

不同居群山丹的核型分析

刘冬云^{1,2}, 张晓曼¹, 李艳¹, 史宝胜¹

(¹河北农业大学园林与旅游学院, 保定 071000; ²河北省林木种质资源与森林保护重点实验室, 保定 071000)

摘要: 采用常规压片法对 25 个居群的山丹 (*Lilium pumilum* DC.) 进行了核型分析研究。结果表明: 25 个山丹居群间的核型存在一定的多样性。各居群山丹均为二倍体种, 染色体基数为 $x = 12$, 根尖细胞中的染色体数目为 $2n = 2x = 24$ 。山丹染色体类型有 st, sm, t, m, T。最长与最短染色体的比值在 1.73 ~ 5.90 之间, 多数在 2 ~ 4 之间; 不对称系数介于 75.60% ~ 89.60% 之间; 核型有 3A, 4A, 3B, 4B, 3C, 4C 6 种类型, 其中以 3B 类型最多, 占 60%。

关键词: 山丹; 遗传多样性; 居群; 核型

Karyotype Analysis of Different Populations of *Lilium pumilum* DC.

LIU Dong-yun^{1,2}, ZHANG Xiao-man¹, LI Yan¹, SHI Bao-sheng¹

(¹ College of Gardens and Tourism, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000;

² Key Laboratory of Germplasm Resources of Forest Trees and Forest Protection College of Forest of Hebei, Baoding 071000)

Abstract: The karyological analysis on 25 populations of *Lilium pumilum* was studied by conventional pressed slice method. The results showed that the karyological type on 25 populations of *L. pumilum* was various. Each populations of *L. pumilum* were diploid, $x = 12$. In root tip cells, chromosome numbers was mostly $2n = 2x = 24$. Chromosome types of *L. pumilum* included st, sm, t, m and T. The ratio of the longest chromosome/the shortest chromosome was from 1.73 to 5.90, mostly in the range from 2 to 4. While asymmetry coefficient was between 75.60% and 89.60%. Six types included 3A, 4A, 3B, 4B, 3C, 4C, and 3B was the most type, accounted for 60%.

Key words: *Lilium pumilum* DC.; genetic diversity; population; karyotype

山丹 (*Lilium pumilum* DC.) 花姿秀丽, 是优良的野生花卉, 且是分布范围最广的野生百合之一^[1], 具有丰富的形态变异^[2], 是百合种质创新的重要基因资源。核型是植物在染色体水平上的表型^[3]。染色体是基因的携带者, 是遗传物质的载体。染色体变异是生物遗传变异的重要来源, 在植物的天然居群中一般都存在着一定程度的染色体变异, 包括染色体数目、形态和结构等变异, 这些变异对物种进化以及研究种质资源系统发育过程中的亲缘关系、特别是对于植物近缘类型或种内的分类具有重要意义^[4]。目前关于山丹繁殖的研究较多^[5-7], 而有关山丹居群的研究较少^[8]。岳玲等^[9]、范小峰等^[10]研

究了野生山丹的核型类型, 但迄今为止, 关于我国山丹野生种质资源在染色体水平上的基本特征和变异状况的研究尚未见报道。本研究在对山丹花器官^[2]和不同居群生长特性^[11]研究的基础上, 对山丹百合 25 个居群染色体核型进行研究, 试图揭示其在细胞学水平上的遗传特性和变异状况, 为山丹的分类及亲缘关系、种质资源鉴定提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为山丹的 25 个居群, 居群名称及采集地状况详见表 1。

表 1 25 个山丹居群采集地及自然生境概括

Table 1 The collection sites and nature conditions of 25 populations of *L. pumilum*

