

盾叶薯蓣自然变异类型间的比较研究

郑晓琴 梁国鲁 李晓林

(西南农业大学园艺系, 重庆 400716)

摘要:对取自云南期纳的二倍体和三倍体盾叶薯蓣植株以及重庆城口的四倍体植株进行了形态学、染色体数目及同工酶的比较研究。结果表明,这3种类型植株在叶片形态上有明显的差异。二倍体的染色体数目是 $2n=2x=20$,三倍体为 $2n=3x=30$,四倍体为 $2n=4x=40$;酯酶(EST)和超氧化物歧化酶(SOD)酶谱显示,3种类型植株之间具有明显的相关性,但多倍体较二倍体的酶带条数少且着色浅。这些差异除了有地理分布不同的因素外,倍性的不同也是很重要的因素。

关键词:盾叶薯蓣;倍性;染色体数目;酯酶;超氧化物歧化酶

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2003)03-0267-04

A Comparison among Natural Variations of *Dioscorea zingiberensis*

ZHENG Xiao-qin LIANG Guo-lu LI Xiao-lin

(Department of Horticulture, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Three types of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright, the diploid and the triploid from Qina, Yunnan Province, and the tetraploid from Chengkou, Chongqing, were compared by means of examining the morphology, chromosome numbers and isozymes. The results showed that the three types have obvious differences in leaf morphology and chromosome numbers: the diploid, $2n=2x=20$; the triploid, $2n=3x=30$; the tetraploid, $2n=4x=40$. Zymograms of esterase isozyme and superoxide dismutase showed an obvious relation among the three types, but the polyploid ones had less bands and showed lighter-colored compared to the diploid one.

Key words: *Dioscorea zingiberensis*; Ploidy; Chromosome number; Esterase isozymes; Superoxide dismutase

盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)是薯蓣科的一类草质藤本植物,为我国特有的薯蓣类型,其根状茎含有较高的薯蓣皂甙元(diosgenin),是提取甾体类激素的重要药源植物,主要分布于河南南部,湖北,湖南,陕西秦岭以南,甘肃天水,四川等地^[1]。薯蓣属植物的染色体基数 $x=10$,常见为二倍体($2n=2x=20$)^[2,3]。盾叶薯蓣作为薯蓣皂素的原料已开发利用多年,由于过度采挖,其野生资源面临枯竭,生态环境遭到破坏。人工栽培主要采用种子或分根繁殖,在一定程度上缓解了原料短缺的压力,但长期人工栽培使品种退化,产量和质量下降,化学成分不稳定,因此有必要进行品种选育和提纯复壮工作。我们在对云南期纳和重庆城口的盾叶薯蓣进行选育的过程中,除了观察到二倍体植株外,还发现三倍体和四倍体植株,对于盾叶薯蓣这种自然

变异类型还未见有报道。本文仅对盾叶薯蓣3种类型植株进行形态、染色体数目及同工酶的比较研究,以期为进一步的研究和资源开发利用打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试二倍体、三倍体植株取自云南期纳;四倍体植株取自重庆城口。

1.2 不同类型植株形态比较方法

测定叶长、叶宽、叶长/叶宽:选取各植株从上至下第10片叶为测定对象,用游标卡尺测叶长、叶宽,取相同标准的10张叶片进行测定,取其平均值。

1.3 细胞染色体计数

以茎尖细胞的倍性为标准进行染色体计数。方法如下:剥出茎尖生长锥→0.002 mol/L 8-羟基喹啉预处理 2.5 h→固定(甲醇:冰醋酸=3:1)2 h→前低渗 8-10 min→酶解(3%纤维素酶:3%果胶酶=1:1)1.5 h→后低渗 10 min→固定 30 min 以上→涂片,风干→5%Geimsa 染色 10 min→镜检,显微摄影。

