

# 苜蓿种质间染色体多态性的荧光原位杂交检测

窦全文, 雷云霆, 王海庆

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008)

**摘要:** 利用染色体荧光原位杂交技术(FISH), 将3种重复序列5S rDNA、45S rDNA和C<sub>0</sub>t-1 DNA用不同荧光物进行标记, 对我国10个不同地理来源的苜蓿种质(*Medicago sativa* L.; 2n=4X=32)进行了染色体多态性检测。结果表明, 利用以上重复序列可以较好地将苜蓿32条染色体区分为16对特征不同的染色体, 10份不同种质材料FISH带纹特征表现高度相似, 比较不同种质间同源染色体重复序列杂交特征, 揭示出种质群体内和群体间多态性染色体的存在, 其中不同的同源染色体多态性表现不尽一致, 1号染色体(随体染色体)多态性最高, 10份材料中检出7个多态型, 3、4、15号染色体保守性较强, 在不同种质间表现为单态, 其他染色体多态性居中。对在地理分布上自西向东的10个材料进行染色体多态性比较, 结果显示分布于西藏、新疆以及分布在辽宁的材料部分染色体多态型显著区别于其他材料。

**关键词:** 苜蓿; 荧光原位杂交; 染色体; 多态性

## Chromosome Polymorphism as Detected by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) in Different Alfalfa Germplasm

DOU Quan-wen, LEI Yun-ting, WANG Hai-qing

(Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008)

**Abstract:** A cytological investigation was conducted on the 10 Chinese tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.; 2n=4X=32) germplasm accessions from the different regions using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Three repetitive sequences, 5S rDNA, 45S rDNA, and C<sub>0</sub>t-1 DNA were adopted as FISH probes. The result showed that 32 chromosomes of alfalfa could be characterized as 16 pairs with the above probe combinations, and the FISH patterns among different materials revealed high similarity. Chromosome polymorphisms were uncovered both within and among genotypes. Chromosome 1 (satellite chromosome) with 7 variants showed the highest polymorphism, while 3, 4 and 5 homologue chromosomes were more conserved and monomorphic. Chromosome polymorphisms were compared among 10 alfalfa germplasm accessions from western to eastern regions of China. The result showed that a few of chromosome variants in germplasm accessions from Tibet, Xinjiang, and Liaoning were distinct from those in the others.

**Key words:** Alfalfa; Fluorescence *in situ* hybridization (FISH); Chromosome; Polymorphism

苜蓿是世界上重要的豆科牧草, 由于蛋白质含量高、适口性好、产量高而稳定等特点, 在畜牧业生产中有“牧草之王”之称。苜蓿能有效地进行生物固氮, 是改良土壤的重要植物, 同时它也是一种优良的蜂源植物。作为优良牧草, 苜蓿在我国北方有大规模栽培。在实际生产中利用最广的为多年生生物种紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)、黄花苜蓿(*M. falcata* L.)以

及杂花苜蓿(*M. varia* Maytyn.)等。由于紫花苜蓿、黄花苜蓿以及胶质苜蓿(*M. glurionsa*)、蓝花苜蓿(*M. coerulea*)、杂花苜蓿等可以天然杂交形成杂交后代, Quiros等<sup>[1]</sup>提出这几个种应该合并为一个种, 合称为紫花苜蓿复合体(*M. sativa* L. complex)。

中国是苜蓿属种质资源分布比较丰富的地区之一, 并拥有最具栽培意义的紫花苜蓿种、亚种、变种

及其近缘种的丰富遗传资源<sup>[2]</sup>。在形态学水平<sup>[3]</sup>、生化水平<sup>[4]</sup>以及 DNA 分子标记水平上<sup>[5-6]</sup>,对于我国苜蓿种质资源遗传多样性方面的研究已有不少报道。染色体多态性的揭示是研究遗传多样性的重要资料,但是有关在细胞遗传水平上揭示苜蓿遗传变异的报道较少,即使有一些报道也仅限于从染色体常规核型比较进行研究。栽培苜蓿为同源四倍体( $2n=4X=32$ ),染色体数目多、比较小、而且形态上比较相似,以及其同源四倍体特性使得苜蓿细胞学研究落后于其他作物。染色体分带技术作为更加深入揭示染色体特征的一种细胞学方法,曾有效应用于苜蓿染色体分析<sup>[7]</sup>。虽然染色体分带技术能有效揭示组成性异染色质在染色体上的分布情况,但是无法确定异染色质组成的成分,即使一些染色体具有相似带纹分布,也不能保证它们具有相同的来源。染色体荧光原位杂交技术(*Fluorescence in situ hybridization*, FISH)是 20 世纪发展起来的一种新型分子细胞学技术,利用标记的特定重复序列,可以稳定、可靠地进行染色体的识别。利用 FISH 技术进行特定物种染色体鉴定的基础是必须掌握该物种中存在的一些串联重复序列的信息。编码 5S rRNA 和 45S rRNA 的基因在高等植物中普遍以重复序列的形式存在,而且在不同物种间序列上具有一定的保守性,同时由于在同一物种中,这两种基因位点的数量和分布具有一定的保守性,因此 5S rDNA 和 45S rDNA 常用来作为物种进化分析的细胞学标记<sup>[8]</sup>。 $C_0t-1$  DNA 是植物基因组中高度和中度重复序列部分,利用较大片段克隆的探针如 BAC 和 YAC 进行染色体原位杂交时, $C_0t-1$  DNA 常被作为封阻 DNA 使用。将  $C_0t-1$  DNA 标记为探针对不同近缘物种基因组进行 FISH 分析,可以为基因组进化关系提供新的证据<sup>[9]</sup>。

