

浮萍形态分类鉴定与染色体观察

薛慧玲¹, 张云峰¹, 陈祈磊¹, 赵海², 李红梅¹

(1. 成都大学 生物产业学院, 四川 成都 610106; 2. 中国科学院 成都生物研究所, 四川 成都 610041)

摘要:以采集自国内外多个地区的浮萍种群样本为试材, 采用形态分类、显微镜观察等方法, 通过叶片大小、叶脉、根数目、叶背颜色、根鞘、根尖等指标对采集样本进行了系统分类鉴定, 并对样本染色体数目进行研究。结果表明: 浮萍基因组较小, 染色体变异较多, 且染色体数目变异较大, 从 $2n=20, 30, 40, 60$ 不等。该试验建立了简便的形态学分类系统, 为浮萍的分类和细胞学研究提供了依据。

关键词:浮萍; 叶片; 根; 形态; 染色体

中图分类号:Q 949.71⁺7.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0088-05

浮萍科共有 4 属 38 种^[1-2], 是世界上最小的开花单子叶植物。一般在水面漂浮生长^[3], 形态高度退化, 生长速度快, 淀粉、蛋白质含量高, 是作为转基因载体、模式植物、能源生产的一种新型植物材料。世界各地利用浮萍进行废水治理、新能源生产的研究日趋热烈, 对浮萍科植物的形态特征、生长特性、分类鉴定等基础研究显得尤为重要。在浮萍的实际应用中, 对具有优良性能的品种进行快速的分类鉴定, 是对其进行应用开发的基础之一。

早期许多分类学家建立了使用次生代谢产物黄酮进行的分类数据, 由于不同科属间植物体内黄酮产物呈多样性表达, 利用化学法对浮萍进行分类的方法使用并

不广泛^[4-6]。Landolt^[1-2]多年来根据浮萍的属间和种间特点建立了 1 个系统的索引分类目录, 利用 41 个分类特征对 4 属 37 种浮萍进行了详细的区分和归类, 该方法需要长期的观察经验和分析手段。目前, 我国浮萍科植物的分类、命名与生理生态研究等工作还处在初级阶段, 尚鲜见相关方面的系统研究, 阐明浮萍科植物的分类系统和生理生态特征将为掌握浮萍种质资源及综合开发利用提供理论基础。

浮萍的基因组较小, 约为 150~1 600 Mb^[7]。细胞学观察仅有 1980 年 Urbanska-Worytkiewicz 等进行过初步的染色体观察, 由于染色体较小, 存在一定的困难^[8]。在国内目前仅在衰老机理等方向进行了初步探索^[9-11]。可以克隆生长、形态重塑和基因组较小等特点使得浮萍在实验室进行分子方向的应用具有许多优点^[12-16], 研究浮萍的基因多样性或者通过基因工程增强浮萍的基因多样性可以扩展浮萍的商业用途^[17-20]。

第一作者简介:薛慧玲(1981-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为植物资源与新能源开发。E-mail: findlot@sohu.com.

收稿日期:2014-03-19

Thinking About Cultural Characteristics of Small Garden Ornaments in Landscape Design

CHEN Ke-ping, FAN Chuan-jun

(College of Art, Harbin University of Science and Technology, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: Small garden ornaments are the vital part of landscape system. Moreover, they are the symbol of the period and the region. Small garden ornaments have not only decorative functions and applicative functions but also cultural characteristics. Cultural characteristics of small garden ornaments are vitally concerned by designers and public increasingly. The excellent design works of small garden ornaments are created by the designers who understand cultural characteristics of small garden ornaments deeply and exactly. The cultural characteristics of small garden ornaments was explored during the design process in three aspects including investigating to the cultural background of work location thoroughly, detecting and protecting region culture emphatically and transmitting positive cultural.

