070; ²Lanzhou Institute of Animal and Veterinary Pharmaceuticals Sciences, CAAS/Lanzhou Scientific Observation & Experiment Field Station for Ecological System in Loess Plateau Areas Ministry of Agriculture, Lanzhou 730050)

Abstract The chromosome flaking of root tip on geminate seed in wild *Medicago sativa* L. can be made clearly, which were pretreated by the mixture of 0.15% colchicine and 0.002mol/L 8-hydroxyquinoline for 3h, and then enzymolysed by 1% cellulase+1% pectinase for 1.5h at 25°C. The result of karyotype analysis shows that the total of chromosome in wild *Medicago sativa* L. is 32 with a pair of satellites. The karyotype of such species is 2B type and the karyotype formulation is $2n = 32 = 30m(2SAT) + 2sm$, the length construction is $2n = 2L + 18M2 + 8M1 + 4S$.

Key word: *Medicago sativa* L.; Wild Karyotype analysis

陇东野生紫花苜蓿 (*wild Medicago sativa* L.) 分布于甘肃清水、定西半阴湿山脚地带, 耐寒冷, 成年株耐低温^[1]。根系入土深度较浅, 一般达 70~100 cm, 无主根, 水平或斜生的根位于土表下 20~25 cm 深处, 伸长可达 1m。根上产生的分蘖芽多集中在地下 15 cm 内, 淡白色, 数量约为 10~20 个。在适宜条件下分蘖芽可向地面生长发育成地上枝条。其地上茎平卧或斜生, 基本依附地面生长, 与地面夹角呈 0~20°, 且分枝能力强。根据美国 H. T. 哈特曼和 D. E. 凯斯特所著的《植物繁殖原理和技术》^[2]

和内蒙古农业大学王立群等人提出的根划分原则^[3], 陇东野生紫花苜蓿根系属根茎型。

染色体是生物体内主要的遗传物质, 具有储存和传递遗传信息的功能, 不同物种染色体核型的差异反映了物种遗传进化上的基本特征^[4]。本试验试图通过对陇东野生紫花苜蓿染色体数目及核型的研究, 为其资源鉴定、保存和利用提供细胞学依据。

收稿日期: 2010-05-16 修回日期: 2010-09-08

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划 (2006BAD04A04-03, 2007BAD52B06); 农业部公益行业 (农业) 科研专项 (nyhyzx07-022)

作者简介: 张雪婷, 硕士。E-mail: zhuxueting0225@yahoo.cn

通讯作者: 师尚礼, E-mail: shishl@gsau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

材料为陇东野生紫花苜蓿, 种子采集于 2008 年 8 月, 甘肃清水地区的半阴湿区山脚地带。

1.2 方法

1.2.1 预处理 取饱满的种子, 用蒸馏水浸泡 12h 后, 在 28℃ 恒温条件下培养。当胚根长至 1.0~1.5cm 时, 依次用 0.1%、0.15%、0.2% 秋水仙素与 0.002mol/L 8-羟基喹啉的混合液^[5-6]非离体处理 3h、4h。

1.2.2 固定 将材料取出并用蒸馏水冲洗, 用卡诺固定液于 4℃ 冰箱中固定 24h。

1.2.3 酶解 将固定好的材料用蒸馏水冲洗 10min 后, 于室温下以 1% 果胶酶 + 1% 纤维素酶分别酶解 1.5h 和 2h^[5-7]。酶解后以卡诺固定液再固定 30min。

1.2.4 染色和压片 挑取根尖乳白色分生组织置于载玻片上, 并切成 1mm 薄的切片, 滴加 1 滴染液染色 4~5min, 盖上盖玻片, 在酒精灯火焰上微微烘烤后, 用带橡皮头的铅笔以适当的力度敲打盖玻片^[5-8], 压片。