本研究利用标记的 5S rDNA、45 rDNA 以及  $C_0t-1$  DNA 为探针,对 10 个不同地理来源的四倍体苜蓿种质材料进行 FISH 分析,以期在分子细胞学水平上揭示四倍体苜蓿不同种质间染色体多态性以及不同种质间的遗传分化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

苜蓿栽培品种敖汉苜蓿由内蒙古农业大学提供,其他苜蓿种质材料由中国牧草种质资源库提供(表 2)。将这些材料种植在青海省西宁地区,花色都表现为紫色。

表 1 苜蓿品种及种质材料

Table 1 Alfalfa cultivars and germplasm accessions

序号 No.	材料号或名称 Code or name of the materials	来源地 Origins	序号 No.	材料号或名称 Code or name of the materials	来源地 Origins
1	0024	西藏	6	5368	内蒙古赤峰
2	5342	新疆	7	敖汉苜蓿	内蒙古赤峰
3	5383	新疆	8	5172	内蒙古呼盟
4	5175	内蒙古锡盟	9	0054	内蒙古呼盟
5	0393	内蒙古锡盟	10	5185	辽宁

### 1.2 方法

**1.2.1 染色体制片的制备** 不同材料的种子室温下发芽,根尖长至 2cm 左右,0~4℃ 冰水处理 24h,卡诺液固定 30min 以上,45% 醋酸火焰干燥压片,相差显微镜观察,挑选中期分裂相良好的制片冰冻揭片。

**1.2.2 探针 DNA 的制备** 质粒 pWrrn 含有 45 rDNA 基因片段,由日本鸟取大学 Tsujimoto 教授提供;5S rDNA 以苜蓿基因组 DNA 为模板,按照 Fukui 等<sup>[10]</sup>的方法,由 PCR 扩增产生。 $C_0t-1$  DNA 的制备参阅 Zwick 等<sup>[9]</sup>的方法。

**1.2.3 探针标记** 5S rDNA 和  $C_0t-1$  DNA 探针以 Flurescein-12-dUTP 或者以 Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP 用随机引物法进行标记(Agilent Prime It II 试剂盒),质粒 pWrrn(含 45 rDNA)通过缺口平移法进行标记。

**1.2.4 荧光原位杂交** 染色体制片在 0.2mol/L NaOH 溶液室温变性 10min 后,-20℃ 无水乙醇固定。每张制片杂交液为 10 $\mu$ l,其中含有 50% 甲酰胺,50% 硫酸葡聚糖,1mg 鲑鱼精 DNA,1 $\mu$ l 20 $\times$  SSC 和 10ng 的探针 DNA。杂交液在 90~92℃ 变性 5min 后,与变性后的制片在 37℃ 杂交 20~24h。杂交后的制片用双馏水冲洗,利用含 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)的抗荧光衰减封片剂(Vecter)封片,Leica 荧光显微镜观察,利用 CCD(Cool snapper, Photometrics)获取图像,利用 Photoshop 进行图像后期处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 四倍体苜蓿分子核型基本特征

利用不同颜色标记的 5S rDNA 和 45S rDNA 对染色体制片进行 FISH 分析,结果表明在所有材料

中表现为 4 条染色体上有 45S rDNA 杂交信号,8 条染色体上具有 5S rDNA 杂交信号,并且杂交位点分别位于不同的染色体上。为了进一步揭示 5S rDNA 和 45S rDNA 杂交位点所在染色体的特征,以及其他染色体的结构特征,进一步利用 Flurescein-12-dUTP 标记的  $C_0t-1$  DNA(绿色)和 Tetramethyl-rhodamine-5-

dUTP 标记的 5S rDNA 或 45S rDNA(红色)为两种探针组合进行 FISH 分析,结果表明标记  $C_0t-1$  DNA 几乎在所有染色体上都具有杂交信号,而 5S rDNA 或 45S rDNA 在染色上的杂交位点数,与 5S rDNA 和 45S rDNA 为探针组合进行的 FISH 检测结果一致(图 1)。