Key words: small garden ornament; design; cultural characteristic

该研究采集样本中紫萍和绿萍 2 属的形态特征及系统关系,对采集样本进行系统分类,为研究品种间的关系和进一步应用开发提供基础。并进行了浮萍样本的染色体观察,以了解浮萍科植物的染色体形态和基因组等相关信息,为浮萍种质资源的保存及基因工程应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

浮萍自野外采集后,采用人工废水(尿素:磷酸二氢钾=2:1,加入适量腐殖土)室外培养备用。各样品的相关信息见表 1。

表 1 浮萍样品与采集地

属	序号	样本编号	采集地	经纬度	海拔/m
绿萍属	1	G	四川广汉	30°58'34.25"N,104°16'56.75"E	478
	2	S3-1	成都簇桥	30°36'39.18"N,104°09'13.01"E	506
	3	Z	四川自贡	29°46'31.70"N,104°51'03.82"E	338
	4	J-2	成都簇桥	30°36'40.00"N,104°19'17.76"E	507
	5	V9	越南河内	21°04'22.34"N,105°49'07.26"E	10
	6	V8	越南胡志明市	10°47'09.85"N,106°40'29.93"E	1
	7	5#	西藏	29°38'56.86"N,94°21'41.36"E	4 314
	8	P1	成都浦江	30°11'49.66"N,103°30'23.35"E	515
	9	SS	成都活水公园	30°46'08.48"N,104°05'27.76"E	496
	10	CYH	成都浦江朝阳湖	30°9'46"N,103°26'57"E	536
	11	V3	越南胡志明市	10°47'09.64"N,106°40'52.77"E	5
	12	2#	四川广元	32°13'29.43"N,106°17'44.88"E	598
	13	Q2	四川邛崃	30°24'54.48"N,103°27'45.71"E	504
	14	V4	越南河内	10°47'35.01"N,106°37'44.87"E	2
	15	6#	成都简阳	30°38'40"N,104°53'77"E	360
	16	V7-1	越南河内	21°17'15.12"N,106°09'25.46"E	59
	17	WSC	成都簇桥	30°36'39.18"N,104°09'13.01"E	506
	18	J-1	成都簇桥	30°36'46.80"N,104°09'08.15"E	504
	19	4#	成都	30°39'30.97"N,104°03'53.49"E	498
紫萍属	1	YN7	成都	30°39'30.97"N,104°03'53.49"E	498
	2	V7	越南河内	21°17'15.12"N,106°09'25.46"E	59

浮萍人工培养液:自来水添加尿素:磷酸氢二钾为 2:1,于培养器皿底部覆盖 2 cm 左右腐殖土以促进生长。席夫试剂:将蒸馏水煮沸,加入碱性品红,冷却至 50℃加入 1 M HCl,然后倒入已加有偏重亚硫酸钠的容器中,加蒸馏水定容,避光密封过夜。如褪色至茶色或无色,即可使用。如未褪色则需加入活性炭。1%醋酸洋红溶液:100 mL 45%煮沸后加入洋红粉 1 g 搅拌使洋红溶解,溶液冷却后定容,备用。固定液:95%乙醇:冰醋酸=3:1。

Motic SMZ-140 SERIES 显微镜;YJ-875 型医用超净工作台;GZ-300GSI 智能人工气候箱(韶关市广智科技设备发展有限公司);4℃冰箱(海尔)。

1.2 试验方法

1.2.1 浮萍形态学观察 肉眼或放大镜下观察:叶片大小、叶片形状、叶片是否扁平或中部隆起、叶缘形态、叶脉数目、叶背颜色、根数目、根长度、叶片出芽方式。显微镜下观察:有无根鞘、根尖钝或锐角。根据观察指标

对浮萍进行分类鉴定。

1.2.2 根尖染色体观察 采集数株浮萍样品,用自来水清洗干净。饱和 α -溴萘 4℃浸泡 24 h。乙醇:冰醋酸(3:1)固定液 4℃处理 24 h。置 70%乙醇溶液中浸泡存贮备用。制片前,用 1 M HCl 60℃作用 3~5 min,以解离染色体。将根部于席夫试剂中染色,待根尖变红后,用解剖刀或解剖针将根尖部分切下。于载玻片中央滴加醋酸洋红溶液,取出根尖置于醋酸洋红溶液中,用刀片尽量切碎根尖,并用解剖针搅匀,放置 10 min 左右,从一侧缓慢盖片。采用滤纸按住盖玻片,用解剖针柄轻敲击至根尖基本变碎。用滤纸盖盖玻片,拇指用力按压(切勿拖片)。滤纸吸取玻片边缘多余染液,置显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 紫萍属的形态分类鉴定

