

# 六个金银花栽培品种的核型分析

张力鹏, 郑书行, 徐仲凯, 朱哲凡, 罗 思, 陈成彬

(南开大学 生命科学学院, 天津 300071)

**摘 要:**以6个金银花栽培品种的茎尖组织为试材,采用常规压片法进行染色体制片和核型分析,为良种选育提供细胞学基础。结果表明:6个金银花品种的染色体基数均为  $x=9$ ,其中“九丰1号”是经大毛花加倍而成的同源四倍体,其核型公式为  $2n=4x=36=4m+24sm+8st$  (3SAT),属3A型,其余品种均为二倍体。“小鸡爪”的核型公式为  $2n=2x=18=4m+8sm+6st$  (2SAT),属3A型;“鸡爪花”的核型公式为  $2n=2x=18=2m+8sm+8st$  (4SAT),属3B型;“大毛花”的核型公式为  $2n=2x=18=2m+14sm+2st$ ,属3A型;“四季金银花”的核型公式为  $2n=2x=18=2m+10sm+6st$  (4SAT),属3A型;菰腺忍冬的核型公式为  $2n=2x=18=4m+14sm$ ,属2A型。核型不对称系数表明菰腺忍冬在进化上较为原始。“小鸡爪”“大毛花”“九丰1号”“四季金银花”都属3A类型,表明这4个品种在进化上亲缘关系最为密切。

**关键词:**金银花;染色体制片;核型分析

**中图分类号:**S 567.7<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)06-0103-05

金银花(*Lonicera japonica* Thunb)属忍冬科(Caprifoliaceae)忍冬属(*Lonicera* Linn)多年生半常绿缠绕灌木,植物的干燥花蕾或带初开的花<sup>[1-2]</sup>。其茎呈褐色或红褐色,幼枝密生绒毛和腺毛,单叶对生,卵形至卵状椭圆形,全缘,叶柄短,花成对,花萼5裂,因其初开花为白色,3~4 d后转黄色,黄白相间,故称金银花。由于其花蕾(金银花)和茎枝(忍冬藤)能清热解毒,茎有通络作用,常用于中医诊疗处方<sup>[3]</sup>,是我国大宗药材之一,在全国各地广有栽培。

核型分析是依据染色体组在有丝分裂中期时的表型,如数目、大小、长度、着丝点位置、臂比、随体等形态特征,分析染色体变异情况,是研究物种进化、鉴别新品种的重要手段<sup>[4]</sup>。由于我国金银花栽培时间久,自然和人工选择使得金银花种质资源发生显著的变异和分化,从而在质量和产量方面出现明显的差异<sup>[5-6]</sup>。因此采用核型分析技术对金银花的种

质资源进行鉴定,从而为其良种选育提供细胞学基础。目前已有学者对忍冬属的染色体进行了研究,确定了金银花染色体数目为  $2n=18$ <sup>[7-9]</sup>;汪冶等<sup>[10]</sup>、武欣等<sup>[11]</sup>分别对灰毡毛忍冬和红白忍冬的核型进行了分析;王飞等<sup>[12]</sup>证实药用植物金银花和金银忍冬具有相同的染色体数目;李晓玲等<sup>[13]</sup>不仅优化了树形金银花染色体的制片方法,而且通过染色体分析认为栽培种较野生型更为进化;杨进等<sup>[4]</sup>比较了2种栽培种和野生种金银花的核型。该试验对6个栽培品种金银花的核型进行了分析,以期为其品种鉴定和良种选育提供细胞学上的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试金银花品种“四季金银花”“小鸡爪”“鸡爪花”“大毛花”采自山东平邑金银花繁育基地,“九丰1号”(“大毛花”人工加倍获得的同源四倍体)、菰腺忍冬(*Lonicera hypoglossa* Thunb)采自北京顺义山东平邑九间棚基地。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 植物染色体制备** 该研究中金银花品种染色体的制备采用改良的卡宝品红压片法<sup>[14-15]</sup>。具体方法如下:09:00取生长旺盛的幼芽,并用镊子剥离茎尖分生组织,放入饱和的对二氯苯水溶液中处理

**第一作者简介:**张力鹏(1989-),男,博士研究生,研究方向为分子细胞遗传学。E-mail:lipengzhang@mail.nankai.edu.cn.

**责任作者:**陈成彬(1972-),男,博士,副教授,研究方向为遗传学。E-mail:chenchb@nankai.edu.cn.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31371249);天津市自然科学基金重点资助项目(13JCZDJC29000)。