居群	缩写	具体地点	经度 (E)	纬度 (N)	海拔 (m)	花期 (月)
Populations	Abb.	Specific location	Longitude	Latitude	Altitude	Florescence
黑龙江	HLJ	黑龙江大庆	124°38'	46°32'	130 ~ 150	6-7
吉林	JL	吉林亿通黄岭子镇	126°32'	43°50'	230 ~ 245	7
辽宁	LN	辽宁开原市靠山镇	123°25'	42°12'	320 ~ 335	6
内蒙古	NMG	内蒙喀喇沁旗玉龙村	118°53'	42°15'	650 ~ 670	7-8
北京	BJ	北京怀柔区琉璃镇云蒙山	116°37'	40°18'	500 ~ 700	7-8
甘肃	GS	甘肃张掖	100°28'	38°57'	1700 ~ 1800	7-8
山西	SX	山西庞泉沟	111°31'	37°46'	1500 ~ 1600	7-8
陕西	SHX	陕西延安万花山	109°49'	36°59'	1324	6-7
山东	SD	山东潍坊凤凰山	119°09'	36°40'	500	7-8
宁夏	NX	宁夏六盘山	106°11'	35°35'	1900	7-8
河南	HN	河南辉县关山	113°43'	35°26'	1300	7-8
青海	QH	青海大通老爷山	101°80'	36°52'	1832	6-8
承德围场	WC	河北围场小东沟	117°45'	41°54'	1400	7-8
坝上	BS	河北张北县坝上	114°7'	41°15'	2128	7-8
雾灵山	WLS	河北雾灵山	117°27'	40°30'	900	7-8
大海陀	DHT	河北大海陀	115°46'	40°34'	985	7
小五台	XWT	河北张家口小五台山	115°04'	39°58'	1300 ~ 1700	7-8
白石山	BSS	河北涞源白石山	114°39'	39°13'	1236 ~ 1370	6
唐山	TS	河北唐山迁安徐流口村	118°11'	39°30'	525	6-8
易县	YX	河北易县大龙华乡马兰台村	115°30'	39°19'	200 ~ 300	7-8
唐县	TX	河北唐县齐家佐乡	114°58'	38°43'	714	7-8
赞皇	ZH	河北赞皇刘家庄西山	114°02'	37°27'	500	7-8
嶂石岩	ZSY	河北嶂石岩	114°35'	37°55'	800 ~ 1200	6
邢台	XT	河北邢台白岸乡大鱼村	114°33'	37°03'	686	7-8
邯郸	HD	河北邯郸武安市贺赵乡	114°10'	36°40'	487	8-9

1.2 方法

1.2.1 材料预处理时间的确定 参照李懋学等^[12]

方法,于2月底从苗圃挖取各居群山丹的鳞茎,栽入装有蛭石和沙土(1:1)的营养钵中,置光照培养箱20℃条件下培养生根,待根长约1~1.5cm时,切取约3~5mm的根尖置0.05%的秋水仙素溶液中预处理2h、4h、6h、8h、9h、10h和12h,观察染色体的状态。每处理3个根尖,试验重复3次。

1.2.2 材料的固定、解离

将经过秋水仙素预处理的根尖材料用蒸馏水冲洗3~4次,用卡诺固定液(冰乙酸:无水乙醇=1:3)固定24h,可立即使用或将材料至于70%的酒精中保存。用蒸馏水将固定后的材料清洗3~4次,再将材料放入预热好的1mol/L的盐酸中,60℃水浴条件下解离8min。

1.2.3 材料染色与制片方法的比较

(1)醋酸洋红染色:将解离好的根尖用蒸馏水冲洗3~4次,将根尖材料置于载玻片的中央,切取根尖材料尖部1~2mm,滴1~2滴醋酸洋红,盖上盖玻片,待15min后在酒精灯上加热,不可加热到沸腾状态,否则盖玻片会裂开。加热后用铅笔的橡皮头垂直轻敲

盖玻片,使根尖压成一薄层,反复滴加醋酸洋红染料,加热,使染色加深至可观察拍照。(2)苏木精染色:将解离好的根尖用蒸馏水冲洗3~4次,将根尖材料置于载玻片的中央,切取根尖尖部1~2mm,滴1~2滴苏木精,盖上盖玻片,用滤纸盖于盖玻片上,用拇指用力按压,即可观察。以上2种染色处理每处理压片3个,试验重复3次。

1.2.4 镜检拍照

使用Olympus BH2光学显微镜寻找染色清晰、分散而不重叠的分裂中期相拍照并保存(在100倍镜下滴油观察)。制片后若不能及时观察照相,可以置于放有湿滤纸的培养皿中,再放入冰箱中保存12h左右,材料染色会加深。

1.2.5 25个山丹居群的核型观测

根据以上试验结果,选择最佳预处理时间及染色、制片方法,取25个居群山丹的根尖,进行染色体核型观测。每个居群观察10个个体以上,染色体计数共观察统计30个完整的中期分裂相;核型分析至少测量5个不同个体细胞的染色体。

