

10 种铁线莲的核型特征及核型似近系数聚类分析

彭绿春^{1,2,3,4}, 于恒隽⁵, 余娜⁶, 瞿素萍^{1,2,3,4*}, 张芝萍^{1,2,3,4}, 解玮佳^{1,2,3,4}, 李世峰^{1,2,3,4*}, 丁鲲⁷

(1. 云南省农业科学院 花卉研究所, 云南 昆明 650205; 2. 农业部花卉产品质量监督检验测试中心, 云南 昆明 650205; 3. 云南省花卉育种重点实验室, 云南 昆明 650205; 4. 云南花卉技术工程研究中心, 云南 昆明 650205; 5. 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642; 6. 云南省花卉产业办公室, 云南 昆明 650205; 7. 云南省农村科技服务中心, 云南 昆明 650021)

摘 要: 为探明铁线莲核型特征与种间的亲缘关系, 以 10 种(品种)铁线莲组培苗幼嫩根尖为材料, 应用常规压片法分析染色体特征, 并进行核型似近系数聚类分析。核型特征分析结果表明: 除 1 个栽培种‘杰克曼’的染色体数为 14 外, 其余 9 个种的染色体数 $2n=16$, 染色体基数为 8; 10 种铁线莲核型特征参数种间存在的差异, 可作为铁线莲属植物分类和亲缘关系判定的依据。以核型似近系数进行聚类分析, 在核型似近系数为 0.818 1 时, 10 种铁线莲聚为 3 类; 在核型似近系数为 0.893 9 时, 10 种铁线莲聚为 4 类。

关 键 词: 铁线莲; 核型特征; 核型似近系数; 聚类分析

中图分类号: S682 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)06-0617-06

Karyotype features of 10 species of *Clematis* and cluster analysis of karyotypes resemblance-near coefficient

PENG Lü-chun^{1,2,3,4}, YU Heng-juan⁵, YU Na⁶, QU Su-ping^{1,2,3,4*}, ZHANG Yi-ping^{1,2,3,4},
XIE Wei-jia^{1,2,3,4}, LI Shi-feng^{1,2,3,4*}, DING Kun⁷

(1. Flower Research Institute of Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; 2. Supervision and Testing Centre for Flowers of Ministry of Agriculture, Kunming 650205, China; 3. Yunnan Flower Breeding Key Laboratory, Kunming 650205, China; 4. Yunnan Flower Research and Development Center, Kunming 650205, China; 5. Horticultural College of Huanan Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 6. Yunnan Flower Industry Office, Kunming 650205, China; 7. Yunnan Rural Science and Technology Service Center, Kunming 650021, China)

Abstract: Taking young root tip of *in vitro* plantlet of 10 species of *Clematis* as material, chromosome feature analysis and cluster analysis of karyotype resemblance-near coefficient were conducted by using conventional pressed slice method, to discuss the karyotype features and genetic relationship between species. The results suggested that the chromosome number of ‘Jackmanii’ was 14, the chromosome number of the other species were 16, and basic number of chromosome was 8. There existed differences of karyotype parameters in 10 species of *Clematis*, so karyotype datas could provide a base for the classification and genetic relationship identification of *Clematis*. To make cluster analysis of karyotypes resemblance-near coefficient, when karyotype resemblance-near coefficient(λ) was 0.818 1, 10 species of *Clematis* could be divided into 3 groups, when λ was 0.893 9, 10 species of *Clematis* could be divided into 4 groups.

Key words: *Clematis* L.; karyotype features; karyotypes resemblance-near coefficient; cluster analysis

收稿日期: 2012-07-23

基金项目: 云南省科技计划项目(2011EB111)

作者简介: 彭绿春(1981—), 女, 云南个旧市人, 硕士, 助理研究员, 主要从事花卉标准化和植物繁育技术研究, green315@126.com;