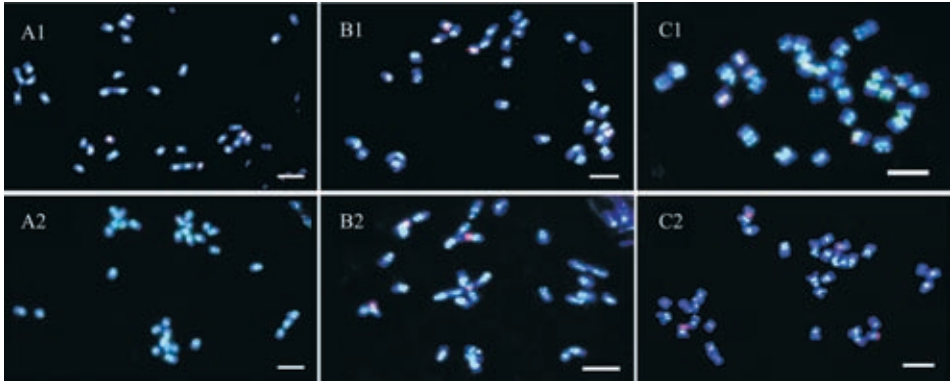


图 1 苜蓿材料 0024(A1 和 A2)、5172(B1 和 B2)和 5185(C1 和 C2)的 FISH 分析

Fig. 1 FISH patterns of 0024(A1 and A2), 5172(B1 and B2), and 5185(C1 and C2)

A1、B1 和 C1 利用 5S rDNA(红色)和  $C_0t-1$  DNA(绿色)探针组合进行杂交;A2、B2 和 C2 利用 45S rDNA(红色)和  $C_0t-1$  DNA(绿色)探针组合进行杂交;(比例尺为  $10\mu\text{m}$ )

A1, B1, and C1 were detected with 5S rDNA(red) and  $C_0t-1$  DNA(green);

A2, B2, and C2 were detected with 45S rDNA(red) and  $C_0t-1$  DNA(green) (bar =  $10\mu\text{m}$ )

核型分析结果表明,  $C_0t-1$  DNA 在大多数染色体上的分布特征不尽一致,结合  $C_0t-1$  DNA 以及 45S rDNA、5S rDNA 在染色体上的杂交信号,绝大多数染色(13~15 对)的同源染色体能得到较清晰的辨别。并根据这些重复序列在染色体上的不同分布特征,32 条染色体可以较清晰地区分为 16 对(图 2)。比较重复序列在不同材料的染色体上的分布特征,分子核型特征具有非常高的相似性。根据特征性重复序列分布,16 对染色体可以区分为以下几

种类型,长臂或近着丝粒区上具有 45S rDNA 杂交信号(1-2 号染色体);短臂近着丝粒和近端粒区有  $C_0t-1$  DNA 杂交信号(3-7 号染色体);短臂近着丝  $C_0t-1$  DNA 杂交信号较强和近端粒区较弱(8-9 号染色体);短臂中间或近着丝粒区有 5S rDNA 杂交信号(10-12 号染色体);在着丝粒区有明显  $C_0t-1$  DNA 杂交区(13-14 染色体);长臂近着丝粒和近端粒区有  $C_0t-1$  DNA 杂交信号(15 号染色体);长臂上具有 5S rDNA 杂交信号(16 号染色体)。

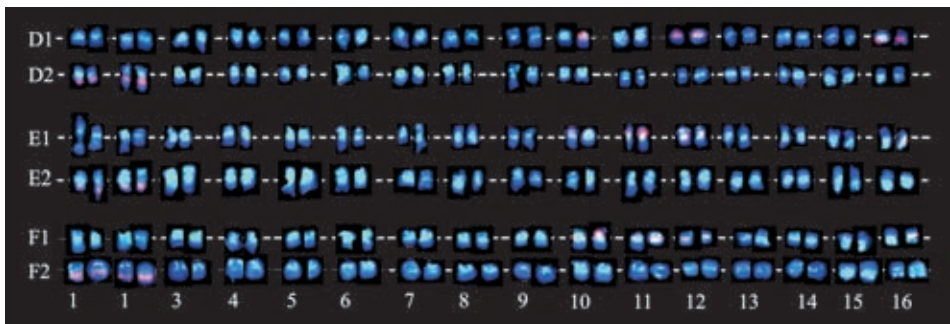


图 2 苜蓿材料 0054(D1 和 D2)、5175(E1 和 E2)和 5368(F1 和 F2)的核型分析

Fig. 2 Karyotypes of 0054(D1 and D2), 5175(E1 and E2), 5368(F1 and F2)

D1、E1 和 F1 中红色信号为 5S rDNA,D2、E2 和 F2 中红色信号为 45S rDNA(红色),绿色信号为  $C_0t-1$  DNA

The red signals in D1, E1, and F1 are 5S rDNA sites, while the red signals in D2, E2, and F2 are 45S rDNA sites. The green signals are  $C_0t-1$  DNA hybridization