**收稿日期:**2016-12-12

3 h;卡诺固定液甲醇:冰醋酸(3:1)固定1 h;蒸馏水洗3~4次,1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 45℃解离45 min;蒸馏水洗3~4次,用卡宝品红染色2 h,常规压片,用Nikon 80i显微镜观察并将分散良好的染色体用SPOT RT KE冷CCD照相。

1.2.2 染色体核型分析 依照李懋学等<sup>[16]</sup>在第一届全国植物染色体学术讨论会中所提出的染色体核型标准,染色体核型分析一般以植物体细胞染色体数目为准,并且统计的细胞数目在30个以上。该研究选取30个处于有丝分裂中期的细胞,利用半自动核型分析方法<sup>[15]</sup>计算染色体的数目、相对长度、臂比值、核不对称系数等。核型分类依据STEBBINS<sup>[17]</sup>提出的最长染色体与最短染色体之比和臂比值>2的染色体所占比例及ARAN<sup>[18]</sup>提出的核不对称系数(As, K%)的原则。按照LEVAN等<sup>[19]</sup>提出的以染色体臂比确定着丝点位置,依照KUO等<sup>[20]</sup>提出以染色体相对长度系数的分类标准进行核型分析。

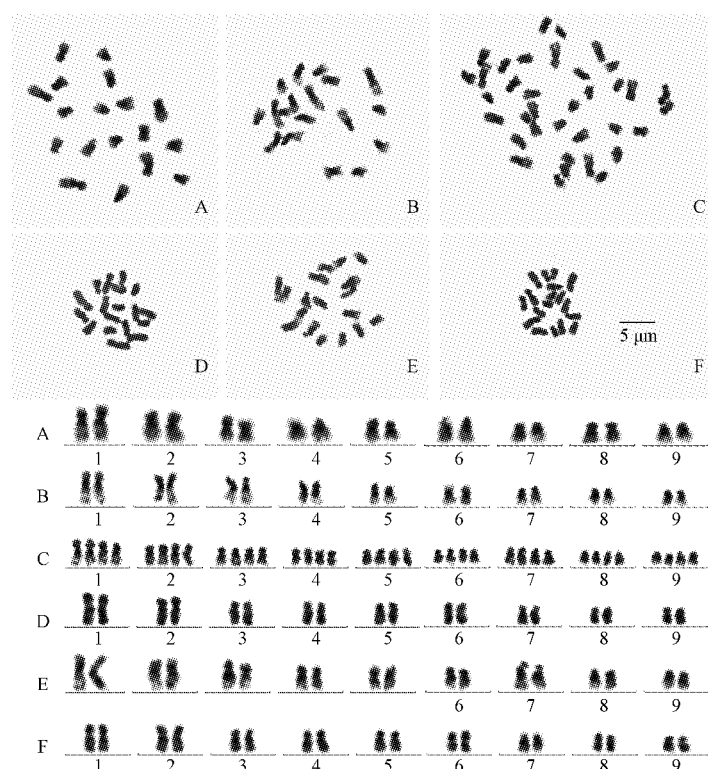
## 2 结果与分析

染色体分析结果表明,金银花的染色体基数均

为 $x=9$ ,其中“小鸡爪”“鸡爪花”“大毛花”“四季金银花”和菰腺忍冬为二倍体 $2n=2x=18$ ,而“九丰1号”为四倍体 $2n=4x=36$ 。6个金银花品种核型见图1,染色体参数见表1。

“小鸡爪”为二倍体,染色体数目为 $2n=2x=18$ ,核型公式为 $4m+8sm+6st(2SAT)$ 。其中第3、4对染色体为正中部着丝粒染色体,第1、2、5、8对染色体为亚中部着丝粒染色体,第6、7、9对染色体为亚端着丝粒染色体,第6对染色体具有随体。最长染色体与最短染色体之比为1.69,臂比值>2的染色体占全部染色体总数的56%,核不对称系数是68.39,核型分类属于3A类型。染色体相对长度组成为 $2L+4M2+12M1$ (图1A)。