*通信作者, kylin7023@126.com, qusuping@sina.com

铁线莲属毛茛科(Ranunculaceae)铁线莲属(*Clematis*),具有很高的应用价值和经济价值。全球约有铁线莲资源 300 余种^[1]。中国有铁线莲资源约 147 种^[2]。铁线莲原种较多,栽培种更多,新品种主要通过杂交育种获得。在中国,铁线莲杂交育种的亲本主要选用国内原种和从国外引进优异栽培品种。这些品种的亲缘关系和遗传背景不明,而且复杂,新品种选育的工作量大,选育效率低。关于铁线莲亲缘关系和遗传背景的研究^[3-12]针对形态分类学方面的较多,尚未见针对核型似近系数(karyotype resemblance-near coefficient)进行聚类分析的报道。核型是生物遗传物质细胞水平上的表征,受外界环境因素的影响比外部形态小,更能保持相对稳定性。以核型为依据,可以推测生物亲缘关系的远近^[13]。核型似近系数是 2 个物种在形态结构上的等同程度的表征,反应的是物种间在核型上的同源性或亲缘关系的远近。核型似近系数聚类分析方法于 1993 年提出^[14],已在青稞^[15]、大花蕙兰^[16]、淫羊藿^[17]、金花茶^[18]、绵羊^[19]等动植物的亲缘关系和遗传距离方面被广泛应用,为植物资源利用、分类、系统演化、杂交亲本选配等提供了参考依据。笔者运用核型似近系数聚类分析方法,分析 10 种(品种)铁线莲的核型特征和亲缘关系,旨在为铁线莲属植物资源利用、遗传改良提供细胞学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

滑叶藤、毛茛铁线莲、长花铁线莲、金毛铁线莲、‘典雅紫’、‘杰克曼’、‘里昂城’、‘微安’、‘亨利’、‘波兰精神’等 10 种铁线莲均取自云南省农业科学院花卉研究所组织培养实验室,其中,4 个为野生原种,6 个为荷兰引进栽培种。10 个材料均为当年外植体诱导、增殖、生根的材料。

1.2 方法

1.2.1 铁线莲组培苗根尖染色体制片、观察和参数计算

染色体制片:采用常规制片方法,将材料用 0.1%秋水仙素于室温、黑暗条件下预处理 5 h,用清水清洗材料,4 °C 条件下于卡诺固定液中固定 1 h,解离,于材料中加入 1 mol/L HCl,60 °C 水浴 6 min,充分洗涤后于卡宝品红中染色 1~2 h,于 Nikon 显微镜上镜检,观察,拍照。

染色体数的确定和核型分析参照文献[20]的方法。核型分类参照文献[21]的方法。采用文献[22]中核型不对称系数来确定染色体核型不对称程度。着丝粒位置按文献[23]标准计算。分析时,每个品种至少取 5 个染色体分散良好的细胞进行测量计算,每个品种的染色体数至少观察 25 个完整的中期分裂相。应用文献[24]中染色体核型似近系数聚类分析系统,以染色体相对长度、臂比、着丝粒指数为参数进行计算。核型聚类分析结果以树状图表示。

1.2.2 不同继代代次根尖染色体制片、观察和参数计算

按照 1.2.1 中的方法,分别在不同继代代次进行 3 次铁线莲根尖染色体制片、观察和参数计算,以确保得到的染色体组型稳定。

2 结果与分析

2.1 不同继代代次根尖的染色体分析

由表 1 可见,各品种 3 个代次的染色体数稳定,除‘杰克曼’为 14 条外,其余 9 种的染色体数均为 $2n=16$ 条。核型公式、核型类型、臂比值大于 2 的染色体比例在 3 个代次中完全一致,平均臂比、着丝粒指数、不对称系数只有细微差异。可见,分别于 3 个代次制片得到的染色体形态比较一致,试验得到的染色体组型稳定。

