

Karyotype Analysis and Influence of Habitats on Chromosomal Variation of Rare Plant *Anemone shikokiana* (Makino) Makino*

Zhi Wang, Yujuan Pang, Chuanlin Liu, Shuhong Zhuang, Fuhua Bian

College of Life Sciences, Yantai University, Yantai
Email: fh_bian@163.com

Received: Sep. 22nd, 2013; revised: Oct. 24th, 2013; accepted: Nov. 2nd, 2013

Copyright © 2013 Zhi Wang et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: *Anemone shikokiana* (Makino) Makino, which has important research values, is a rare plant. The species has two different habitats, the shrubs in mountaintop and understory of the conifer and broad-leaf mixed forest. Karyotype is very important for the other researches of a plant. The chromosome numbers and karyotype of *A. shikokiana* were firstly studied using a traditional squash method and Levan's karyotype analysis standard. The results showed that the karyotype of metaphase chromosomes in somatic cells is as follows: the number of chromosomes is 14, karyotypic formula is $2n = 2X = 14 = 12m + 2t$, the A.S.K% is 56.5%, and the relative length of chromosome is $2n = 2X = 14 = 12L + 2M_1$. For exploring the influences of habitats on chromosomal variation, the morphology of chromosomes was analysed by nested analysis. The results showed that chromosomal variation is not evident between populations in different habitats, but obvious within the same population. So we think that chromosomal variation of *A. shikokiana* presents in the small scope, and chromosomal variation in large scale may cancel each other out because of enough large scale. This study will provide the basis and reference for future work on *A. shikokiana*.

Keywords: *Anemone shikokiana*; Rare Plant; Karyotype; Chromosomal Variation; Habitat

稀有植物山东银莲花(*Anemone shikokiana* (Makino) Makino)的核型分析及其生境对染色体变异的影响*

王 莺, 逢玉娟, 刘传林, 庄树宏, 卞福花

烟台大学生命科学学院, 烟台
Email: fh_bian@163.com

收稿日期: 2013年9月22日; 修回日期: 2013年10月24日; 录用日期: 2013年11月2日

摘 要: 山东银莲花(*Anemone shikokiana*)分布极其狭域, 典型的稀有物种, 具有很高的研究价值。主要分布于含有大量腐殖土的针阔混交林下和含砂壤土的干旱山顶灌丛。植物的核型对其后续研究至关重要, 本研究采用常规压片法和 Levan 的核型分析方法, 首次研究了山东银莲花的染色体数目及核型, 结果表明: 体细胞中期染色体数目为 14, 核型公式为 $2n = 2X = 14 = 12m + 2t$, 核型为“2A”型, 核型不对称系数(A.S.K%)为 56.5%, 染色体相对长度组成为 $2n = 2X = 14 = 12L + 2M_1$ 。为了探索生境对染色体的影响, 对染色体的性状进行了巢式方差分析, 发现不同生境的居群间染色体形态和大小变异不显著, 居群内染色体的形态和大小存在一定程度的变异, 表明山东银莲花染色体的变异存在于小尺度范围内, 大尺度范围的变异可能由于足够大的群体足够多的个体而导致染色体水平的相互抵消。本

*基金项目: 国家自然科学基金项目(31100395)科技基础性工作专项(2013FY112100)。

研究为今后进一步研究打下一定的基础。

关键词: 山东银莲花; 稀有植物; 核型; 染色体变异; 生境

1. 引言

山东银莲花是毛茛科(Ranunculaceae)银莲花属多年生草本植物, 山东省稀有物种^[1]。该植物具有很高的研究价值。首先, 是可开发利用的野生花卉, 由于山东银莲花的花大、洁白, 黄色花蕊点缀其中, 因而在园艺上具有潜在的开发价值, 其次, 在系统学研究上具有重要价值, 以前的资料显示山东银莲花为间断分布于山东半岛沿海地区的山东省特有种, Flora of China 的编写过程中, 研究者发现该种在与山东半岛隔海相望的日本四国岛西北部的石槌山也有分布 (<http://flora.huh.harvard.edu/china/>), 该种植物遗传多样性的研究对研究我国东部和日本植物区系的起源与演化, 以及本属植物的系统演化具有重要的科学价值^[2]。