1.4 植株同工酶分析

每种类型植株分别取部位及发育程度大致相同的嫩叶进行同工酶的检测,共取样 3 次。检测酯酶(EST)和超氧化物歧化酶(SOD)。

制样方法 取 4-5 片嫩叶,按 1 g 材料加 1 ml 提取液的比例加入提取液,冰浴研磨,离心(4 250×g) 20 min,收集上清液, -18℃ 保存备用。

电泳 使用聚丙烯酰胺凝胶电泳。分离胶 pH8.8, 电极缓冲液为 pH8.3 的 Tris-Gly 系统。检测的同工酶类所用的分离胶浓度分别为:酯酶(EST) 12%, 超氧化物歧化酶(SOD) 8%。酯酶和超氧化物歧化酶的点样量均为 30 μl, 在 4℃ 冰箱, 170 V 下稳压电泳, 每个样品分别重复电泳两次。

染色及电泳结果处理 EST 用乙酸-a-萘酯及监牢蓝 RR 染色, SOD 用氯化硝基-4-氮唑蓝(NBT)和核黄素(VB1), 待酶带清晰, 流水漂洗后置

蒸馏水中, 记录 Rf 值, 拍照后制成干板。最后根据电泳图谱, 找出不同类型共有酶带、特有酶带, 从而比较出 3 种类型之间的酶特征的异同。

2 结果和分析

2.1 植株形态比较

在相同种植条件下对 3 种类型植株进行观察比较, 发现二倍体植株茎蔓生长最快, 侧芽抽发力强; 四倍体次之, 但茎蔓较粗; 三倍体植株生长最慢, 茎蔓也很细。在叶片形态上, 3 种类型植株叶柄均盾状着生, 云南期纳的二倍体和三倍体植株叶片近心形, 中间裂片三角状卵形, 两侧裂片圆耳状, 但三倍体叶片较二倍体的厚, 叶色更绿; 重庆城口的四倍体植株叶片心形或箭形, 中间裂片披针形, 两侧裂片长圆形, 叶较厚, 深绿色, 且叶片明显大于二倍体和三倍体植株的叶片(表 1)。

3 种类型植株的叶片形态差异较大, 从叶片厚度和叶色(表 1)上还可以看出, 多倍体植株因染色体数目的增加而导致它的细胞体积增大, 从而叶片更厚, 叶色更绿。

2.2 植株的染色体数目

3 种类型植株茎尖细胞有丝分裂中期染色体数目见图 1。

表 1 不同类型植株叶片的特性
Table 1 Leaf morphology of different types of *D. zingiberensis*

倍性 Ploidy	叶厚 Thickness (mm)	叶长 Length (cm)	叶宽 Width (cm)	叶形指数 Leaf index	叶色 Color
二倍体 Diploid	0.13	5.32	4.90	1.09	浅绿 Light green
三倍体 Triploid	0.20	3.70	2.52	1.47	绿色 Green
四倍体 Tetraploid	0.28	5.68	5.08	1.12	深绿 Dark green

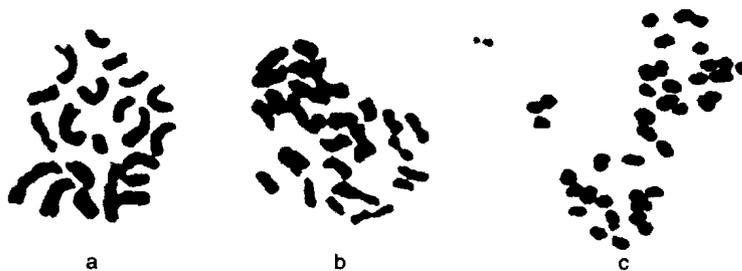


图 1 各倍性植株染色体数目

Fig. 1 Chromosome numbers in different types of *D. zingiberensis*

a: 二倍体 Diploid, $2n=2x=20$; b: 三倍体 Triploid, $2n=3x=30$; c: 四倍体 Tetraploid, $2n=4x=40$