1.3 数据处理

选取最佳“预处理-酶解”组合中 50 个染色体分散良好的中期分裂相, 用 Olympus-DP70 倒置显微镜拍照, 从中选出染色体形态清晰、伸展较好的 10 个细胞^[5], 借助 Olympus 测量软件进行染色体长短臂实际值的测量。染色体相对长度、染色体长度比和臂比以 Levan^[9]提出的公式计算。

$$\text{染色体长度比} = \frac{\text{最长染色体长度}}{\text{最短染色体长度}}$$

$$\text{臂比} = \frac{\text{长臂}}{\text{短臂}}$$

染色体长度系数 (IRL) 和染色体长度类型以 Stebbins^[10-11]提出的标准计算和分类。

$$\text{IRL} = \frac{\text{染色体长度}}{\text{全组染色体平均长度}}$$

核型不对称系数 (Ask%) 及核型类型以 Ararano^[12]标准计算和划分。

$$\text{Ask\%} = \frac{\text{长臂总长}}{\text{染色体组总长度}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 药剂浓度和处理时间对中期清晰分裂相数目的影响

预处理混合液中秋水仙素有 3 种浓度, 每种浓度分别处理 3h、4h, 再依次酶解 1.5h、2h 故该试验共有 12 个处理组合。将每个处理组合对应的中期清晰分裂相百分比作图 1, 由图可知: ①用 0.15% 秋水仙素预处理混合液预处理 3h 酶解 1.5h 所得的中期清晰分裂相最多, 占计数细胞的 78%; ②酶解 1.5h, 无论预处理时间为 3h 或 4h, 0.15% 秋水仙素预处理混合液的处理效果最佳, 0.1% 浓度次之, 0.2% 浓度最差; 同时, 在此酶解时间下, 无论秋水仙素预处理混合液的浓度为 0.1%、0.15% 或 0.2%, 预处理 3h 所得的中期清晰分裂相均多于 4h; ③不考虑秋水仙素浓度和预处理时间, 酶解 1.5h 得到的中期清晰分裂相较多, 占计数细胞的 16%~78%, 而酶解 2h 仅能得到不足 4% 的中期清晰分裂相。

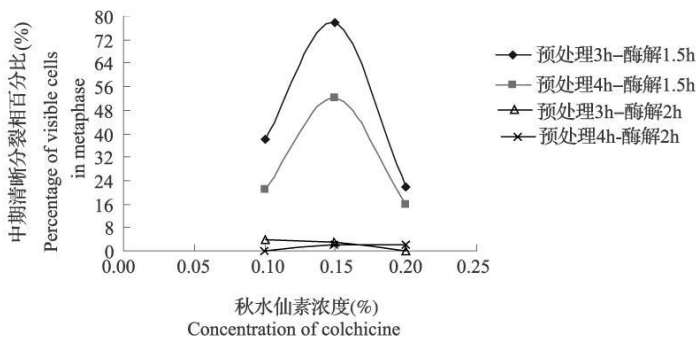


图 1 药剂浓度及处理时间对中期清晰分裂相数目的影响

Fig 1 Chemical concentration and treatment time impact on the metaphase cells

综合上述, 秋水仙素混合液浓度的高低、预处理和酶解时间的长短, 均对试验材料的染色体制片有所影响。本试验筛选出的染色体制片最佳药剂处理

组合为 0.15% 秋水仙素预处理混合液预处理 3h 酶解 1.5h。

2 2 染色体数目

对最佳药剂处理组合所得的 78% 中期清晰分裂相进行染色体数目统计, 在 39(50 × 78%) 个中期清晰分裂细胞中, 有 82. 05% 的细胞染色体数目为 32 条, 有 10. 35% 的细胞染色体数目为 30 条, 有 7. 60% 的细胞染色体数目为 28 条。依据“绝大多数细胞的染色体数目为研究材料的染色体数目”^[13-14], 陇东野生紫花苜蓿共有 32 条染色体(图 2)。

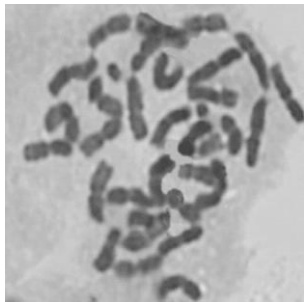


图 2 陇东野生紫花苜蓿染色体照片

Fig 2 The chromosomes of wild*M edicago sativa* L.