浮萍科植物根据根、叶、花、果实的形态和解剖特征,可分为紫萍(*Spirodela*)、绿萍(*Lemna*)、扁平无根萍(*Wolffiella*)、芜萍(*Wolffia*)4 个属共 38 个种。

浮萍 4 属中,*Wolffiella* 在我国没有分布,*Wolffia* 形似绿色鱼籽,为颗粒状,易于与具有叶片的其它 3 属分开(图 1a)。紫萍属(*Spirodela*)叶背为紫色,可直接与其它 3 属分开(图 1b)。多根紫萍(*Spirodela polyrrhiza*)叶片较大,约 4~8 mm 左右,扁平,多脉,每颗具根 5 条以上(图 1b、d);少根紫萍(*Spirodela punctata*)叶片较小 1~2 mm,单脉,中部隆起,每颗具根 5 条以下(图 1c);*Spirodela intermedia* 叶片大小类似多根紫萍,但中部隆起具单脉又似少根紫萍,其名称反应了其特性,名为 *Intermedia*,介于多根紫萍和少根紫萍之间(图 1a、b)。

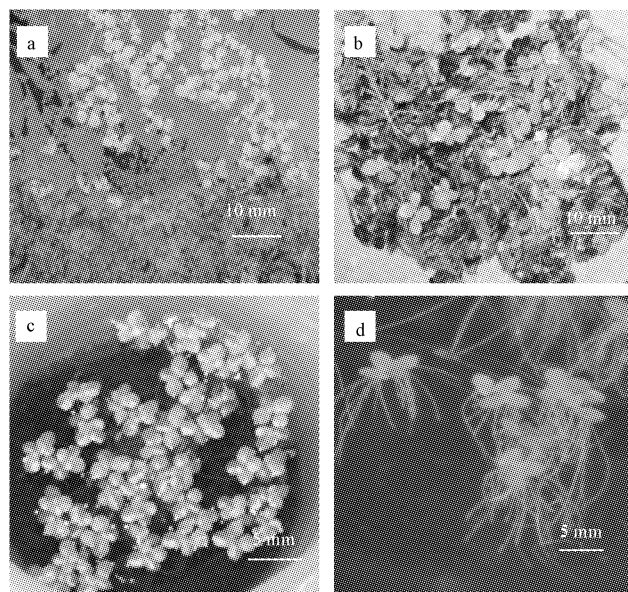


图 1 不同种属的浮萍形态

注:a.多根紫萍和芜萍;b.多根紫萍背面观;c.少根紫萍;d.多根紫萍根系。

2.2 绿萍属的形态分类鉴定

绿萍属叶背为绿色,单根,与其它属差异明显,由于个体微小,不同种间的形态极为类似,需借助显微镜甚至其它手段,才能准确分辨。

由图 2 可知,绿萍不同样本根尖形态主要有钝角和锐角 2 种形态(图 2 a-b)。根鞘根据种属不同,分为有根鞘(图 2 d-e),无根鞘(图 2 c)2 种情况。试验对采集样本进行了根尖形态和根鞘的观察,结果记录于表 2。