山东银莲花在中国仅分布于山东昆崙山和崂山海拔 600 m 以上两种典型的生境中: 腐殖土丰富、潮湿的针阔混交林下和砂壤土丰富的干旱山顶灌丛。由于特殊的地理分布区域, 一直以来并未引起重视, 随着环境的变化及旅游开发的人为干扰, 山东银莲花变得越来越稀少。

减少的原因是外界的干扰还是自身的特性或者二者兼有呢、该物种有哪些典型的生物学特征、如何进行开发和利用等诸多问题亟待解决。本研究在作者对其详细调查的基础上, 首先从细胞学的角度对其进行研究, 同时为揭示环境对染色体水平的影响, 通过巢式方差分析研究了染色体的变异, 为今后的开发利用和生态保护研究打下一定的基础。

2. 实验材料和方法

2.1. 实验材料

所有实验材料均采自山东昆崙山, 采集地点信息见表 1。

2.2. 方法

2.2.1. 实验方法

取生长旺盛的根尖, 用 0.1%秋水仙素处理 3 h,

Table 1. Basic information of two plots
表 1. 采集地基本概况

生境	海拔(m)	经纬度	土壤
寒风岭 针阔混交次生林	650	E121°45'40.6" N37°14'55.9"	湿润腐殖土
泰礴顶 山顶灌丛	847	E121°45.5'52.3" N37°14'49.5"	干旱的砂壤土

洗去根尖表面杂质, 卡诺 I(无水乙醇:冰乙酸 = 3:1)固定 2~3 h, 蒸馏水冲洗后置于 1mol/L 盐酸中, 60℃恒温水浴解离 8 min, 漂洗 3 次, 卡宝品红染色, 1 h 后按常规方法压片、封片后显微照相。

2.2.2. 分析方法

(1) 核型分析方法

核型分析中染色体相对长度、臂比和类型均按 Levan 的标准^[3], 核型分类按 Stebbins 的标准^[4], 染色体相对长度系数(I.R.L) = 染色体长度/全体染色体的平均长度, 核型不对称系数 A.S.K = 长臂总长/全组染色体总长, 以上所有计算均取 5 个染色体分散较好的细胞参数的平均值。

(2) 染色体变异的分析方法

不同生境居群间、居群内个体间染色体变异程度采用巢式方差分析。每个居群取 10 个个体, 个体间相距 5 米以上的距离, 每个个体至少取 5 个有效的根尖, 每个根尖测量至少 5 个染色体分散较好的中期分裂相细胞的 3 个性状(染色体长臂、短臂和总长), 个体嵌套于居群、细胞嵌套于个体, 采用 Spss 13.0 统计学分析软件对染色体的长臂、短臂和总长的相对长度进行变异分析。巢式方差分析模型为:

$Y_{ijkl} = \mu + S_i + T(i)j + R(i)k + \varepsilon(ijk)l$, 式中 Y_{ijk} = 第 i 个个体第 j 个细胞第 k 次观测值; Y_{ijkl} = 第 i 个个体第 j 个细胞第 k 次重复第 l 次的观测值; μ = 总体平均值; S_i = 第 i 个个体的效应(固定); $T(i)j$ = 第 i 个个体第 j 个细胞的效应(随机); $R(i)k$ = 第 i 个个体第 j 个细胞第 k 次重复效应(固定); $\varepsilon(ijk)l$, 即实验误差。

3. 结果与分析

3.1. 山东银莲花的核型

山东银莲花的中期染色体形态见图 1(a)、核型模式图见图 1(b)、核型见图 1(c)，核型分析参数见表 2。

山东银莲花体细胞染色体数目为 14，其核型公式为： $2n = 2X = 14 = 12m + 2t$ ，核型为“2A”型，核型不对称系数 A.S.K%为 56.5%，染色体相对长度组成为 $2n = 2X = 14 = 12L + 2M_1$ 。

3.2. 山东银莲花染色体的变异

采用 Spss 13.0 统计学分析软件对染色体的长臂、短臂和总长的相对长度进行变异分析，结果见表 3。表明无论长臂、短臂还是总长居群内个体间、个体内细胞间 $P < 0.05$ ，表明差异显著，染色体存在一定程度的变异，而居群间 $P > 0.05$ ，表明差异不显著，染色体之间没有变异。F 值越大说明处理之间差异效果越明显、误差项越小，说明试验精度越高。本实验中居群内个体间、个体细胞间的 F 值均比居群间的 F 值大，与 P 值反应结果一致，表明本实验处理合适。