核型分析参照李懋学等^[13]确定的标准进行;核

型类型按照 G. L. Stebbins^[14] 标准;染色体的相对长度、臂比及类型遵循 A. Levan 等^[15] 的命名系统;核型不对称系数(%) = 长臂总长/全组染色体总长,参照 H. Arano^[16] 的方法。

2 结果与分析

2.1 不同预处理时间对细胞分裂指数和染色体质量的影响

百合属的染色体较大、染色体之间容易相互缠绕,另外百合属染色体的短臂和随体都很小、识别比较困难,因此选择适宜的预处理药剂和预处理时间,获得分散良好和主次缢痕清晰的染色体图片对百合属的核型分析尤为重要。本试验选用秋水仙素,对 2 h、4 h、6 h、8 h、9 h、10 h 和 12 h 的处理效果进行了比较。结果显示,预处理 2 h 对中期细胞分

裂指数及染色体长度没有明显的影响,基本没有染色体,预处理 4 h 可使染色体浓缩变短,增加中期细胞分裂指数,效果最好,超过 4h 的染色体并没有更明显的缩短,反而染色体外轮廓模糊。

2.2 不同染色及制片方法对染色体图像效果的影响

采用醋酸洋红染色,染色浅且不均匀,染色体图像效果不好;采用苏木精染色,染色深,图像效果清晰。压片时用铅笔的橡皮头垂直轻敲盖玻片的方法既费时间,又容易使细胞破裂,而压片时采用拇指按压的方法既节约时间,又使细胞完整,染色体图像效果好。

2.3 山丹居群的染色体数

各居群山丹均为二倍体种,染色体基数为 $x = 12$ (表 2),根尖细胞中的染色体数目均为 $2n = 2x =$

表 2 25 个山丹居群的核型参数

Table 2 Karyotype index of 25 *L. pumilum* populations

居群 Population	核型公式 Karyotype formula	核型 Karyotype	最长/最短 染色体 Ll/St	臂比 > 2 的 染色体比例(%) Ratio of chromosome of arm ratio > 2	核型不对称 系数(%) Asymmetry index
黑龙江 HLJ	$2n = 2x = 24 = 2sm(2SAT) + 10st(2SAT) + 12t$	4B	2.34	100	86.35
吉林 JL	$2n = 2x = 24 = 4m + 12st + 8t$	3B	2.11	83.33	80.11
辽宁 LN	$2n = 2x = 24 = 2m + 4sm(2SAT) + 8st + 10t$	3A	1.73	91.70	81.60
内蒙古 NMG	$2n = 2x = 24 = 16st(2SAT) + 6t + 2m$	3B	2.04	83.30	83.13
北京 BJ	$2n = 2x = 24 = 6m + 2sm + 10st(2SAT) + 6t$	3B	2.88	75.00	75.60
甘肃 GS	$2n = 2x = 24 = 2m + 2sm(2SAT) + 18st(4SAT) + 2t$	3B	2.24	92.00	79.25
山西 SX	$2n = 2x = 24 = 2m(2SAT) + 14t + 6st + 2T$	3B	3.03	83.00	82.70
陕西 SHX	$2n = 2x = 24 = 4m + 8sm(4SAT) + 6st + 6t$	3B	2.71	83.00	77.83
山东 SD	$2n = 2x = 24 = 4m + 8sm(2SAT) + 6st + 6t$	3B	3.20	75.00	76.01
宁夏 NX	$2n = 2x = 24 = 4m + 2sm(2SAT) + 6st + 12t(2SAT)$	3C	5.90	83.00	80.45
河南 HN	$2n = 2x = 24 = 2m + 2sm + 8st(2SAT) + 12t$	3C	4.70	83.00	82.90
青海 QH	$2n = 2x = 24 = 10sm(4SAT) + 6st + 8t$	3B	2.08	75.00	77.90
承德围场 WC	$2n = 2x = 24 = 8st + 16t(2SAT)$	4C	4.20	100.00	88.70
坝上 BS	$2n = 2x = 24 = 6sm(2SAT) + 10st + 8t$	3C	5.57	91.67	81.56
雾灵山 WLS	$2n = 2x = 24 = 12st(2SAT) + 10t + 2T$	4B	2.31	100.00	85.90
大海陀 DHT	$2n = 2x = 24 - 2 = 8t + 12st + 2T$	4B	2.10	100.00	89.60
小五台 XWT	$2n = 2x = 24 = 2sm(2SAT) + 10st + 10t + 2T$	3B	2.28	91.70	85.20
白石山 BSS	$2n = 2x = 26 = 2m + 8st + 16t$	3C	4.30	92.30	83.80
唐山 TS	$2n = 2x = 24 = 10st + 2sm(2SAT) + 12t$	4A	1.86	100.00	83.90
易县 YX	$2n = 2x = 24 = 2m(2SAT) + 6t(2SAT) + 10st + 6T$	3B	2.16	91.70	83.80
唐县 TX	$2n = 2x = 24 = 2sm(2SAT) + 12st + 2t + 8T$	3B	2.81	91.67	85.29
赞皇 ZH	$2n = 2x = 24 = 4m(2SAT) + 10st + 8t + 2T$	3B	2.20	75.00	79.92
嶂石岩 ZSY	$2n = 2x = 24 = 2m(2SAT) + 16st + 6t$	3B	2.73	91.67	84.32
邢台 XT	$2n = 2x = 24 = 6m(4SAT) + 8t + 10st$	3B	3.29	75.00	76.38
邯郸 HD	$2n = 2x = 24 = 2m + 8st + 14t(6SAT)$	3B	2.33	91.70	85.20