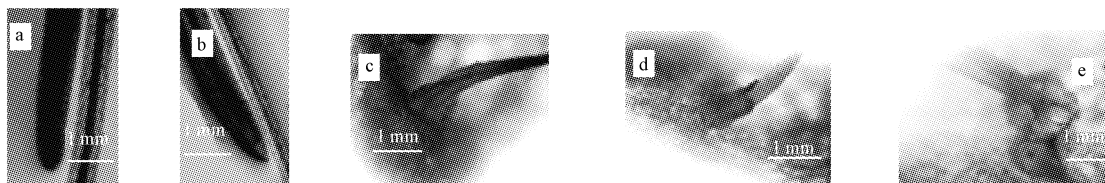


图 2 绿萍的根尖观察结果

注:a. 根尖呈钝角;b. 根尖呈锐角;c. 无根鞘;d,e. 具根鞘。

表 2 部分绿萍品种分类结果

	G	S3-1	Z	J-2	V9	V8	5#	P1	SS	CYH	V3	2#	Q2	V4	6#	V7-1	WSC	J-1	4#
叶脉	多	单	多	单	多	多	单	单	单	单	单	单	单	多	多	多	单	多	单
叶片大小/mm	长	4	3	4	4	4	2	3	3	3	2	3	2	3	3	3	3	3	3
	宽	3	2	2	3	3	2	2	3	2	1	2	1	2	2	2	2	3	2
成簇叶片数/片	2~3	3~4	3	4	1~3	3	3~4	3	5	7	3	4	3~4	3	3	5	4	3	4
有无根鞘	√	√	√	×	√	×	×	√	×	√	√	×	×	×	×	√	×	×	√
叶片是否隆起	√	√	√	√		√	√	√	√	√	√	√	√		√	√	√	√	√
是否有休眠体	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	√	—	—	×	—	×	—
叶腹是否有红色	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	√	×
根尖形态(锐或钝角)	锐	钝	锐	钝	锐	锐	钝	锐	锐	钝	锐	钝	锐	锐	钝	锐	钝	钝	锐
根长/mm	22	27	24	32	59	10	25	24	33	53	19	55	19	15	45	25	27	9	47
根尖有无附属物	√	×	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

注:× 为无,√ 为有,— 为未观察到。

由表 2 可以看出,G、Z、V9、V8、V4、6#、V7-1、J-1 8 个样品叶片具多脉,其余 11 个种叶片具单脉,可分为 2 群。在 8 种叶片多脉样品中,V8、V4、6#、J-1 根鞘有翼,G、Z、V9、V7-1 根鞘无翼,可进而分为 2 个亚群;其中 V8、6# J-1 叶面隆起,V4 叶片呈不明显的扁平状,G、Z、V7-1 叶面呈隆起状,V9 叶片呈扁平状。由表 1 显示结果可得出 V8、6#、J-1 为 *L. perpasilla*,G、Z、V7-1 为 *L. gibba*,V9 为 *L. minor*。在 11 种单脉样品中 S3-1、P1、CYH、V3、4# 5 个种根鞘有翼鉴定为 *L. aequinoctialis*,J-2、5#、ss、2#、Q2、WSC 6 个种为 *L. minuta*。

根据分类结果,形成简化的分类标准(图 3),如有无根、叶背颜色、根的数目、根鞘、叶脉等。简化的快速分类标准可以将采集样品快速分类鉴定,便于后续纯种培养、保藏以及资源化管理和利用等工作的进行。

2.3 浮萍根尖染色体观察

选取绿萍、多根紫萍、少根紫萍 3 种中代表种群 Y11、V7、YN7 的样品进行根尖染色体观察,建立浮萍 2 属植物的根尖染色体观察方法,为采集浮萍资源提供细胞学数据。并对 3 个代表种群的染色体进行计数。由图 4 可知,绿萍 Y11 染色体数目 $2n=46、60$,多根紫萍 V7 染色体数目 $2n=20$,少根紫萍 YN7 染色体数目 $2n=30、40$ (图 4)。浮萍染色体观察结果表明浮萍染色体具有 2 个特点:一是染色体极小,二是种内染色体数目变

有根

- 叶背紫色 *Spirodela*
 - 根>3条
 - 叶面凸起.....*S.intermedia*
 - 叶面扁平.....*S.polyrhiza*
 - 根<3条.....*S.punctata*
- 叶背绿色 *Lemna*
 - 叶片具单脉
 - 根鞘有翼.....*L.aequinoctialis*
 - 根鞘无翼.....*L.minuta*
 - 叶片具多脉
 - 根鞘有翼.....*L.perpasilla*
 - 根鞘无翼
 - 叶面凸起.....*L.gibba*
 - 叶面扁平.....*L.minor*
- 无根.....*Wolffia*