2 3 核型参数

陇东野生紫花苜蓿, 由 15 对中部着丝点 (m) 和 1 对亚中部着丝点 (sm) 染色体组成, 具有 1 对随体, 位于第 2 对染色体上(图 3), 除第 5 对为亚中部着丝点染色体 (sm), 其余均为中部着丝点 (m) 染色体, 其核型公式为 $2n= 32= 30m(2SAT) + 2sm$ 。陇

表 1 陇东野生紫花苜蓿的核型参数

Table 1 Karyotype parameters of wild*M edicago sativa* L.

染色体编号 Chromosome No	相对长度 (%) Relative length			臂比 Arm Ratio	着丝点类型 Type of centromer	相对长度指数 I R L	染色体 长度类型 Type of length
	短臂 Short arm	长臂 Long arm	全长 Total				
1	3. 50	4. 84	8. 34	1. 38	m	1. 33	L
2	3. 50	4. 02	7. 52	1. 15	m*	1. 20	M 2
3	3. 12	4. 33	7. 45	1. 39	m	1. 19	M 2
4	3. 22	3. 86	7. 08	1. 20	m	1. 13	M 2
5	2. 24	4. 81	7. 05	2. 14	sm	1. 12	M 2
6	2. 76	4. 17	6. 93	1. 51	m	1. 10	M 2
7	3. 25	3. 59	6. 84	1. 10	m	1. 09	M 2
8	3. 15	3. 36	6. 75	1. 07	m	1. 08	M 2
9	3. 07	3. 54	6. 61	1. 15	m	1. 05	M 2
10	2. 82	3. 65	6. 47	1. 30	m	1. 03	M 2
11	2. 89	3. 16	6. 05	1. 09	m	0. 96	M 1
12	2. 71	2. 76	5. 47	1. 02	m	0. 87	M 1
13	2. 26	3. 09	5. 36	1. 37	m	0. 85	M 1
14	1. 93	3. 19	5. 16	1. 65	m	0. 82	M 1
15	2. 00	2. 10	4. 10	1. 05	m	0. 65	S
16	1. 45	1. 87	3. 33	1. 29	m	0. 53	S

* 带有随体的同源染色体组; 随体不计入臂长

Homologous chromosome group with satellites marked * ; Satellites were not summed up to the arm length

东野生紫花苜蓿的染色体长度可分为 4 个类型, 第 1 对染色体为长染色体、L 型, 第 2~ 10 对为中长染色体、M 2 型, 第 11~ 14 对为中短染色体、M 1 型, 第 15、16 对为短染色体、S 型, 故染色体长度组成公式为 $2n= 2L+ 18M 2+ 8M 1+ 4S$ 。染色体相对长度变异范围在 3. 33~ 8. 34。染色体平均相对长度为 6. 25。染色体臂比变化范围在 1. 02~ 2. 14, 臂指数 NF 为 32。最长染色体与最短染色体的长度比为 2. 50。臂比大于 2: 1 染色体所占比例为 0. 06。核型不对称系数 $A s k\%$ 为 56. 35%, 核型属于 2B。具体核型参数见表 1。

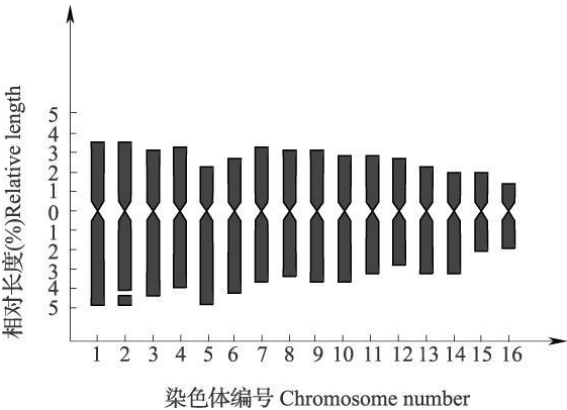


图 3 核型模式图

Fig 3 Idiogram of wild*M edicago sativa* L.