2.3 植株同工酶分析

3种类型植株的同工酶酶谱模式图及电泳图谱见图2。

从图2可见,各类型植株的酯酶同工酶酶谱和酶活性均不同,其酶谱带较丰富,可划分为A、B、C 3个区。由负极向正极方向泳动,A区泳动较慢,未出现酶谱带;B区泳动中等,Rf值在0.28-0.51之间,该区酶活性较强,共显现11条带。在Rf=0.28-0.36之间,二倍体显现3条特强带;三倍体2条弱带;而四倍体只1条次强带。在Rf=0.38处,二倍体和三倍体均显现1条次强带;四倍体却只有1条痕迹带。在Rf=0.41-0.44之间,二倍体有2条弱带;但三倍体除了1条弱带外,还有1条特强带;四倍体则是1条次强带和1条弱带。在Rf=0.47-0.48之间,二倍体有1条强带;三倍体有1条弱带;而四倍

体则未显现酶带;在Rf=0.50-0.51之间,二倍体只有1条痕迹带;三倍体和四倍体均有1条强带,且四倍体的酶带较三倍体宽。C区泳动较快,但酶活性较弱,Rf值在0.58-0.73之间,共显现4条带。二倍体有2条特征带;在三倍体有1条带;四倍体有2条带,其中1条为特征带。但该区的酶带均较弱。

此外,3种类型植株叶片的SOD同工酶酶活性较弱,共显现6条带,Rf=0.28-0.73。二倍体有6条带,其中有3条特征酶带,Rf=0.36,0.52,0.62;而Rf=0.28,0.45,0.73的3条酶带为3种类型植株共有,且酶带基本相同;三倍体和四倍体只有Rf=0.28,0.45,0.73三条酶带,较二倍体少,且二者之间谱带无明显差异,说明三倍体和四倍体的SOD同工酶比较稳定,且SOD的多态性远小于EST。

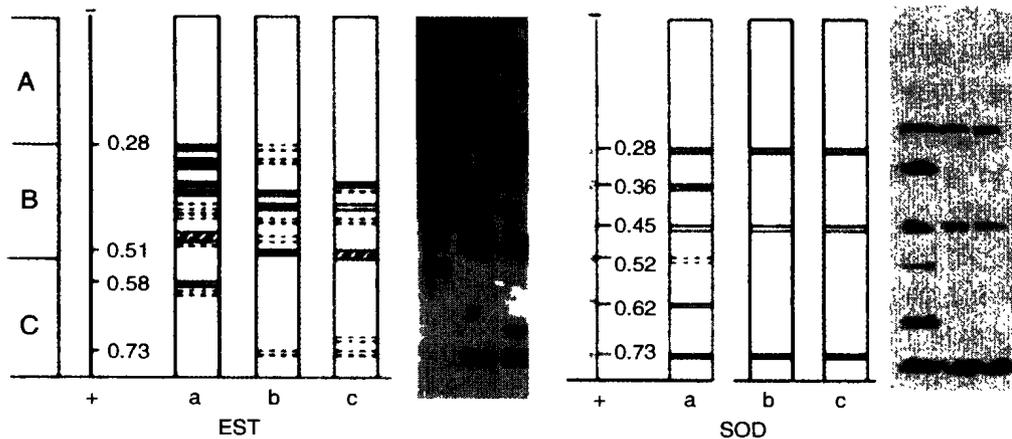


图2 各倍性植株同工酶图谱

Fig. 2 Zymograms of *D. zingiberensis* with different ploidy

■ 特强带 Extraordinarily deep colored band; ■ 强带 Deep colored band; □ 次强带 Subordinately deep colored band;
 □ 弱带 Light colored band; - - - 痕迹带 Trace band; a: 二倍体 Diploid; b: 三倍体 Triploid; c: 四倍体 Tetraploid