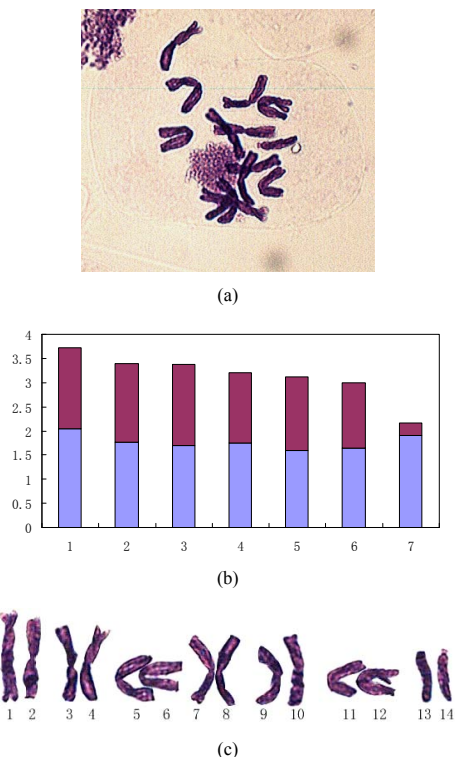


Figure 1. The chromosomes (a), karyotype (c) and ideogram (b) of *Anemone shikokiana*
图 1. 山东银莲花的染色体形态(a)、核型(c)和核型模式图(b)

4. 讨论与分析

4.1. 银莲花属植物的核型

一个完整的核型不仅包括染色体总长、臂比，还包括异染色质结^[5]、染色质凝聚方式等^[6]，染色体特征的描述对于植物细胞学、基因组学、分类学以及多倍体的进化等都至关重要^[7]。

YANG Qin-Er 报道了 10 种银莲花属植物的染色体数目及核型，其中 4 种为 $x = 7$ 的二倍体($2n = 2x = 14$)，而且这四种的核型十分相似，均由 6 对大型具中部着丝点的染色体和 1 对具端部着丝点的染色体组成^[8]。本研究也出现了极为相似的结果，核型公式是 $2n = 2X = 14 = 12m + 2t$ 。YANG Qin-Er 报道中的这几种分别采自中国西南的中甸、维西、大理，与山东烟台相隔甚远，表明银莲花属植物的染色体形态及核型较为保守，没有因为地理位置的差异而有较大的变化。

本研究所分析的所有个体和细胞中未发现染色体数目的变化，从表 3 可以看出，生境相差很大的两

Table 2. The parameters of chromosomes in somatic cells of *Anemone shikokiana*
表 2. 山东银莲花的核型参数

序号	长臂	短臂	臂比	着丝点位置	相对长度	染色体类型
1	2.05	1.67	1.23	m	17.04	L
2	1.77	1.62	1.18	m	15.52	L
3	1.7	1.67	1.02	m	15.44	L
4	1.75	1.45	1.21	m	14.66	L
5	1.6	1.51	1.06	m	14.24	L
6	1.64	1.35	1.21	m	13.7	L
7	1.90	0.27	6.96	t	9.94	M1

Table 3. The analysis of chromosomal variation in somatic cells of *Anemone shikokiana*
表 3. 山东银莲花的染色体变异分析结果

	Source	Mean Square	F	Sig.(p)
染色体长臂	居群间	0.704	0.079	0.779
	个体间(居群内)	536.525	60.070	0.000
	个体细胞间	133.144	14.907	0.000
染色体短臂	居群间	48.620	1.153	0.284
	个体间(居群内)	253.797	6.020	0.000
	个体细胞间	80.306	1.905	0.007
染色体总长	居群间	37.620	0.649	0.421
	个体间(居群内)	1502.128	25.905	0.000
	个体细胞间	412.646	7.116	0.000