## 2.2 各同源染色体多态性表现及多态型特征

虽然在分子核型特征上不同种质材料间表现相似的特征,但是比较 10 份苜蓿材料每一对染色体上重复序列的分布特征,发现在多数染色体上不同材料间有多态性存在,并且每对染色体

多态性表现不一,其中 1 号染色体多态性表现最高,在 10 个材料中检测出 7 个不同的多态型;3、4 和 15 号染色体多态性最低,10 个材料间表现为单态;而其他染色体均检测出 2~4 个多态型(图 3)。

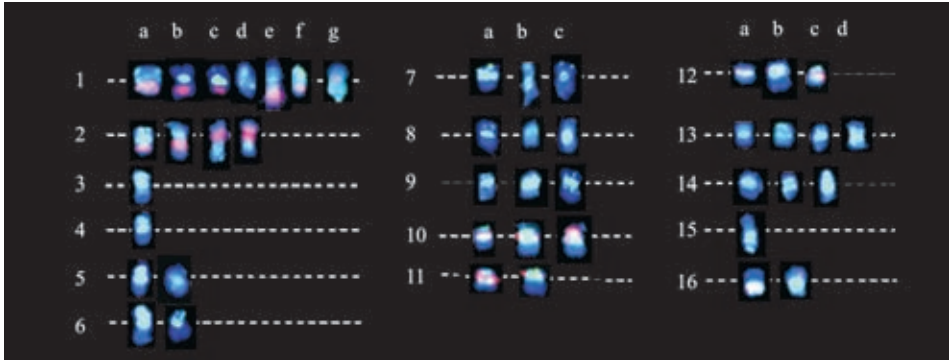


图 3 10 个不同苜蓿材料中染色体多态型

Fig. 3 Chromosome polymorphisms uncovered in 10 alfalfa accessions

不同染色体多态型由不同的字母表示,1 和 2 号染色体上的红色杂交信号为 45S rDNA 位点,其他染色体上红色杂交信号为 5S rDNA 位点,绿色杂交信号为  $C_0t-1$  DNA

Different variants are annotated by the different roman letters. The red signals on chromosome No. 1 and No. 2 are 45S rDNA sites, and those on others are 5S rDNA sites. The green signals are  $C_0t-1$  DNA hybridization

1 号染色体:在 10 个材料中有 7 种不同的多态型,其中多态性 a 型染色体在材料中出现频率较高,染色体特征为在短臂近着丝粒区和近端粒区具有较强的  $C_0t-1$  DNA 杂交信号,在长臂位置上具有 45S rDNA 杂交位点。与 a 型相比,b 型短臂  $C_0t-1$  DNA 杂交信号缺失;c 型短臂  $C_0t-1$  DNA 杂交信号较弱;d 型长臂 45S rDNA 信号微弱,长臂端部似有缺失;e 型长臂 45S rDNA 信号位置更加靠近端部;f 型短臂  $C_0t-1$  DNA 杂交信号强;g 型 45S rDNA 信号较弱,且位于染色体着丝粒部位。

2 号染色体:多态性 a 型染色体在重复序列分布上与 1 号 a 型染色体具有相似的分布,但是相对于 1 号染色体,染色体长短臂臂比较大;b 型短臂端部  $C_0t-1$  DNA 杂交信号缺失,且 45S rDNA 信号靠近着丝粒部位;c 型和 e 型染色体在长臂上有  $C_0t-1$  DNA 杂交信号,并且 45S rDNA 杂交信号位于着丝粒部,其中 e 型上 45S rDNA 杂交信号强度和分布范围大于 c 型。

3 号和 4 号染色体:在不同材料间相对保守,染色体特征为均在短臂近着丝粒区和近端粒区具有较强的  $C_0t-1$  DNA 杂交信号,而在长臂上无杂交信号。

5 号和 6 号染色体:其 a 型染色体与 3 号和 4 号染色体特征相似,但是 b 型染色体短臂端部  $C_0t-1$  DNA 杂交信号缺失。

7 号染色体:有 3 种变异型的存在,其中 a 型染色体特征与 3~6 号染色体 a 型相似;相对于 a 型,b 型在长臂有额外  $C_0t-1$  DNA 杂交信号;c 型表现为短臂端部  $C_0t-1$  DNA 杂交信号微弱。

8 号染色体:a 型染色体着丝粒部和短臂中部有  $C_0t-1$  DNA 杂交信号;b 型仅着丝粒部位有  $C_0t-1$  DNA 杂交信号;c 型丝粒部位  $C_0t-1$  DNA 杂交信号较 a 型和 b 型强。