Ll/St: Length ratio of the longest chromosome to the shortest one

24,但在一些居群的样本根尖细胞中的染色体数目也存在着附加 1~3 条额外染色体的非整倍体细胞。

2.4 山丹居群的核型分析

研究结果(表 2、图 1、图 2)表明,山丹百合染色体有一些共性,即:基本由 5 种染色体(m、sm、st、t、T)

组成,次缢痕基本会在第 1、2、3、11 或 12 对染色体上,但各条染色体因种类不同,随体的数目及所处位置、染色体的类型等特征可能存在差别。山丹百合种内植物的染色体中 st(具近端着丝点)和 t(具端着丝点)染色体所占的比例大,染色体长度比大。

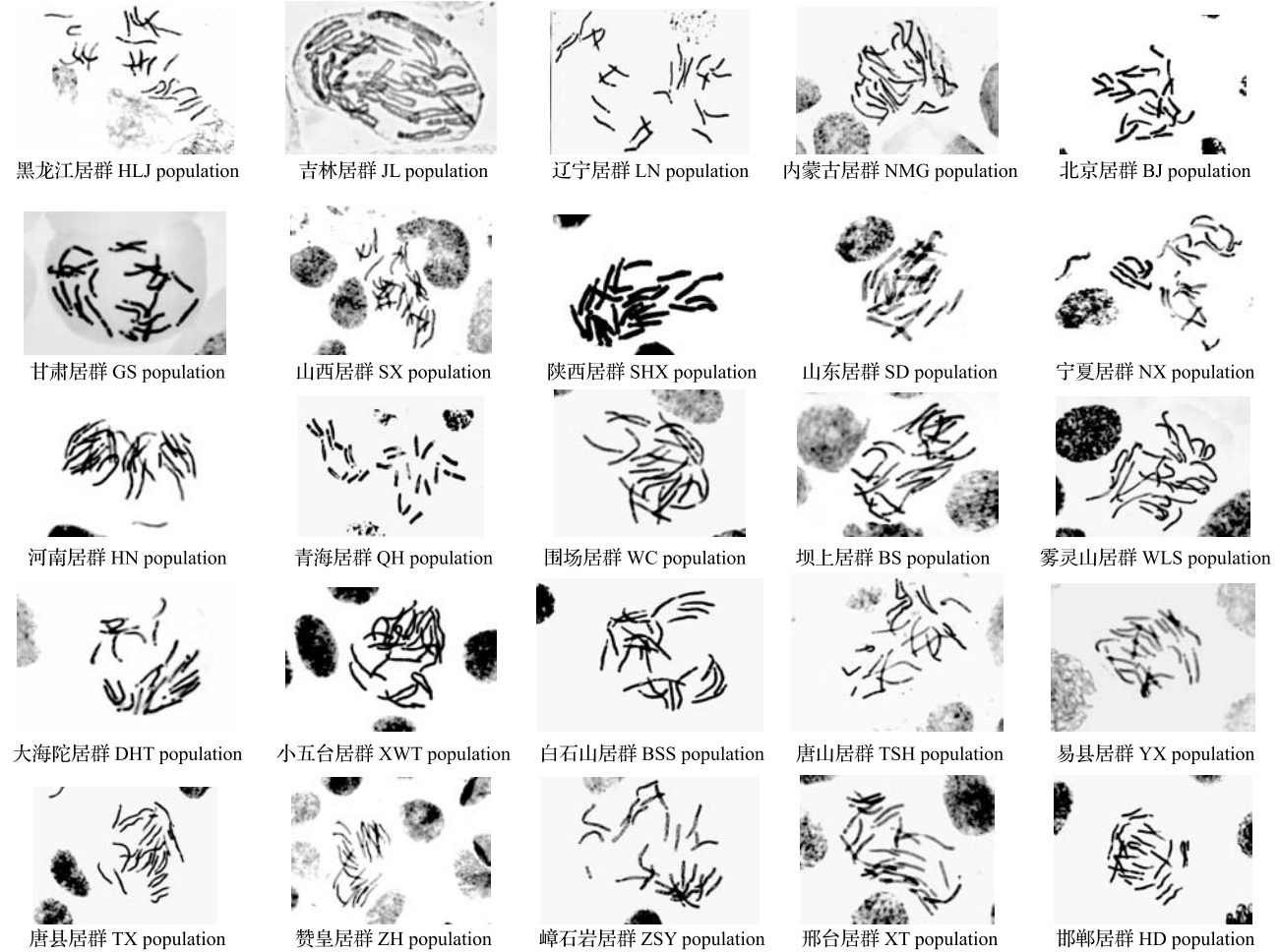


图 1 山丹居群染色体照片

Fig. 1 The chromosome photo of *L. pumilum* populations