“鸡爪花”为二倍体,染色体数目为 $2n=2x=18$ ,核型公式为 $2m+8sm+8st(4SAT)$ 。其中第6对为正中部着丝粒染色体,4条亚中部着丝粒染色体分别为第1、2、7、9对染色体,其余为亚端着丝粒染色体,第3、4对为具随体染色体。最长染色体与最短染色体之比为2.07,臂比值>2的染色体占全部染色体总数的89%,核不对称系数是74.25,核型分类



注:A.“小鸡爪”;B.“鸡爪花”;C.“九丰1号”;D.“大毛花”;E.“四季金银花”;F.菰腺忍冬。

Note: A. 'Xiaojizhua'; B. 'Jizhuahua'; C. 'Jiufeng 1'; D. 'Damaohua'; E. 'Sijijinyinhua'; F. *Lonicera hypoglanca*.

图1 6个金银花品种核型

Fig. 1 Karyotype of 6 honeysuckle cultivars

表 1

6 个金银花品种染色体参数分析

Table 1

Parameters of 6 honeysuckle cultivars

种名 Species	序号 Number	相对长度 Relative length (S+L=T)/%			相对长度系数 Index of relative length	着丝粒指数 Centromere index/%	臂比 Arm ratio (L/S)	类型 Type
“小鸡爪” ‘Xiaojizhua’	1	5.350	10.311	15.661	1.410	34.161	1.927	sm
	2	4.864	8.949	13.813	1.243	35.213	1.840	sm
	3	4.669	6.615	11.284	1.016	41.377	1.417	m
	4	4.767	6.031	10.798	0.972	44.147	1.265	m
	5	2.626	7.685	10.311	0.928	25.468	2.927	sm
	6*	2.237	7.879	10.116	0.910	22.113	3.522	st
	7	2.140	7.198	9.338	0.840	22.917	3.364	st
	8	2.918	6.518	9.436	0.849	30.924	2.234	sm
	9	2.043	7.198	9.241	0.832	22.108	3.523	st
“鸡爪花” ‘Jizhuahua’	1	4.682	11.706	16.388	1.475	28.570	2.500	sm
	2	4.125	10.479	14.604	1.314	28.246	2.540	sm
	3*	1.784	10.033	11.817	1.064	15.097	5.624	st
	4*	1.561	8.807	10.368	0.933	15.056	5.642	st
	5	2.453	8.027	10.480	0.943	23.406	3.272	st
	6	4.682	5.686	10.368	0.933	45.158	1.214	m
	7	2.341	6.912	9.253	0.833	25.300	2.953	sm
	8	1.672	7.135	8.807	0.793	18.985	4.267	st
	9	2.453	5.463	7.916	0.712	30.988	2.227	sm
“九丰 1 号” ‘Jiufeng 1’	1	5.152	10.374	15.526	1.397	33.183	2.014	sm
	2	4.305	9.245	13.550	1.220	31.771	2.148	sm
	3	3.458	8.186	11.644	1.048	29.698	2.367	sm
	4	4.375	6.351	10.726	0.965	40.789	1.452	m
	5	3.105	7.622	10.727	0.965	28.946	2.455	sm
	6	3.246	6.493	9.739	0.877	33.330	2.000	sm
	7*	2.329	7.198	9.527	0.857	24.446	3.091	st
	8	3.246	6.351	9.597	0.864	33.823	1.957	sm
	9	2.117	6.845	8.962	0.807	23.622	3.233	st
“大毛花” ‘Damaohua’	1	4.927	10.190	15.117	1.361	32.592	2.068	sm
	2	4.367	9.183	13.550	1.219	32.229	2.103	sm
	3	3.247	8.511	11.758	1.058	27.615	2.621	sm
	4	3.024	8.175	11.199	1.008	27.002	2.703	sm
	5	3.024	7.951	10.975	0.988	27.554	2.629	sm
	6	4.479	6.383	10.862	0.978	41.235	1.425	m
	7	3.247	6.271	9.518	0.857	34.114	1.931	sm
	8	2.016	6.719	8.735	0.786	23.080	3.333	st
	9	2.576	5.711	8.287	0.746	31.085	2.217	sm
“四季金银花” ‘Sijijinyinhua’	1	3.219	12.374	15.593	1.403	20.644	3.844	st
	2	4.225	9.457	13.682	1.231	30.880	2.238	sm
	3*	2.012	8.451	10.463	0.942	19.230	4.200	st
	4	3.722	7.445	11.167	1.005	33.330	2.000	sm
	5	4.628	6.439	11.067	0.996	41.818	1.391	m
	6	3.320	6.740	10.060	0.905	33.002	2.030	sm
	7*	1.911	7.948	9.859	0.887	19.383	4.159	st
	8	2.515	6.841	9.356	0.842	26.881	2.720	sm
	9	2.414	6.338	8.752	0.788	27.582	2.626	sm
“孤腺忍冬” <i>Lonicera hypoglanca</i>	1	4.972	8.950	13.922	1.253	35.713	1.800	sm
	2	5.083	8.177	13.260	1.193	38.333	1.609	m
	3	3.536	8.066	11.602	1.044	30.478	2.281	sm
	4	4.088	6.961	11.049	0.994	36.999	1.703	sm
	5	3.204	7.735	10.939	0.985	29.290	2.414	sm
	6	4.420	6.077	10.497	0.945	42.107	1.375	m
	7	2.873	7.293	10.166	0.915	28.261	2.538	sm
	8	3.204	6.630	9.834	0.885	32.581	2.069	sm
	9	3.094	5.635	8.729	0.786	35.445	1.821	sm