表1 10种铁线莲的核型特征

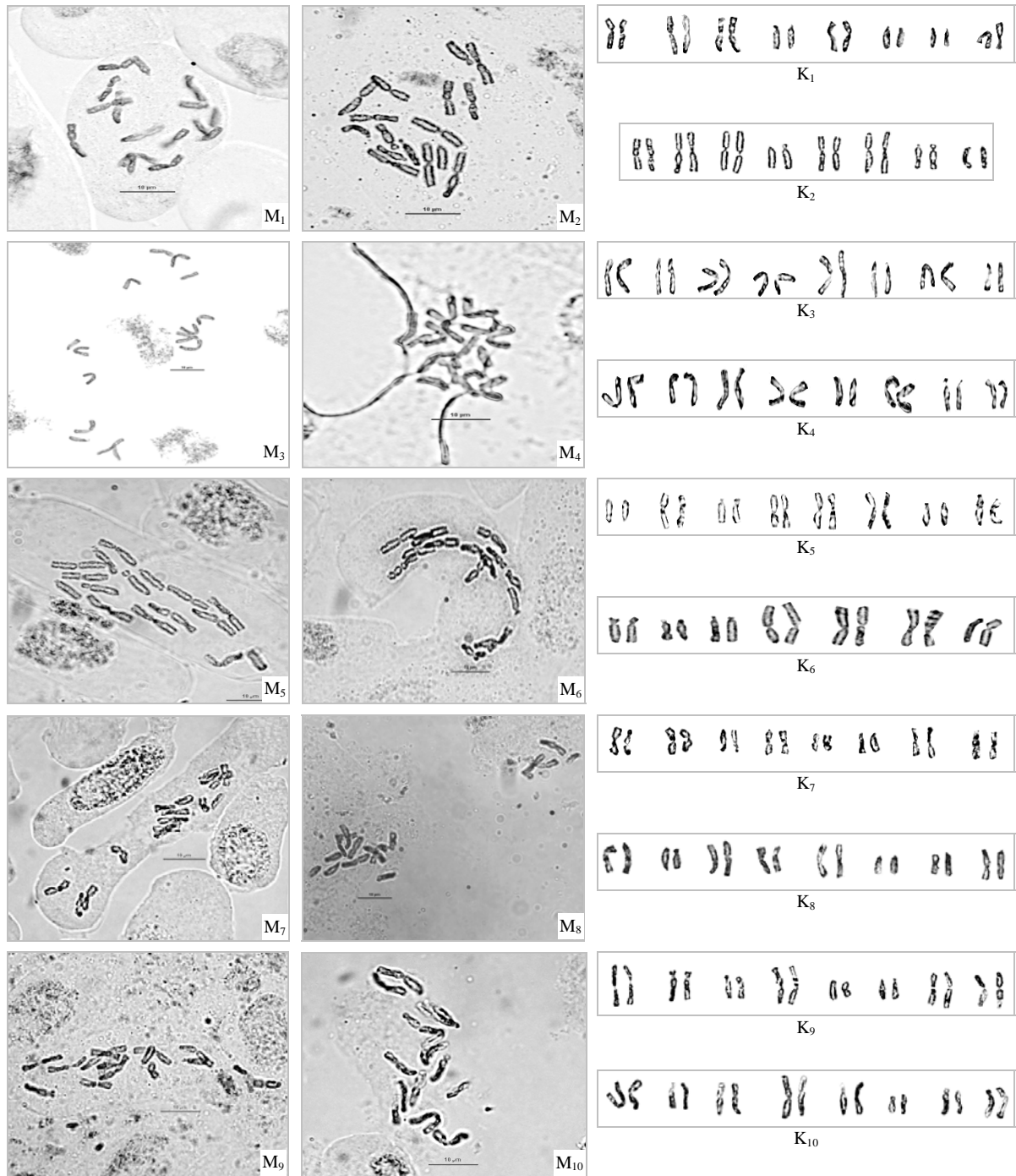
Table 1 Karyotype features of 10 species of <i>Clematis</i>									
编号	材料	继代 代次	染色 体数	核型公式	平均 臂比	着丝粒 指数	臂比>2的 比例/%	不对称 系数/%	类型
1	滑叶藤(<i>C. fasciculiflora</i> Franch)	1	16	10m+4st+2t	3.23	0.33	37.50	64.00	2B
		2	16	10m+4st+2t	3.11	0.33	37.50	63.50	2B
		3	16	10m+4st+2t	3.35	0.35	37.50	64.00	2B
2	毛茛铁线莲(<i>C. ranunculoides</i> Franch)	1	16	10m+4st+2t	2.75	0.35	37.50	62.45	2A
		2	16	10m+4st+2t	2.75	0.31	37.50	61.00	2A
		3	16	10m+4st+2t	2.90	0.35	37.50	63.10	2A
3	长花铁线莲(<i>C. rehderiana</i> Craib)	1	16	10m+4st+2t	2.88	0.34	37.50	64.07	2A
		2	16	10m+4st+2t	2.90	0.33	37.50	64.00	2A
		3	16	10m+4st+2t	2.75	0.29	37.50	65.00	2A
4	金毛铁线莲(<i>C. chrysocoma</i> Franch)	1	16	10m+6st	2.71	0.38	37.50	65.08	2B
		2	16	10m+6st	2.70	0.38	37.50	65.00	2B
		3	16	10m+6st	2.88	0.37	37.50	64.20	2B
5	‘典雅紫’(<i>purpurea plena</i> Elegans)	1	16	10m+4st+2t	3.26	0.34	37.50	63.33	2A
		2	16	10m+4st+2t	3.30	0.33	37.50	64.00	2A
		3	16	10m+4st+2t	3.30	0.34	37.50	62.52	2A
6	‘杰克曼’(<i>Jackmanii</i>)	1	14	10m+4st	2.29	0.37	28.60	60.79	2A
		2	14	10m+4st	2.15	0.39	28.60	60.00	2A
		3	14	10m+4st	2.00	0.37	28.60	61.00	2A
7	‘里昂城’(<i>Ville de Lyon</i>)	1	16	10m+6st	2.09	0.37	37.50	60.90	2A
		2	16	10m+6st	2.00	0.37	37.50	60.00	2A
		3	16	10m+6st	2.20	0.40	37.50	60.80	2A
8	‘微安’(<i>Vyvyan Penell</i>)	1	16	10m+6st	2.62	0.38	37.50	60.63	2A
		2	16	10m+6st	2.53	0.35	37.50	60.20	2A
		3	16	10m+6st	2.60	0.39	37.50	60.60	2A
9	‘亨利’(<i>Henryi</i>)	1	16	10m+6st	2.16	0.36	37.50	61.91	2B
		2	16	10m+6st	2.00	0.33	37.50	60.90	2B
		3	16	10m+6st	2.30	0.33	37.50	62.00	2B
10	‘波兰精神’(<i>Polish Spirit</i>)	1	16	10m+6st	2.09	0.37	37.50	61.41	2B
		2	16	10m+6st	2.10	0.35	37.50	61.00	2B
		3	16	10m+6st	2.21	0.37	37.50	62.50	2B