由表 2 可知,山丹 25 个居群中,共有 15 个居群的核型为 3B 型。其中,辽宁居群为 3A 型,唐山居群为 4A 型;吉林、内蒙古、北京、甘肃、山西、陕西、山东、青海、小五台、易县、唐县、赞皇、嶂石岩、邢台、邯郸居群均为 3B 型,黑龙江、大海陀和雾灵山居群为 4B 型;宁夏、河南、白石山和坝上居群为 3C 型,承德围场居群为 4C 型,各居群最长与最短染色体的比值在 1.73~5.90 之间,多数在 2~4 之间;不对称系数介于 75.60%~89.60% 之间。说明核型对称性差,一般认为,核型变异是由对称向不对称发展,进化水平较高的物种,常常具有相对不对称的核型。

3 讨论

染色体的形态分析研究即是核型分析。核型是指单个细胞的染色体组成,反映细胞中染色体数量与结构的特征^[17]。在植物体细胞染色体的鉴别中,主要是以其全长、臂长、着丝点位置和特殊的结构如随体为依据的^[18]。任何一种生物的细胞中染色体的数量和形态都是一定的,植物染色体的数目形态等是最稳定的细胞学特征之一,在不同的种属间,染色体有不同的数目、核型等的特征区别,植物染色体的核型、类型等也是表明该物种系统演化位置以及和相近种的亲缘关系的重要依据。