个居群间染色体不存在明显的相对长臂、短臂和总长长度的变异,着丝点的位置也没有大的变化,结合银莲花属植物染色体的保守性,进一步证明了山东银莲花的染色体水平高度保守。然而居群内个体间、个体细胞间却存在一定程度的变异,王峻玉和杜道林研究发现不同居群海南粗榧染色体的变异 90%来自于居群内,只有 10%来自于居群间^[9];卞福花等也发现萱草属植物染色体的变异主要来自居群内^[10],与本研究结果基本一致。表明山东银莲花居群内基因交流频繁,染色体的变异主要存在于小尺度范围内,大尺度范围的变异可能由于足够大的群体足够多的个体导致染色体水平上变异的相互抵消。

4.2. 生境对物种的影响

每种生物都生存于特定的生境结构中,生存和繁衍在一定程度上受到生境要素的限制,并随生境要素(如温度、光照、湿度、降雨量、土壤基质等)的改变而发生相应的变化。陈玲玲等认为小葱(*Allium ascalonicum* L.)染色体的变化与环境有关,甚至认为 B 染色体的出现是为了适应低温而产生^[11]。Hugh A. Young 等也发现生活在高地和低洼地不同生态型的柳枝稷(*Panicum virgatum* L.)的染色体及核型存在很大不同^[12],而且遗传标记研究结果表明不同生态型之间的基因流是双向的^[13]。山东银莲花主要分布于两种不同的生境中,一是光照弱、湿度大、腐殖土丰富的针阔混交林下;另一种光照强、干旱、砂壤土丰富的山顶灌丛,两种相差很大的生境理应对山东银莲花的生物学特性及其内部结构产生相应的影响。本研究从染色体的形态特征考虑,居群间并未发现大的变异,我们认为并不是环境的差异对染色体的数目及形态没

有影响,而是大尺度范围内,居群内长期的双向基因交流抵消了染色体形态上的变化。但是染色体内部结构的变化是否存在,仅通过此种技术还不能解决,尚需通过其它手段如原位杂交等技术进行研究。因此实验分析结果对以后关于山东银莲花的其他研究提供一个参考依据和基础,仍需更进一步其他方面的研究。

参考文献 (References)

- [1] 王仁卿 (1993) 山东稀有濒危保护植物. 山东大学出版社, 济南, 80.
- [2] 侯元同, 刘冰 (2010) 山东银莲花. *百科知识*, **12**, 40.
- [3] Levan, A.K. and Fredga, G. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, **52**, 197-200.
- [4] Stebbins, C.L. (1971) Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold, Ltd., London, 87-93.
- [5] Kato, S. and Fukui, K. (1998) Condensation pattern (CP) analysis of plant chromosomes by an improved chromosome image analysing system, CHIAS III. *Chromosome Research*, **6**, 473-479.
- [6] McClintock, B. (1930) A cytological demonstration of the location of an interchange between two non-homologous chromosomes of *Zea mays*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **16**, 791-796.
- [7] Harper, L.C. and Cande, W.Z. (2000) Mapping a new frontier; development of integrated cytogenetic maps in plants. *Functional & Integrative Genomics*, **1**, 89-98.
- [8] Yang, Q.E. (2002) Cytology of ten species in *Anemone*, one in *Anemoclema* and six in *clematis* (Trib. Anemoneae, Ranunculaceae) from China. *Journal of Systematics and Evolution*, **40**, 396-405.
- [9] 王峻玉, 杜道林 (2004) 不同海南粗榧种群核型及其变异研究. *海南师范学院学报(自然科学版)*, **17**, 50-58.
- [10] 卞福花, 张敏, 王建生 (2006) 崑崙山萱草属植物细胞学研究及其应用分析. *安徽农业科学*, **34**, 833-835.
- [11] 陈玲玲, 张珍珍, 赵露露, 等 (2011) 小葱(*Allium ascalonicum* L.)的染色体多态性研究. *热带作物学报*, **32**, 2209-2213.
- [12] Young, H.A., Sarath, G. and Tobias, C.M. (2013) Karyotype variation is indicative of subgenomic and ecotypic differentiation in switchgrass. *BMC Plant Biology*, **12**, 1-12.
- [13] Zhang Y.W., Zalapa, J., Jakubowski, A.R., et al. (2011) Natural hybrids and gene flow between upland and lowland switchgrass. *Crop Science*, **51**, 2626-2641.