2.2 染色体数及核型特征分析

由表1和图1可知,‘杰克曼’核型公式为10m+4st,臂比>2的染色体比例为28.6%,核型类型为2A型,其余9种染色体由中部着丝点染色体(m)、亚端部着丝点染色体(st)、端部着丝点染色体(t)组成,与文献[25]中的结论“所有铁线莲核型的基本模式极为相似,均由5对具中部着丝点(m)和3对具近端(st)或端部(t)着丝点染色体所组成”基本一致。臂比>2的染色体比例为37.5%,核型类型为较原始的2A和2B型,即滑叶藤、金毛铁线莲、‘亨

利’和‘波兰精神’为2B型,其余6种为2A型。

‘波兰精神’和‘亨利’具有相同的核型公式和核型类型,其余核型特征参数也较接近,滑叶藤和金毛铁线莲具有相同的核型类型和相似的核型特征参数,长花铁线莲、毛茛铁线莲、‘典雅紫’、‘里昂城’和‘微安’具有相同的核型类型和相似的核型特征参数。10种铁线莲核型参数在种间存在差异。这种差异可作为铁线莲属植物分类和亲缘关系判定的依据。



“M”示染色体形态；“K”示染色体核型；1~10为品种编号。

图1 10种铁线莲中期染色体的形态及核型

Fig.1 Metaphase chromosome and karyotype of 10 species of *Clematis*

2.3 核型似近系数聚类分析

由图2可见,当核型似近系数为0.818 1时,10种铁线莲聚为3类,其中,‘杰克曼’染色体数为14条,单独聚为一类,‘亨利’和‘波兰精神’聚为一类,其余7种聚为一类;当核型似近系数为0.893 9时,10种铁线莲聚为4类,其中,‘杰克