图 3 浮萍形态快速分类索引

异较大。

据报道,浮萍科植物的染色体数目变异较大,有 20、30、40、50、60、70、80 等多种数目,其中 40 条最为常见,即使在同一种内不同种群间的数目仍有较大变化,且染色体较小,不易观察计数(图 5)^[17,21,23]。多根紫萍的基因组仅有 150 Mb 左右^[7],其染色体约 0.1~0.5 μm ,是世界上开花植物中最小的染色体^[22]。这也反映了浮萍在长期的进化过程中,为适用水生环境,形态不断高度退化的同时染色体基因组也发生了相应的变异,趋于多样

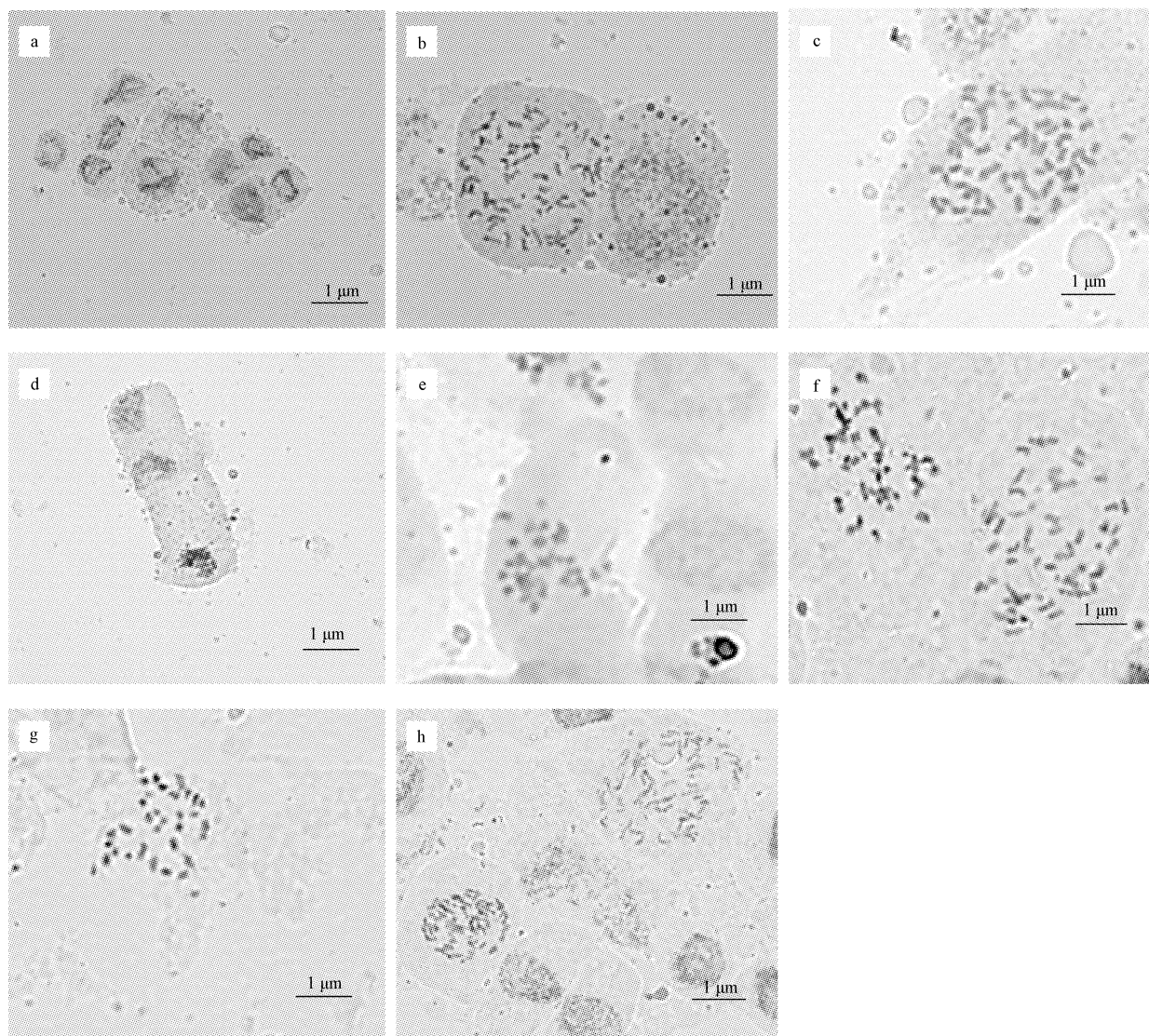


图4 浮萍染色体观察

注:a. 绿萍 Y11 分裂前期;b,c. 绿萍 Y11 分裂中期染色体;d. 绿萍 Y11 分裂后期;e. 多根紫萍 V7 染色体;f,g. 少根紫萍 YN7 染色体;h. 少根紫萍 YN7 分裂期不同形态(1 000×)。