3 结论与讨论

3.1 制片技术

由图 1 可知,秋水仙素混合液浓度的高低和预处理时间的长短皆对制片有所影响。当浓度高至 0.2%, 所得的中期清晰分裂相数目低于浓度为 0.15%、0.1% 时的数目, 这可能因为高浓度的秋水仙素会使组成染色体分子的螺旋排列结构更为紧密, 从而使染色体过分缩短变粗^[5, 15-16]。与此同时, 预处理时间越长, 染色体收缩越剧烈, 严重时缩成一点, 无法计数。而秋水仙素混合液对材料进行低浓度短时间处理, 虽然也能得到中期清晰分裂相, 但数量不多, 如 0.1% 秋水仙素混合液预处理 3h 酶解 1.5h 的处理组合, 仅能得到 16% 的中期清晰分裂相。这可能因为分裂中期的染色体由纺锤丝牵连, 集于细胞的赤道面, 而低浓度短时间的药剂处理, 也许会对维管蛋白组成纺锤丝的这一过程抑制不充分, 使诸多同源染色体弯曲重叠, 不易分散, 以致无法观察^[5-6]。故选择适当的药剂浓度和预处理时间对染色体制片至关重要。

酶解 2h 所得的中期清晰分裂相数目远低于酶解 1.5h 的数目, 最高时仅有 2 个完整清晰的细胞可供观察, 这可能因为酶解中纤维素酶对细胞壁长时间处理, 使得其中的纤维素消化殆尽, 细胞成为原生质团, 即裸细胞^[5, 17-18]; 同时, 纤维素酶在与果胶酶的共同作用下, 细胞进一步分崩溃散, 以致无法找到染色体。

3.2 种属关系

大多数苜蓿属植物的染色体为 $2n=32$ 的四倍体, 也有 $2n=48$ 的六倍体, 以及 $2n=14$ 和 16 的二倍体^[19]。国内对于野生苜蓿的报道较为少见, 张晓红^[20]在野生南苜蓿的核型研究中发现, 其染色体为 $2n=16$ 的二倍体; 张凤仙等^[21]在云南德钦地区野生紫花苜蓿的核型研究中发现, 其染色体为 $2n=32$ 的四倍体; 与此同时, 我国登记在册的野生黄花苜蓿也为 $2n=32$ 的四倍体^[22]。通过分析陇东野生紫花苜蓿的染色体结构, 发现其染色体数目与大多数紫花苜蓿相同, 也为 $2n=32$ 的四倍体, 且核型组成、长度组成等核型参数均属于紫花苜蓿的染色体核型特征, 但因根系形态有别于其他苜蓿, 故该野生材料可能是一变种。这种不同于其他材料的特性可能受环境影响所致。当环境发生改变时, 原始苜蓿种经有性繁殖, 通过基因重组产生适应环境的变异新个体^[23], 待环境逐渐稳定, 这些变异新个体通过营养