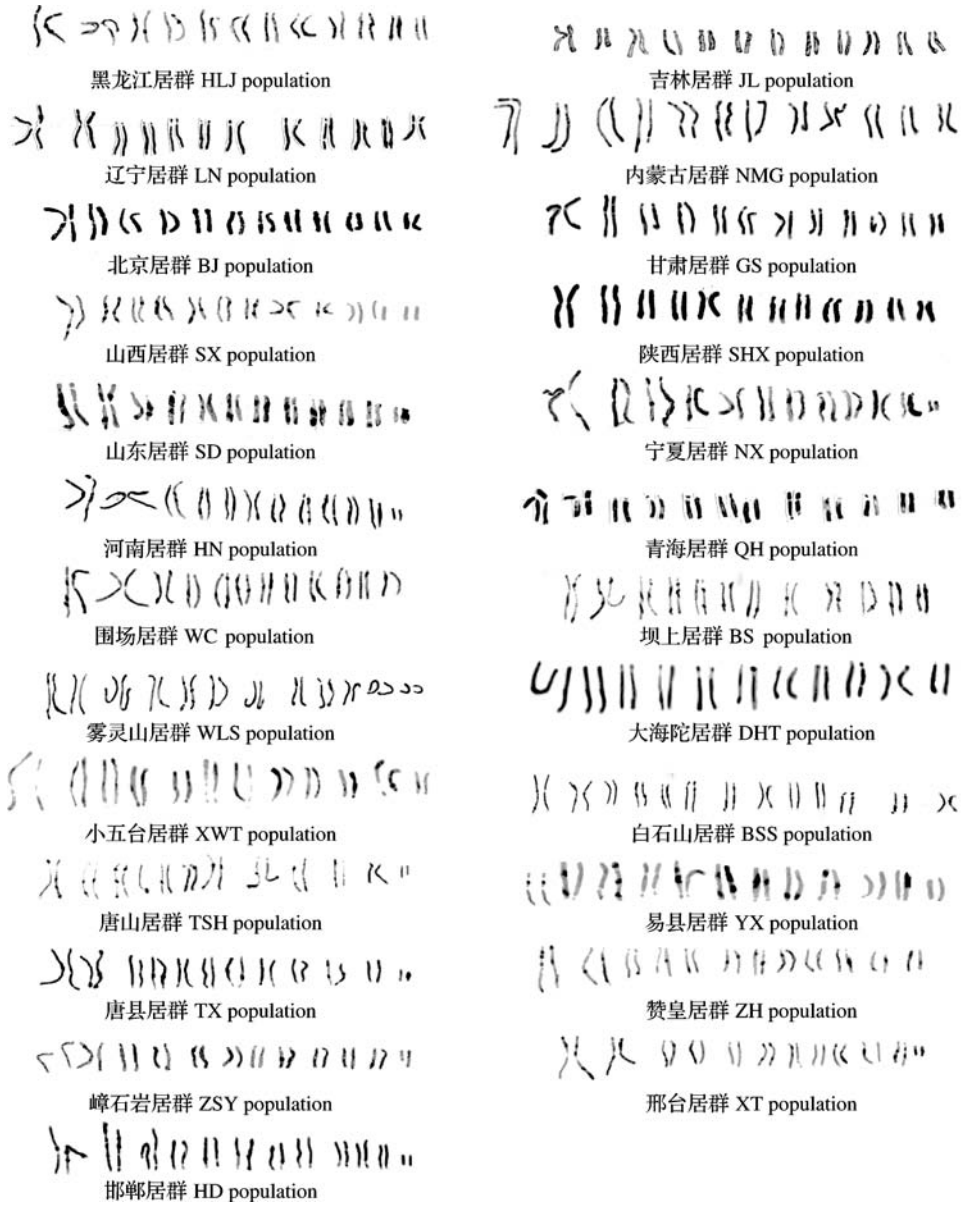


图 2 山丹居群核型图

Fig. 2 Karyogram of *L. pumilum* populations

从现有报道看,百合属的野生种中,除卷丹为三倍体($2n = 3x = 36$)外,均为二倍体($2n = 2x = 24$)。百合属植物的染色体基数为 12,染色体数目为 $2n = 24$,本研究调查的 25 个居群的野生山丹与之相符合,根尖细胞大多为 24 条染色体,可以确定为二倍体种,但根尖细胞中经常存在着附加 1~3 条额外染色体的非整倍体细胞,也有部分缺失的染色体。从其大小和形态看,这些额外染色体并非 B 染色体,很可能是细胞分裂过程中个别染色体异常分离所致。研究结果表明山

丹百合染色体有一些共性,即:基本由 5 种染色体(m, sm, st, t, T)组成,次缢痕基本会在第 1, 2, 3, 11 或 12 对染色体上,但各条染色体因种类不同,随体的数目及所处位置、染色体的类型等特征可能存在差别。山丹百合种内植物的染色体中 st(具近端部着丝点)和 t(具端部着丝点)染色体所占的比例大,染色体长度比大,说明核型对称性差,一般认为,核型变异是由对称向不对称发展,进化水平较高的物种,常常具有相对不对称的核型。

本研究 25 个居群山丹的核型共出现了 3A、3B、3C、4A、4B 和 4C 6 种类型,差异较大,其中以 3B 类型最多,占到了 60%,这与岳玲^[9]、范小峰等^[10]和刘华敏等^[19]得出的山丹均为 3A 型结果不完全一致。本研究中 3A 型只出现在辽宁居群,这与岳玲^[9]研究的辽宁 4 种野生百合的核型中山丹的核型结果是一致的。范小峰等^[10]和刘华敏等^[19]的山丹分别采自甘肃合水及甘肃天水,而本试验中甘肃的山丹居群的核型为 3B 型,结果不一致,分析原因可能是采样不同造成的。山丹出现多种核型类型,可能是因为山丹为了适应不同的环境条件,植物染色体及其外部形态发生了一定程度的变异,这都充分说明了山丹这一重要的百合种质资源具有丰富的遗传多样性。