属于 3B 类型。染色体相对组成为  $4L+2M2+10M1+2S$ (图 1 B)。

“九丰 1 号”是经“大毛花”人工加倍获得的同源四倍体<sup>[21]</sup>,故其染色体数目为  $2n=4x=36$ ,核型公式为  $4m+24sm+8st(3SAT)$ 。其中仅第 4 对染色体为正中部着丝粒染色体,第 7、9 对为亚端部着丝粒染色体,其余 6 对染色体均为亚中部着丝粒染色体,并且仅第 7 对染色体具有随体和次缢痕。最长染色体与最短染色体之比为 1.73,臂比值 $>2$ 的染色体占全部染色体总数的 67%,核不对称系数是 68.67,核型分类属于 3A 类型。染色体相对长度组成为  $4L+8M2+24M1$ (图 1 C)。

“大毛花”为二倍体,染色体数目为  $2n=2x=18$ ,核型公式是  $2m+14sm+2st$ 。虽然“九丰 1 号”是“大毛花”的同源四倍体,但是多年的选育加速其染色体变异的进程,因而其染色体核型与母本二倍体不尽相同。表现为具有一对(6)正中部着丝粒染色体,一对(8)亚端部着丝粒染色体,其余均为亚中部着丝粒染色体,未发现随体。最长染色体与最短染色体之比为 1.82,臂比值 $>2$ 的染色体占全部染色体总数的 78%,核不对称系数是 68.09,核型分类属于 3A 类型。染色体相对长度组成为  $2L+6M2+8M1+2S$ (图 1 D)。

“四季金银花”为二倍体,染色体数目同为  $2n=2x=18$ ,核型公式为  $2m+10sm+6st(4SAT)$ 。在 9 对染色体中,具有 5 对亚中部着丝粒染色体分别为第 2、4、6、8、9 对染色体,占全部染色体的 55.6%。3 条亚端部着丝粒染色体,分别为第 1、3、7 对染色体,占全部染色体的 33.3%。仅第 5 对具中部着丝粒染色体。第 3、7 对染色体都具有随体。最长染色体与最短染色体之比为 1.78,臂比值 $>2$ 的染色体占全部染色体总数的 78%,核不对称系数是 72.03,核型分类属于 3A 类型。染色体相对长度组成为  $2L+4M2+12M1$ (图 1 E)。

菰腺忍冬为二倍体,染色体数目为  $2n=2x=18$ 。核型公式为  $4m+14sm$ 。与其余 5 种不同的是,菰腺忍冬不具有亚端部着丝粒染色体,仅有 2 条中部着丝粒染色,分别为第 2、6 对染色体,其余 7 对均为次中部着丝粒染色体,未发现随体。最长染色体与最短染色体之比为 1.59,臂比值 $>2$ 的染色体占全部染色体总数的 44%,核不对称系数是 65.53,核型分类属于 2A 类型。染色体相对长度组成为  $2L+4M2+12M1$ (图 1 F)。