繁殖的方式(即根茎繁殖)扩大分布范围, 以占据有利生态位^[24], 进化成积极适应环境变化的新变种。

3.3 核型进化程度

从近几年我国学者对紫花苜蓿核型的报道中了解到: 南苜蓿的核型为 1A 型^[20]; 阿尔岗金、WL-232HQ、中苜一号和四季旺紫花苜蓿的核型皆为 2A 型^[20, 25]; 伊犁、扭果苜蓿的核型为 3A 型^[22]; WL-323ML 苜蓿的核型为 2C 型^[25]。而本研究发现, 陇东野生紫花苜蓿的核型为 2B 型。根据 Stebbin 提出的核型进化标准^[10], 核型进化高低依次是: $2C > 2B > 3A > 2A > 1A$ 。这说明南苜蓿的核型最为原始, 其染色体长、短臂的长度差异不大, 染色体最为对称; 相反, WL-323ML 苜蓿的核型最为进化, 其染色体长、短臂的长度相差较大, 染色体最不对称^[10, 26]。由此可知, 核型为 2B 型的陇东野生紫花苜蓿, 染色体较不对称, 属较为进化的核型。

参考文献

- [1] 王亚玲, 师尚礼. 陇东野生紫花苜蓿的生态特性 [J]. 草业科学, 2007, 25(1): 55-58
- [2] H T 哈特曼, D E 凯斯特, 著. 郑开文, 吴应祥, 李嘉乐, 译. 植物繁殖原理和技术 [M]. 北京: 中国林业出版社, 著本 1975 译本 1985
- [3] 王立群, 陈世理. 草地植物根系类型划分原则的探讨 [J]. 内蒙古农业大学学报, 2003, 9(24): 11-12
- [4] 金银根. 植物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2006
- [5] 李懋学, 张赞平. 作物染色体及其研究技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996
- [6] 李贵全. 细胞学研究基础 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2001
- [7] 刘坤, 王省芬, 迟吉娜, 等. 芙蓉葵 (*Hibiscus moscheutos* L.) 有丝分裂核型分析及减数分裂观察 [J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(2): 286-289
- [8] 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰. 植物有丝分裂染色体标本制作的新方法 [J]. 植物学报, 1979, 21(5): 297-298
- [9] Levan A K. Nomenclature for centromere position on chromosome [J]. Hereditas, 1964, 52(3): 20-24
- [10] Stebbins G L. Chromosome evolution in high plants [M]. London Edward Arnold, 1971
- [11] 刘传虎, 张秋平, 姚家玲, 等. 龙须草核型分析和花粉母细胞减数分裂的细胞学研究 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(1): 27-33
- [12] Arano H. Cytological studies in subfamily Carduoideae (Compositae) of Japan IX [J]. Bot Mag (Tokyo), 1963, 76(5): 32-39
- [13] 李润芳, 吕松, 邓瑞宁, 等. 荠菜的花粉母细胞减数分裂及核型分析 [J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(4): 506-510
- [14] 吴玲, 张霞, 马森, 等. 新疆独尾草属植物的核型分析 [J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(6): 541-544
- [15] 张永兵, 陈劲枫, 伊鸿平, 等. 甜瓜有丝分裂染色体制片技术及核型分析 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(9): 1735-1739
- [16] 辛培尧, 萧凤回, 罗思宝. 大麻染色体制片技术 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(1): 94-96
- [17] 杨晓伶, 程丹. 柑橘类植物染色体制片新技术 [J]. 同济大学 (自然科学版), 2005, 33(2): 222-224

(下转第 157 页)

所述方法的特点。

表 4 传统种质数据库组织方法与基于属性分离存储的种质数据组织方法比较

Table 4 Analysis between the traditional and property separation-storage-based germplasm data organization methods

对比项目 Features	传统方法 Traditional method	基于属性分离存储的方法 Property separation-storage-based method
数据表数量	少	多
数据表结构	复杂、结构各异	简单、统一
联合分析	需外部编程支持 ^[1]	数据库管理系统内部运算实现
扩展	每种新作物都需要新建数据表 ^[2]	属性不存在时新建数据表, 新作物无需新建数据表
可迁移性	适用于各类简单/关系数据库管理系统 ^[1-2]	适用于关系数据库管理系统
数据查询时间损耗	单表查询速度快, 多表查询速度慢, 外部程序调用数据库需大量时间	单表/多表查询时间基本一致, 没有外部程序调用损耗