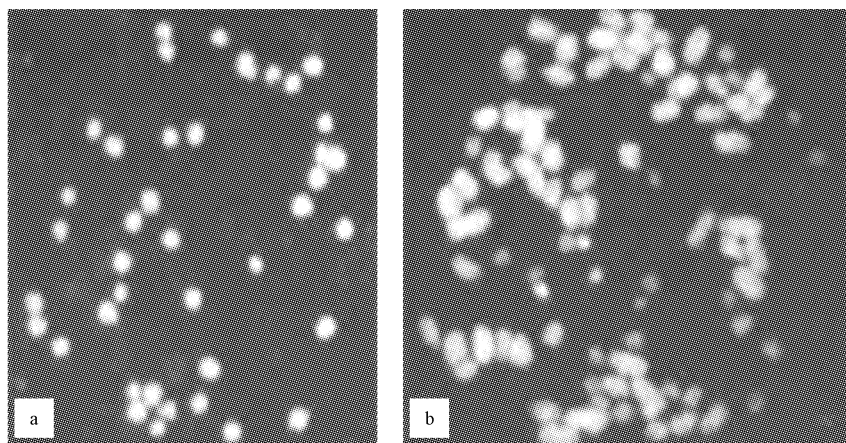


图5 多根紫萍和绿萍染色体

注:a. 多根紫萍;b. 绿萍(DAPI 荧光染色,G. Geber 拍摄)^[21]。

化。染色体数目多样性将为浮萍资源多样性的提供一个重要参考。此外,由于浮萍染色体过小,尝试开发新的镜头或硬件设备也是浮萍染色体观察和核型分析中今后的工作方向。

3 讨论与结论

该研究对收集浮萍样品中的 20 余种进行了形态学分类研究,建立浮萍快速分类方法。对采集浮萍样本进行了形态分类鉴定和染色体观察,为我国浮萍资源的鉴定、保护和应用提供了系统分类学数据。根据叶片大小、颜色、形态、叶脉、有无根鞘、根长、根尖形态可将浮萍样本分为 2 属多种。染色体观察结果显示浮萍基因组较小,染色体变异较多,并观察到染色体数目变异较大,从 $2n=20,30,40,60$ 不等。开发成熟的染色体观察及核型分析方法还将是今后的努力方向。