### 3 结论与讨论

试验结果表明,6 个金银花品种的染色体基数为  $x=9$ ，“九丰 1 号”是“大毛花”经人工加倍获得的同源四倍体<sup>[22]</sup>,其染色体数目为  $4n=4x=36$ 。其余 5 个栽培种金银花的染色数目稳定,均为  $2n=2x=18$ ,与前人<sup>[11,13]</sup>所报道的结果一致。稳定的核型表明忍冬属在进化中染色体没有发生染色体的增加或减少。核型分析结果显示,6 个金银花品种都不具有端部着丝粒染色体,亚中部着丝粒染色体最多,亚端部着丝粒染色次之,中部着丝粒染色最少。第 1、2 对染色体在大部分供试材料中为亚中部着丝粒染色体,随体都位于亚端部着丝粒染色体。相似的核型说明它们在物种性和亲缘关系方面存在一致性。此外,不同栽培品种的染色体核型也表现出多样性,6 个金银花品种的染色体在形态数目、随体有无及位置存在一定程度的分化和变异。如菰腺忍冬仅有中部着丝粒染色体和亚中部着丝粒染色体,而不具有亚端部着丝粒染色体。6 个金银花品种只有“大毛花”和菰腺忍冬不具有随体,“小鸡爪”和“九丰 1 号”具有一对随体分别位于第 6、7 对染色体,“四季金银花”和“鸡爪花”具有 2 对随体,并且其中一对都位于第 3 对染色体。这些差别是在人工选育金银花品种优良性状的过程中积累下来的,同时可以利用核型分析的方法来鉴定不同金银花的种质资源。

根据 STEBBINS<sup>[17]</sup>的理论,物种的进化与染色体核型的对称性程度有关,即在生物的进化过程中,核型是由对称向不对称演化的。并将其从高到低分为 4 种类型 A、B、C、D。每个类型又分为 4 个等级,其中 A 类的对称性最高,染色体变异最小,从而进化程度也最低。依据 STEBBINS<sup>[17]</sup>的观点,6 种金银花染色体核型类型属于 A 或 3B 型,说明金银花在进化史上处于相对原始的地位。而“鸡爪花”的核型不对称系数为 74.25,在核型分类上属于 3B 类型,是 6 个金银花品种中对称性最低,进化程度最高。菰腺忍冬的核型不对称系数为 65.53,属 2A 类型,处于最原始的进化地位。“小鸡爪”“九丰 1 号”“大毛花”“四季金银花”菰腺忍冬都属于 A 类型,说明这 5 个金银花品种具有较近的亲缘关系。依据核型不对称系数的高低排列依次为“四季金银花”(72.03)、“大毛花”(69.09)、“九丰 1 号”(68.67)、“小鸡爪”(68.39)、菰腺忍冬(65.53),说明这 5 个金银花品种可能的进化程度为“四季金银花” $>$ “大毛花” $>$ “九丰 1 号” $>$ “小鸡爪” $>$ 菰腺忍冬。但是根据最长染色体与最短染色体之比得出的进化结果为“大毛花”(1.82) $>$ “四季金

银花”(1.78) > “九丰1号”(1.73) > “小鸡爪”(1.69) > 菰腺忍冬(1.59)。造成这种偏差的原因可能是与试验取材的局限性和制片过程的误差有关,而造成栽培种进化程度不同的原因可能与人工选择的过程有关。

该试验中“九丰1号”是采用多倍体育种技术,以“大毛花”为亲本获得的同源四倍体。而“大毛花”和“九丰1号”具有相似的核型公式以及相近的核不对称系数也证实了这一点。在野外种植中发现,“九丰1号”具有茎枝粗壮、直立性强、花大、徒长枝少、产量高、药用有效成分含量高等优点。分析原因可能是由于多倍化造成基因组结构的不稳定,从而引起其基因表达方式的改变,产生适应性的新表型<sup>[21-22]</sup>。因此利用人工诱导产生多倍体的方法,丰富金银花种质资源,为金银花的良种选育提供新的手段<sup>[23]</sup>。

### 参考文献

- [1] 孟衡玲,张薇,卢丙越,等.铜胁迫对金银花幼苗生理指标的影响[J].北方园艺,2015(5):167-169.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典一部[M].北京:化学工业出版社,2005:152-153.
- [3] 杨倩如,赵媛媛,郝江波,等.金银花与山银花化学成分及其差异的研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(7):1204-1211.
- [4] 杨进,李晓玲,李宁,等.栽培种金银花和野生种金银花染色体核型比较分析[J].湖北农业科学,2011,50(2):328-331.
- [5] 王亚丹,杨建波,戴忠,等.中药金银花的研究进展[J].药物分析杂志,2011,34(11):1928-1935.
- [6] 蒋超,袁媛,刘贵明,等.基于EST-SSR的金银花分子鉴别方法研究[J].药学学报,2012,47(6):803-810.
- [7] 王志涛.红花金银花染色体核型及进化分析[J].湖北农业科

学,2014,55(3):1075-1077.