3 讨论

本文充分利用了现代关系数据库的特性, 提出了基于属性分离存储的种质数据组织方法。该方法在保留了传统种质数据组织方法优点^[1-2]的基础上, 可统一数据查询操作, 优化查询过程, 提高分析效率, 具有灵活、可扩展的特点, 能将绝大多数对数据的操作在现在流行的数据库管理系统 (例如 Oracle

或 SQL Server MySQL PostgreSQL 等) 中完成, 可以方便地集成与种质分析相关的数据, 适用于种质资源相关信息系统的建立。

该方法采用了类似数据库纵向分片 (DB vertical partition) 技术, 可以极大提高数据库的数据容量和检索效率, 并能方便地实现基于数据库分片技术的分布式数据库 (Distributed database)^[10]。

该方法已应用于云南及周边地区农业生物资源调查信息系统 (项目编号: 2006FY110700)、中国沿海地区抗逆农作物种质资源调查信息系统和中国作物种质资源信息系统 (CGRIS), 其灵活性、可扩展性、稳定性得到了检验。该方法不仅适用于作物种质数据的组织, 还适用于林木、药用植物、动物和微生物等种质信息的组织。

参考文献

[1] 曹永生, 陈育, 孔繁胜. 中国作物种质资源信息共享网络的建立 [J]. 资源科学, 2001(1): 46-48

[2] 张贤珍, 孔繁胜, 曹永生. 农业数据库系统程序设计 [M]. 北京: 农业出版社, 1991

[3] 张贤珍, 杨克钦, 荣绛平. 农作物品种资源信息处理规范 [M]. 北京: 农业出版社, 1990

[4] 董玉琛, 刘旭. 农作物种质资源技术规范丛书 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007

[5] 陈启才. 查询重写关系数据库查询优化技术 [J]. 电脑编程技巧与维护, 2009(4): 40-42

[6] 曹永生, 张贤珍. 国家种质资源数据库的优异稻种资源信息 [J]. 作物品种资源, 1993(3): 19-21

[7] 胡天磊. 修炼 SQL [J]. 程序员, 2007(3): 52-53

[8] 任永昌, 邢涛, 陈晓纪. 基于关系数据库的模型库系统研究 [J]. 渤海大学学报 (自然科学版), 2008 29(2): 180-184

[9] 王丽华. 关系数据库范式及应用 [J]. 内江科技, 2008 29(7): 117-118

[10] 杨晶, 刘天时, 马刚. 分布式数据库数据分片与分配 [J]. 现代电子技术, 2006 29(18): 119-121

(上接第 153 页)

参考文献

[18] 刘勇, 林刚, 何光源, 等. 两个油菜种的染色体核型分析 [J]. 华中科技大学学报 (自然科学版), 2005 33(3): 119-121

[19] 韩清芳, 贾志宽. 紫花苜蓿种质资源评价与筛选 [M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2004

[20] 张晓红. 南苜蓿和紫花苜蓿染色体的核型分析 [J]. 安徽农学通报, 2009, 15(7): 51-52

[21] 张凤仙, 毕玉芬, 王晓云, 等. 云南野生苜蓿与引进苜蓿的核型分析 [J]. 云南农业大学学报, 2008 23(7): 431-435

[22] 贾纳提维纳汗, 李保军, 郑晓红. 四种豆科牧草的染色体核型分析 [J]. 草业科学, 1996 13(4): 11-13

[23] 聂谷华, 廖亮, 方亮, 等. 国产毛茛属植物五种一变种的核型 [J]. 云南植物研究, 2007 29(3): 316-322

[24] 陈家宽, 杨继. 植物进化生物学 [M]. 武汉: 武汉大学, 1994

[25] 张为民. 四种紫花苜蓿的核型分析 [J]. 山西农业大学学报, 2006 26(1): 73-76

[26] 孙爱群, 向红, 田应洲, 等. 珍珠菜属四种植物的核型分析 [J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 509-512