9 号染色体:a 型染色体与 8 号 a 型重复序列分布特征相似,但是长短臂臂比较大;b 型着丝粒部  $C_0t-1$  DNA 杂交信号强,而短臂上杂交信号缺失;c 型在着丝粒部、长臂、短臂均有  $C_0t-1$  DNA 杂交信号。

10 号染色体:3 个多态型的共同特征为在短臂近端粒区和近着丝粒区有较强的  $C_0t-1$  DNA 杂交信号,5S rDNA 杂交信号分布于短臂 2 个杂交信号之间,但是在 a 型染色体上 5S rDNA 分布偏向于着丝粒部;在 b 型上 5S rDNA 信号相对微弱;在 c 型上 5S rDNA 信号较强,且分布与  $C_0t-1$  DNA 有较大重叠区域。

11 号染色体:在短臂近端粒区和近着丝粒区有较强的  $C_0t-1$  DNA 杂交信号,5S rDNA 杂交信号分布于短臂 2 个  $C_0t-1$  DNA 杂交信号之间,在 a 型上表现较强,而在 b 型上表现较弱。

12 号染色体:a 型和 c 型染色体均在近着丝粒区有较强  $C_0t-1$  DNA 和 5S rDNA 杂交信号,但是 c 型在短臂端部有较强  $C_0t-1$  DNA 杂交信号;b 型则为 5S rDNA 杂交信号分布处于短臂 2 个较强的  $C_0t-1$  DNA 杂交信号之间。

13 号染色体:4 种多态型均在着丝粒部位有  $C_0t-1$  DNA 杂交信号,b 型在短臂端部有额外  $C_0t-1$  DNA 杂交信号,c 型在短臂和长臂中部有微弱  $C_0t-1$  DNA 杂交信号,而 d 型在长臂中部有较强  $C_0t-1$  DNA 杂交信号。

14 号染色体:a 型染色体在着丝粒区有较强  $C_0t-1$  DNA 杂交信号;b 型在短臂中部和着丝粒区有较强  $C_0t-1$  DNA 杂交信号;b 型在长臂、着丝粒区、短臂上均具有较强  $C_0t-1$  DNA 杂交信号。

15 号染色体:在不同材料间 FISH 杂交特征表

现保守性,均表现为在染色体长臂近端粒区和近着丝粒区有较强的  $C_0t-1$  DNA 杂交信号。

16 号染色体:a 型染色体在长臂近端粒区和近着丝粒区有较强的  $C_0t-1$  DNA 杂交信号,并在两个杂交信号之间具有一个较强的 5S rDNA 杂交位点,而 b 型染色体 5S rDNA 杂交位点较弱,且分布倾向于着丝粒部位。

### 2.3 不同材料间染色体多态型分布及分子核型特征比较

每对染色体在 10 个不同材料间的分布表明每对染色体中不同多态型在材料中分布频率各异,各对染色体中 a 型出现频率最高,为 40% 以上,有些多态型仅在特定材料中出现,比如 1 号染色体的 f 型、g 型仅在材料 0024 中出现,d 型和 e 型仅在栽培品种敖汉苜蓿中出现,而 c 型仅在 5185 中被检测到(表 2)。

表 2 10 个苜蓿种质材料中的染色体多态型

Table 2 Chromosome variants included in 10 alfalfa accessions

染色体号 No. of Chr.	材料号或名称 Code or name of the materials										染色体 多态型数 No. of variants
	0024	5342	5383	5175	0393	5368	敖汉苜蓿	5172	0054	5185	
1	fg	a	a	b	b	a	de	a	b	bc	7
2	a	a	b	a	a	ab	cd	a	b	ab	4
3	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	1
4	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	1
5	a	a	a	a	b	a	b	a	a	a	2
6	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	2
7	a	a	a	b	a	a	a	b	a	c	3
8	a	b	b	c	a	a	a	a	a	a	3
9	a	b	a	a	b	b	b	c	c	c	3
10	c	a	a	a	b	bc	c	b	bc	a	3
11	a	b	a	a	ab	a	a	a	b	b	2
12	a	ca	a	b	a	a	a	b	a	a	3
13	b	a	ad	c	a	a	a	c	a	a	4
14	a	a	a	a	a	a	a	bc	a	a	3
15	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	1
16	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	2

小写字母代表在不同染色体上揭示出的染色体多态型(图 3) The different letters represent chromosome variants(Fig. 3)

由于本研究所选用材料来自不同地区,为了说明来自同一或相近区域的种质核型上有共同特征,对于不同地区来源的苜蓿材料分子核型进行了比较,结果表明,来自西藏的材料 0024 的 1 号、13 号和 16 号染色体多态型显著区别于其他材料;来自新

疆的材料 5342 和 5383 的 8 号染色体多态型区别于其他材料;来自内蒙古地区 6 个材料染色体多态型区域特征不显著,但是栽培品种敖汉苜蓿 1 号和 2 号染色体特征显著区别于其他材料;来自辽宁的材料 5185 的 1 号和 7 号的 c 型多态性染色体区别于