- [8] 陈瑞阳,李秀兰,宋文芹,等.中国主要经济植物基因组染色体图谱:第二册[M].北京:科学出版社,2003:561-565.
- [9] 闫秋洁,邹利娟,田婷婷,等.川产忍冬属三种植物的核型分析[J].中药材,2014,27(3):384-387.
- [10] 汪冶,梅树模,郑丽,等.灰毡毛忍冬的染色体及核型分析[J].时珍国医国药,2008,19(8):1870-1871.
- [11] 武欣,梅树模,郑丽,等.红白忍冬的染色体及核型分析[J].中南药学,2011,9(6):416-419.
- [12] 王飞,王冰.忍冬属两种药用植物的染色体核型分析[J].中药材,2005,28(3):168-179.
- [13] 李晓玲,杨进,王洪涛,等.树形金银花染色体制片优化及核型分析[J].河南农业科学,2009(7):102-106.
- [14] 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.
- [15] 陈成彬.中国药用植物种质资源的细胞学研究[D].天津:南开大学,2006.
- [16] 李懋学,陈瑞阳.关于植物核型的标准化问题[J].武汉植物研究,1985,3(4):297-302.
- [17] STEBBINS G L. Chromosomal evolution in higher plants[M]. London:Edward Arnold,1971:87-89.
- [18] ARAN O H. Cytological studies in subfamily Carduoideae (Compositae) of Japan[J]. Bot Mag(Tokyo),1963,76:32-39.
- [19] LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG A. A1 nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas,1964,52:201-220.
- [20] KUO S R, WANG T T, HUANG T C. Karyotype analysis of some *Formosan gymnosperms*[J]. Taiwan,1972,17(1):66-80.
- [21] 谭忠.四倍体金银花新品种“九丰1号”的特征特性[J].作物杂志,2005(1):55.
- [22] 乔永刚,赵晓明.药用植物的多倍体育种[J].中医药现代化,2007,9(5):77-82.
- [23] 王惠利,赵晓明.四倍体金银花的细胞学鉴定[J].北方园艺,2014(6):92-94.

## Karyotype Analysis of Six Cultivars of *Lonicera japonica* Thunb

ZHANG Lipeng, JIA Shuhang, XU Zhongkai, ZHU Zhefan, LUO Si, CHEN Chengbin  
(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)

**Abstract:** Stem tips of six kinds of honeysuckle were used as explants, the traditional squashing method was used to prepare mitotic chromosome sample in order to supply cytological base for cultivation breeding. The results showed that the basic number of chromosome was  $x=9$ . ‘Jiufeng 1’ was autotetraploid by doubling ‘Damaohua’ genome, so its karyotype formula was  $2n=4x=36=4m+24sm+8st(3SAT)$ , which belonged to 3A type. The others were all diploid. ‘Xiaojizhua’ was  $2n=2x=18=4m+8sm+6st(2SAT)$ , 3A type. ‘Jizhuahua’ was  $2n=2x=18=2m+8sm+8st(4SAT)$ , 3B type. ‘Damaohua’ was  $2n=2x=18=2m+14sm+2st$ , 3A type. ‘Sijijinyinhua’ was  $2n=2x=18=2m+10sm+6st(4SAT)$ , 3A type. And *Lonicera hypoglanca* Thunb was  $2n=2x=18=4m+14sm$ , 2A type. Their index of asymmetric was demonstrated that *Lonicera hypoglanca* was the most primitive evolution. The genetic relationships of ‘Xiaojizhua’, ‘Jiufeng 1’, ‘Damaohua’ and ‘Sijijinyinhua’ were relatively closed, they all belonged to 3A type.

**Keywords:** *Lonicera japonica* Thunb; chromosome preparation; karyotype analysis