根据作者之前对山丹 25 个居群的主要花器官性状^[2]和花粉形态的聚类结果表明,山丹 25 个居群分别划分为 5 个和 7 个类群,均基本按地理距离聚成一类。此次研究如果按照核型的类型进行聚类,25 个居群则分为了 6 个类群,却与地理距离没有表现出明显的关系,可见山丹居群的核型与形态性状之间没有明显的相关性,或许应通过染色体显带技术分析更微细的特征,这一问题有待于进一步深入研究。

从核型的观点来看,山丹各居群的染色体数目是相同的,彼此间除几对染色体类型(m 型和 sm、st、t、T 型)以及随体的情况有差异外,染色体的组型也有差异。王莲英等^[20]所研究的牡丹、招雪晴^[21]所研究的中国玫瑰都表明不同品种花色、花型的变异与染色体核型无关。本试验中,花蕾形态特征为全部被有白毛的承德围场、雾灵山、坝上、小五台、大海陀和嶂石岩 6 个居群中,坝上的核型为 3C,承德围场居群为 4C,雾灵山、大海陀居群为 4B 型,均较常见的 3B 型进化,但小五台和嶂石岩居群仍为 3B 型;花色变异中存在紫色山丹的白石山、河南居群也均为 3C 型,但陕西居群为 3B 型;居群内取样为随

机取样,在白石山居群所测样本中有紫色山丹,但其核型与红色山丹没有明显差异,所以推测山丹的花色、毛的有无等的变异与核型无关,这一问题有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 龙雅宜,张金政. 百合属植物资源的保护和利用[J]. 植物资源与环境,1998,7(1):40-44
- [2] 刘祥云,杨利平,刘玫,等. 毛百合和山丹幼苗发育的比较形态学[J]. 植物研究,1992,12(3):277-284
- [3] Zhu C. Plant chromosome and chromosome technique [M]. Peiking: Science Press, 1982:120-145
- [4] Stebbins G L. Chromosomal evolution in high plants [M]. London: Edward Arnold, 1971:85-105
- [5] 刘祥君,杨利平,刘玫,等. 毛百合和山丹幼苗发育的比较形态学[J]. 植物研究,1992,12(3):277-284
- [6] 杨利平,宋满珍,张晶. 光照和温度对百合属 6 种植物种子萌发的影响[J]. 植物资源与环境学报,2000,9(4):14-18
- [7] 刘冬云,梁海永,史宝胜,等. 野生山丹的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2005,41(5):641
- [8] 王琦,雷家军,郑洋. 细叶百合种内居群形态多样性研究[J]. 江苏农业科学,2009(2):140-141
- [9] 岳玲,雷家军,王欣. 辽宁的四种野生百合 (*Lilum* spp.) 的核型研究[J]. 植物资源学报,2006(4):5-8
- [10] 范小峰,郭小强,李师翁. 子午岭产 4 种百合科植物的核型多样性研究[J]. 西北植物学报,2000,20(5):882-888
- [11] 刘冬云,梁隐泉,李佳琦,等. 不同山丹居群在保定的生长特性分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(2):257-264
- [12] 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,1996:292-297
- [13] 李懋学,陈瑞阳. 关于核型分析的标准化问题[J]. 武汉植物学研究,1985,3(4):297-302
- [14] Stebbins G L. Chromosomal evolution in higher plants [M]. London: Edward Arnold Ltd, 1971:72-123
- [15] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. Hereditas, 1964, 52:201-220
- [16] Arano H. The karyotypes and the speciations in subfamily Carduoideae of Japan [J]. Jpn J Bot, 1965, 19(3):31-67
- [17] 邓可京,曲志才,沈大棣. 植物染色体图象分析的现状与展望[J]. 细胞生物学杂志,1995,17(2):80-82
- [18] Hu J Y, Su Z X, Yue B L. Progress of karyotype analysis method in plants research [J]. J Sichuan Norm Univ: Nat Sci, 2002, 23(3):240-244
- [19] 刘华敏,智丽,赵丽华,等. 四种野生百合核型分析[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(4):469-473
- [20] 王莲英,刘淑敏. 牡丹及其栽培品系种的染色体组型[J]. 北京林业学院学报,1983(1):38-42
- [21] 招雪晴. 中国玫瑰 (*Rosa rugosa* Thunb.) 种质资源核型研究 [D]. 泰安:山东农业大学,2008:186-189