其他材料。同时结果表明,除 5175 材料外,其他 9 份材料中有 1~2 对染色体同源染色体处于杂合状态(表 2)。

### 3 讨论

#### 3.1 综合利用不同重复序列进行苜蓿分子核型分析

Falisticco<sup>[11]</sup>对四倍体紫花苜蓿进行 5S rDNA 和 45S rDNA 的 FISH 定位研究,发现紫花苜蓿具有 2 个 45S rDNA 位点和 4 个 5S rDNA,并且这些位点分别位于不同染色体上,这与本研究结果一致。 $C_0$ t-1 DNA 是植物基因组中高度和中度重复序列部分,本研究表明, $C_0$ t-1 DNA 分布在绝大多数染色体短臂的近端部和近着丝粒区域。染色体 C-带技术可以揭示染色体异染色质组成情况,而染色体上异染色质部分则为大量高度重复序列所在区,Bauchan 等<sup>[12]</sup>利用染色体 C-带技术对四倍体紫花苜蓿进行了研究,发现 C-带主要显现在绝大多数染色体短臂的端部、近着丝粒部以及多数染色体短臂的中部,利用 C-带技术揭示的位于短臂上的端带和近着丝粒带与本研究中  $C_0$ t-1 DNA 杂交信号所在位置具有较高的一致性。

5S rDNA 和 45S rDNA 为特定序列探针,而  $C_0$ t-1 DNA 为高度和高度重复序列探针,由于目前在四倍体紫花苜蓿中缺少可供 FISH 利用的重复序列,利用标记的  $C_0$ t-1 DNA 产生的杂交信号作为染色体识别的标记,不失为一种核型分析的有效手段,但是  $C_0$ t-1 DNA 毕竟是多种重复序列的混合物,单一特定重复序列的获得需进一步对这些重复序列进行分离、克隆和鉴定。本项研究综合利用 5S rDNA、45S rDNA 以及  $C_0$ t-1 DNA 在苜蓿染色体上的杂交信号分布,可以较好地对不同苜蓿种质在分子核型水平上进行比较分析。在进一步研究中,克隆出多个稳定、可靠的染色体标记,对在染色体水平上深入揭示苜蓿基因组的组成和变异具有重要意义。

#### 3.2 不同种质群体间染色体多态性及核型差异性

Bauchan 等<sup>[13]</sup>利用 C-分带和图像分析技术对来自智利的紫花苜蓿种质群体进行染色体多态性分析,结果表明在该种质群体中 C-带揭示的组成性异染色质在染色体上的数目、强度、位置等存在大量变异,并发现第 8 号染色体的第一同源染色体无论在来自智利还是来自印度的苜蓿种质群体中都具有很高的多态性,且具有核仁组织区的卫星染色体,而核仁组织区常是 45S rDNA 位点所在区,因此该染色

体很有可能就是本研究确定的 1 号染色体,而且 1 号染色体具有最多的染色体多态型,表明该染色体的高度变异性在不同种质群体中表现一致。Bauchan 等<sup>[14]</sup>进一步利用 C-带技术对来源不同的印度、秘鲁、智利以及非洲苜蓿进行染色体多态性分析及核型比较,结果表明种质群体内和群体间存在大量 C-带多态性,但是在核型上并不能将这 4 组种质明确分开,并认为种质间在染色体水平上不能显著区分的原因不同种质间染色体缺少重排、种质材料原始引进时具有相似的遗传背景、或在种质保存中相互杂交引起遗传漂变等。

虽然本研究中地理来源不同的苜蓿种质材料在某些染色体上存在多态性,但是分子核型具有高度相似性,这表明四倍体苜蓿不同种质之间核型特征上具有一定的保守性,由于 DNA 序列的重复<sup>[14]</sup>、不对称交换<sup>[15]</sup>以及 DNA 序列的缺失<sup>[16]</sup>等事件,同一种质群体内或不同种质间染色体多态性,更多地表现为异染色质数目、强度和位置的变化,而不同种质间染色体重排事件可能发生较少。

#### 3.3 利用染色体多态性评价苜蓿不同种质间的遗传多样性

蕴藏在种质(内)间的遗传多样性是进行遗传育种学研究的重要物质基础,苜蓿遗传多样性和亲缘关系的评价是进行苜蓿种质资源保护、亲本选配等的重要依据。我国是拥有苜蓿种质资源比较丰富的国家之一,李拥军等<sup>[17]</sup>利用 RAPD 分子标记、魏臻武等<sup>[5]</sup>利用 SSR 和 ISSR 分子标记对我国苜蓿地方品种遗传多样性进行研究,揭示出我国苜蓿地方品种遗传基础广阔,品种基因型特异性和地理分布有直接的关系。