参考文献

- [1] Landolt E. The family of *Lemnaceae* a monographic study[M]. Zurich: Veröff Geobot Inst ETH,1986;561-563.
- [2] Landolt E. Taxonomy and ecology of the section *Wolffia* of the genus *Wolffia* (Lemnaceae) [M]. Zurich: Veröff Geobot Inst ETH,1994;137-151.
- [3] Les D H, Landolt E, Crawford D J. Systematics of the *Lemnaceae* (duckweeds); inferences from micromolecular and morphological data[J]. Plant Systematics and Evolution,1997,204(3):161-177.
- [4] McClure J W. Taxonomic significance of the flavonoid chemistry and the morphology of the *Lemnaceae* in axenic culture[D]. Austin: University of Texas,1964.
- [5] McClure J W. A chemotaxonomic study of *Lemnaceae*[J]. Amer J Bot, 1966,53(9):849-860.
- [6] Alston R E. Chemotaxonomy of biochemical systematics[M]. New York:Academic Press,1966;33-56.
- [7] Todd P M, Randall K, Joachim M, et al. Genome sequencing of the duckweed *Spirodela polyrrhiza*: a biofuels, bioremediation and carbon cycling crop[R]. CSP Letter of Intent ID: CSP_LOI_793583.
- [8] Urbanska W K. Cytological variation within the family of *Lemnaceae* [M]. Zurich: Veröff Geobot Inst ETH,1980;30-101.
- [9] 刘翠敏,陶汉林,熊延,等. 浮萍植物中一个衰老下调基因的初步鉴定[J]. 南开大学学报,2004,37(1):69-74.
- [10] 王友如. 浮萍中一个新 *rbcS* 基因启动子的克隆及分析[J]. 分子植物育种,2010,8(1):41-44.
- [11] 刘翠敏,熊延,王淑芳,等. 紫萍 P143 品系植物 *rbcS* 基因的 cDNA 克隆与表达[J]. 植物生理学通讯,2002,38(3):221-224.
- [12] Bengtsson B E, Juvy P B, Britta E. 作为发展中国家热带环境毒理学生物测定的浮萍(*Lemna aequinoctialis*) [J]. Ambio,1999(2):152-155.
- [13] Krishna K B, Polprasert C. An integrated kinetic model for organic and nutrient removal by duckweed-based wastewater treatment (DUBWAT) system[J]. Ecological Engineering,2008,34(3):243-250.
- [14] Ran N, Agami M, Oron G. A pilot study of constructed wetlands using duckweed (*Lemna gibba* L.) for treatment of domestic primary effluent in Israel[J]. Water Research,2004,38(9):2241-2248.
- [15] Bengtsson B E, Tran T. 木薯淀粉废水毒性-Microtox 和浮萍测定[J]. Ambio,1994,8:473-477.
- [16] Cheng J J, Stomp A M. Growing duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed[J]. Clean-Soil Air Water,2009,37(1):17-26.
- [17] Moon H K, Stomp A M. Effects of medium components and light on callus induction, growth, and frond regeneration in *Lemna gibba* (Duckweed) [J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant,1997,33(1):20-25.
- [18] Gunter E A, Kapustina O M, Popeiko O V, et al. Induction of β -1, 3-glucanase in callus cultures *in vitro*[J]. Biochemistry,2008,73(7):826-832.
- [19] Gunter E A, Popeiko O V, Ovodov Y S. Production of polysaccharides by callus cultures of common duckweed [J]. Applied Biochemistry and Microbiology,2008,44(1):104-109.
- [20] Li J, Jain M, Vunsh R, et al. Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna*[J]. Plant Cell Rep,2004,22(7):457-464.
- [21] Landolt E. Biosystematische untersuchungen in der familie der Wasserlinsen (Lemnaceae) [J]. Folia Geobotanica et Phytotaxonomica, 1982, 17 (1):48.
- [22] Fredga K, Kihlman B A, Bennett M D. Chromosomes Today[M]. Edinburgh: Springer Netherlands,1991:118.
- [23] Crawford D J, Landolt E, Donald H L, et al. Allozyme variation within and divergence between *Lemna gibba* and *L. disperma*: Systematic and biogeographic implications[J]. Aquatic Botany,2005,83(2):119-128.
- [24] Li J M, Vunsh J R, Vishnevsky J, et al. Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna*[J]. Plant Cell Rep,2004,22(7):457-464.

Morphological Identification and Chromosome Observation of Duckweed

XUE Hui-ling¹, ZHANG Yun-feng¹, CHEN Qi-lei¹, ZHAO Hai², LI Hong-mei¹

(1. Faculty of Biotechnology Industry, Chengdu University, Chengdu, Sichuan 610106; 2. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, Sichuan 610041)

Abstract: Taking duckweed populations collected from some countries and regions as materials, using morphological classification, microscope observation method, the samples were identified through observation of size and vein of leaf, numbers of root, color of back of leaf, root sheath and root tip, number of chromosome was observed. The results showed that duckweed genome was less, variation of chromosome and their number were more, from $2n=20,30,40,60$. The results made a simple systematics of duckweeds inferred from morphological data found. It was important for the research of cytology and systematics of duckweed.

Key words: duckweed; leaf; root; morphology; chromosome