曼’单独成为一类,‘波兰精神’和‘亨利’聚为一类,滑叶藤和金毛铁线莲聚为一类,其余5种聚为一类。可见,‘杰克曼’与其余9种的亲缘关系非常远,‘波兰精神’与‘亨利’、滑叶藤与金毛铁线莲之间的亲缘关系均较近,其余5种两两之间的亲缘关系也较近。

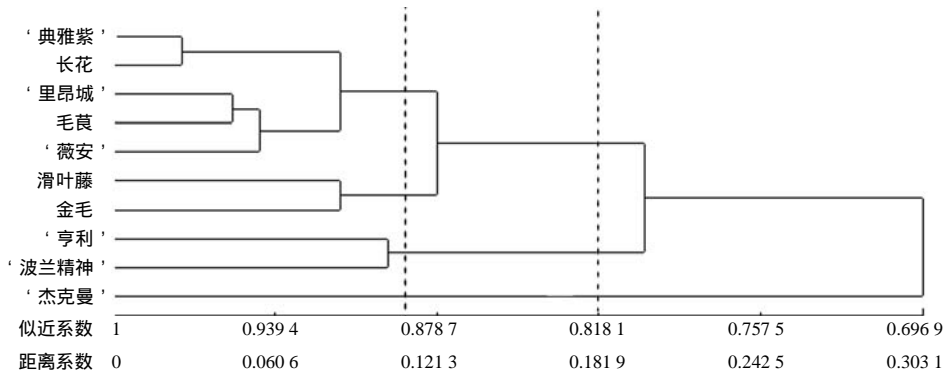


图 2 10 种铁线莲核型似近系数聚类图

Fig.2 Clustering drawing of 10 species *Clematis* by karyotype resemblance-near coefficient

3 结论与讨论

‘杰克曼’染色体数为 14 条，为国内外在铁线莲中首次发现。因‘杰克曼’的染色体数具有特殊性，笔者对其 5 个继代代次的生根苗进行了 5 次染色体制片，得到了相同的结果。张镜铨等^[8]通过对 6 种国产铁线莲的研究，提出铁线莲属染色体演化有 2 个趋势，即数目变化(包括多倍化和非整倍体化)和结构变异。本研究中的材料可能发生了染色体数变异，其变异可能来源于两方面，一方面是外界因素(资源圃里的种植环境或组织培养条件等)诱发，是偶然发生的；另一方面是因为‘杰克曼’是通过杂交育成的栽培品种，后代分离或父母本特殊的遗传背景都有可能变异发生。对资源圃里的母株和组织培养株系进行进一步细胞学鉴定和确认后，若该材料的特性仍稳定一致，则该材料可用于铁线莲的遗传改良。

组织培养是植物快速繁殖和保持母本性状的—种有效方法，继代次数、培养基中添加的激素浓度和种类、培养条件等因素常导致体细胞变异，变异率因植物种类而异^[26]。本试验中使用的组培苗均为当年外植体诱导、增殖、生根的材料，且在 3 个继代代次重复进行 3 次染色体制片、分析，其中‘杰克曼’进行了 5 次重复，所以，得到的染色体组型稳定。

染色体特征参数在研究木本类群系统演化方面是很稳定的指标；核型分析能识别染色体的形态特征，是细胞分类学的一个重要指标。在植物种属间

和种内，染色体常有不同程度的分化。本研究中，滑叶藤和金毛铁线莲、毛茛铁线莲和长花铁线莲具有相同的核型类型和相似的核型特征参数，对核型似近系数进行聚类分析，滑叶藤和金毛铁线莲聚为一类，毛茛铁线莲和长花铁线莲聚为一类，这与传统分类学中前两者同属于绣球藤组，后两者同属于尾叶铁线莲组的结论一致。细胞学资料的分类学意义是相对的，不同类型有时保持相似的核型特征，在分类上相近的类型却有不同核型特征。染色体资料在分类上有时会与经典分类存在差异，因此，需要结合形态学、孢粉学、分子生物学等资料建立一个全面反映铁线莲属植物种间关系的分类系统，这样无论对铁线莲属植物分类学研究，还是对其物种起源进化关系探讨都具有重要意义。

从文献[14]中的核型似近系数计算公式可看出，核型似近系数多向地、立体地、多维地考察了物种间的相似性，一定程度上可作为表达物种亲缘的有力指数。王利民等^[16]研究了大花蕙兰杂交育种过程中核型似近系数和育种亲本之间的关系，发现随着两亲本似近系数的增高，杂交成功率和坐果率都有增高的趋势，核型似近系数可以为亲本选配提供依据。笔者研究 10 种铁线莲的亲缘关系，希望对当前铁线莲属植物的杂交育种工作有所贡献，以提高育种效率，推动育种进程。

参考文献:

[1] 王文采, 李良千. 铁线莲属一新分类系[J]. 植物分类学报, 2005, 43(5): 431, 488.

- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [3] De Candolle A P. Regni vegetabilis systema naturale[Z]. Paris, 1918.
- [4] Kuntze O. Monographie der gattung clematis: Verhandlungen des botanischen vereins der prov[J]. Brandenburg, 1885, 26: 83, 202.
- [5] Johnson M. Slaktet Clematis [M]. Sodertalje: M Johnsons Plantskola AB, 1997.
- [6] Grey-Wilson C. Clematis the Genus[M]. Oregon: Timber Press, 2000.
- [7] 龚维忠, 龙雅宜, 李懋学. 北京地区铁线莲属植物的核型研究[J]. 武汉植物学研究, 1985, 3(4): 371-379.
- [8] 张镜铨, 贺士元. 国产六种铁线莲的染色体研究[J]. 武汉植物学研究, 1990, 8(2): 115-121.
- [9] 张镜铨, 贺士元. 国产七种铁线莲的染色体研究[J]. 武汉植物学研究, 1991, 9(2): 107-113.
- [10] Yang Q E, Gu Z J, Sun H. The karyotype of *Beesia deltophylla* and its systematic significance[J]. Acta Phytotax Sin, 1995, 32(3): 225-229.
- [11] Yang Q E. Correction of karyotype of diploid *Beesia calthifolia* and discovery of a tetraploid cytotype[J]. Acta Phytotax Sin, 1999, 37(1): 1-9.
- [12] Yang Q E. Does Actaea asiatica have the most symmetric and primitive karyotype in the Ranunculaceae[J]. Acta Phytotax Sin Sinica, 1998, 36(6): 490-495.
- [13] 郑会敏, 冯海嫣, 周海鹏, 等. 野生二粒小麦与二倍体野燕麦远缘杂交后代的核型分析及进化关系[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2011, 37(6): 598-602.
- [14] 谭远德, 吴昌谋. 核型似近系数的分析方法[J]. 遗传学报, 1993, 20(4): 305-311.
- [15] 段瑞君, 任又成, 熊辉岩. 4种青海青稞品种的染色体核型分析[J]. 中国农学通报, 2010, 26(15): 78-82.
- [16] 王利民, 王四清, 董晓宇, 等. 核型似近系数在大花蕙兰杂交育种中的应用初探[J]. 河南农业科学, 2010(8): 106-113.
- [17] 王霖娇. 20种淫羊藿属植物核型似近系数聚类分析和进化距离的估计[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2008, 26(3): 13-16.
- [18] 李红, 秦新民. 金花茶组植物的核型似近系数聚类分析[J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 1997, 15(2): 77-81.
- [19] 李小勤, 冷向军, 吴登俊. 国内主要绵羊品种基于染色体核型进化距离的聚类分析[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2009, 30(3): 27-31.
- [20] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型的标准化问题[J]. 武汉植物学研究, 1985, 3(4): 297-302.
- [21] Stebbins G L. Chromosomal evolution in higher plants [M]. London: Edward Arnold Ltd., 1971, 87-89.
- [22] Arano H. Cytological studies in subfamily *Carduo idae* of Japan: The karyotype analysis and phylogenetic consideration on *Pertya* and *Ainsliaea*[J]. BotMay Tokyo, 1963, 76: 32-39.
- [23] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosome[J]. Hereditas, 1964, 52: 201-220.
- [24] 李峰, 潘沈元. 核型似近系数的聚类分析软件设计[J]. 徐州师范大学学报: 自然科学版, 2005, 23(4): 64-67.
- [25] 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: 335.
- [26] 王尚堃, 全瑞霞, 翟宝黔, 等. 博爱八月黄柿组织培养影响因素研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 36(2): 176-180.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