本研究采用在地理分布上自西向东的 10 个材料进行染色体多态性比较,结果显示分布于西藏、新疆以及辽宁的材料部分染色体多态型显著区别于其他材料,表明在染色体水平上遗传多态性与地理环境的一定相关性。源自内蒙古不同地区的材料,某些特定多态型染色体在不同来源材料中出现,表明它们之间有一定的基因交流。本研究中来源于中国牧草国家种质资源库的苜蓿种质材料,保存多年,而且苜蓿是一个高度异花授粉植物,不能排除在保存过程由于相互杂交而引起遗传漂变,因此进一步对原生境种质材料进行分析研究,可能会得出更加可靠的结论。

染色体多态性的揭示是综合评价苜蓿遗传多样性的重要组成部分,同时是进一步认识苜蓿基



基因组组成和变异特性的重要依据。本项研究表明,综合利用多种重复序列进行荧光原位杂交分析是揭示苜蓿染色体组成和变异的有效手段;苜蓿不同种质的同源染色体多态性表现不一,有的表现出很高的变异性,而有的表现出较高的保守性;不同苜蓿在染色体水平上遗传多态性与地理环境呈现一定相关性,揭示的不同种质间染色体多态性差异可以作为苜蓿种质资源保存以及杂交亲本选配的重要参考依据。

### 参考文献

- [1] Quiros C F, Bauchan G R. The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex [M]//Hanson A A, Barnes D K, Hill R R (eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Agron. Monogr. 29. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. 1988, 93-124
- [2] 卢欣石. 中国苜蓿属植物遗传资源分类整理探究[J]. 中国草地学报, 2009, 31(5): 17-22
- [3] 姜华, 毕玉芬, 何承刚, 等. 紫花苜蓿花部特征遗传多样性分析[J]. 遗传, 2005, 27(3): 391-394
- [4] 李拥军, 苏家楷. 中国苜蓿地方品种亲缘关系的研究 I 种子储藏蛋白标记[J]. 草业学报, 1999, 8(1): 31-41
- [5] 魏臻武, 符昕, 耿小丽, 等. 苜蓿遗传多样性和亲缘关系的 SSR 和 ISSR 分析[J]. 草地学报, 2007, 15(2): 118-123
- [6] 苏东, 周延林, 于林清, 等. 利用 SSR 分析中国北方野生黄花苜蓿种群的遗传多样性[J]. 中国草地学报, 2010, 32(5): 85-90
- [7] Bauchan G R, Hossain M A. Karyotypic analysis of C-banded chromosomes of diploid alfalfa: *Medicago sativa* ssp. *coerulea* and ssp. *falcata* and their hybrid [J]. *J Hered*, 1997, 88: 533-537
- [8] Schwarzacher T. DNA, chromosomes, and in situ hybridization [J]. *Genome*, 2003, 46: 953-962
- [9] Zwick M S, Hanson R E, McKnight T D, et al. A rapid procedure for the isolation of C<sub>0</sub>t-1 DNA from plants [J]. *Genome*, 1997, 40: 138-142
- [10] Fukui K, Kamisugi Y, Sakai F. Physical mapping of 5S rDNA loci by direct-cloned biotinylated probes in barley chromosomes [J]. *Genome*, 1994, 37: 105-111
- [11] Falistocco E. Physical mapping of rDNA genes in *Medicago sativa* and *M. glomerata* by fluorescent in situ hybridization [J]. *J Hered*, 2000, 91(3): 256-260
- [12] Bauchan G R, Azhar M. Hossain distribution and characterization of heterochromatic DNA in the tetraploid african population alfalfa genome [J]. *Crop Sci*, 2001, 41: 1921-1926
- [13] Bauchan G R, Campbel T A, Hossain M A. Chromosomal polymorphism as detected by C-banding patterns in Chilean alfalfa germplasm [J]. *Crop Sci*, 2002, 42: 1291-1297
- [14] Bauchan G R, Campbel T A, Hossain M A. Comparative chromosome banding studies of nondormant alfalfa germplasm [J]. *Crop Sci*, 2003, 43: 2037-2042
- [15] Bickmore W, Craig G. Heterochromatin and other extremes of chromatin flavor [M]//Bickmore W, Craig J (eds.). *Chromosome bands: Patterns in the genome*. R. G. Landes Publ., Austin, TX, 1997: 133-162
- [16] Stanford E H, Clement W H. Cytology and crossing behavior of a haploid alfalfa plant [J]. *Agron J*, 1958, 50: 589-592
- [17] 李拥军, 苏家楷. 苜蓿地方品种遗传多样性的研究—RAPD 标记[J]. 草地学报, 1998, 6(2): 105-114
- [18] Bauchan G R, Hossain M A. Karyotypic analysis of C-banded chromosomes of diploid alfalfa: *Medicago sativa* ssp. *coerulea* and ssp. *falcata* and their hybrid [J]. *J Hered*, 1997, 88: 533-537
- [19] Schwarzacher T. DNA, chromosomes, and in situ hybridization [J]. *Genome*, 2003, 46: 953-962
- [20] Zwick M S, Hanson R E, McKnight T D, et al. A rapid procedure for the isolation of C<sub>0</sub>t-1 DNA from plants [J]. *Genome*, 1997, 40: 138-142
- [21] Fukui K, Kamisugi Y, Sakai F. Physical mapping of 5S rDNA loci by direct-cloned biotinylated probes in barley chromosomes [J]. *Genome*, 1994, 37: 105-111
- [22] Falistocco E. Physical mapping of rDNA genes in *Medicago sativa* and *M. glomerata* by fluorescent in situ hybridization [J]. *J Hered*, 2000, 91(3): 256-260
- [23] Bauchan G R, Azhar M. Hossain distribution and characterization of heterochromatic DNA in the tetraploid african population alfalfa genome [J]. *Crop Sci*, 2001, 41: 1921-1926
- [24] Bauchan G R, Campbel T A, Hossain M A. Chromosomal polymorphism as detected by C-banding patterns in Chilean alfalfa germplasm [J]. *Crop Sci*, 2002, 42: 1291-1297
- [25] Bauchan G R, Campbel T A, Hossain M A. Comparative chromosome banding studies of nondormant alfalfa germplasm [J]. *Crop Sci*, 2003, 43: 2037-2042
- [26] Bickmore W, Craig G. Heterochromatin and other extremes of chromatin flavor [M]//Bickmore W, Craig J (eds.). *Chromosome bands: Patterns in the genome*. R. G. Landes Publ., Austin, TX, 1997: 133-162
- [27] Stanford E H, Clement W H. Cytology and crossing behavior of a haploid alfalfa plant [J]. *Agron J*, 1958, 50: 589-592
- [28] 李拥军, 苏家楷. 苜蓿地方品种遗传多样性的研究—RAPD 标记[J]. 草地学报, 1998, 6(2): 105-114
- [29] for studies of diversity in the genus *Fagopyrum* [J]. *Theor Appl Genet*, 2009, 119: 1247-1254
- [30] 莫日更朝格图, 王鹏科, 高金锋, 等. 苦荞地方种质资源的遗传多样性分析[J]. 西北植物学报, 2010, 30(2): 255-261
- [31] Siebert P D, Chenchik A, Kellogg D E, et al. An improved method for walking in uncloned genomic DNA [J]. *Nucl Acid Res*, 1995, 23: 1087-1088
- [32] Rozen S, Skaletsky H. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers [M]//Krawetz S, Misener S. *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*, Ottawa: Humana Press, 2000, 365-386
- [33] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [34] Rohlf F J. *NTSYSpc: Numerical Taxonomy System*, ver. 2. 20 [M]. Setauket: Exeter Publishing Ltd., 2008
- [35] Anderson J A, Churchill G A, Autrique J E, et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps [J]. *Genome*, 1993, 36: 181-186
- [36] 曾淇, 李明芳, 郑学勤. 基于 SSR 标记的荔枝种质遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3): 298-304
- [37] Song Q J, Shi J R, Singh S, et al. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 550-560
- [38] Tsuji K, Ohnishi O. Origin of cultivated tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) revealed by RAPD analyses [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2000, 47: 431-438

(上接第 764 页)

- [1] 资源的多样性和亲缘关系[J]. 分子植物育种, 2004, 2(6): 807-815
- [2] Kump B, Javornik B. Genetic diversity and relationships among cultivated and wild accessions of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) revealed by RAPD markers [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2002, 49(6): 565-572
- [3] Tsuji K, Ohnishi O. Phylogenetic relationships among wild and cultivated Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) populations revealed by AFLP analysis [J]. *Gene Genet System*, 2001, 76(1): 47-52
- [4] Tsuji K, Ohnishi O. Phylogenetic position of east Tibetan natural populations in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) revealed by RAPD analysis [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2001, 48(1): 63-67
- [5] 赵丽娟, 张宗文, 黎裕, 等. 苦荞种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(2): 159-164
- [6] 侯雅君, 张宗文, 吴斌, 等. 苦荞种质资源 AFLP 标记遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(12): 4166-4174
- [7] Iwata H, Imon K, Tsumura Y, et al. Genetic diversity among Japanese indigenous common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) cultivars as determined from amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat markers and quantitative agronomic traits [J]. *Genome*, 2005, 48: 367-377
- [8] Konishi T, Iwata H, Yashiro K, et al. Development and characterization of microsatellite markers for common buckwheat [J]. *Breed Sci*, 2006, 56: 277-285
- [9] Ma K H, Kim N S, Lee G A, et al. Development of SSR markers