3 讨论

3种类型植株在形态上存在明显差异,除有地理分布不同的因素^[23]外,染色体倍性的不同也是很重要的。在叶片形态上,特别是叶片厚度和叶色,多倍体植株充分体现了器官形态的巨大性。多倍体植株器官的巨大性对于以营养器官为收获目的的植物,如薯蓣可能很有利用前景;另一方面,植物染色体倍性的变化也往往会导致次生代谢物含量的变化,这就有可能获得有效成分含量更高的药用植物新品种,如四倍体丹参^[4]。

多倍体产生的途径很多,一般有3种,即(1)合

子的染色体加倍;(2)分生组织的染色体加倍;(3)配子的染色体未减数。Thompson & Lumaret^[5]指出:目前已很明确,自然界绝大多数多倍体是通过未减数(2n)配子的融合而产生的。而对于盾叶薯蓣这种多年生草本植物,其自然界2n配子的发生除受植物本身生物学特性、遗传因素和外界环境因素的控制外,也可能是由于进行营养繁殖而提高了未减数配子的发生频率。正如Ramsey & Schemske^[6]认为由于营养繁殖方式的存在,使对有性生殖的选择压力有所松弛,从而为2n配子或其它无功能配子的产生提供了一个宽松的环境,促成了2n配子的形成,并因此而影响多倍体的发生。

酯酶和超氧化物歧化酶两种同工酶酶谱证实了 3 种类型盾叶薯蓣之间存在相关性,但由于地理分布和倍性的不同,其酶谱又表现出明显的差异。多倍体同工酶酶带条数较二倍体少,酶带着色也较浅,且并未显现明显的特异酶带。因为在用同工酶对同源多倍体进行分析时,多数情况下,二倍体种的全部基因均能在多倍体中得到表达,表现同工酶的多态性,但有一个问题就是变种蛋白质常常比主要蛋白质的浓度要低很多,倍性水平或蛋白质亚基数增加会扩大这种影响;另一些情况下,来自二倍体的特定同工酶在多倍体中会丢失^[7,8]。对于引起多倍体变种基因表达异常的原因可能有:(1)多倍体染色体数目的增加,据推测会使细胞核增大,降低表面积与体积的比率,影响调整蛋白的输入,最终影响基因的转录^[9];(2)基因沉默,如同源依靠性沉默,即某一基因当有与之同源的 DNA 序列存在时,该基因的表达下降或完全不表达。从分子机制上看,这种沉默可以发生在转录和转录后两个层次,通常启动子同源引发转录水平的基因沉默,而转录后沉默多是由于编码序列或转录终止序列之间的相互作用^[10];(3)核-质相互作用,在多倍化过程中,核基因组被加倍了,细胞质 DNA 的量并没有增加,因此核-质之间 DNA 量的比例发生了改变,这就可能引起调控作用的紊乱或失调。尽管目前对细胞核与细胞质之间相互作用的机制还不十分了解,但在研究多倍体基因组进化过程中所发现的一些现象确实显示与细胞质有一定联系^[10]。当然,引起多倍体变种在表型上变异的因素是来自多方面的,这还有待我们进一步的研究。

参考文献

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita (中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora of China Tomus 16(1) [M]. Beijing: Science Press, 1985. (in Chinese)
- [2] Pei C (裴鉴), Ting C S (丁志遵), Chin H C (秦慧珍), et al. A preliminary systematic study of *Dioscorea* L. sect. *Stenophora* Uline [J]. Acta Phytotaxon Sin (植物分类学报), 1979, 17(3):61-71. (in Chinese)
- [3] The Research Group of Dioscorea, Kiangsu Institute of Botany (江苏省植物研究所薯蓣课题课题组). Studies on Chinese *Dioscorea* sect. *Stenophora* Pr. Et Burk. and their chromosome numbers [J]. Acta Phytotaxon Sin (植物分类学报), 1976, 14(1):65-71. (in Chinese)
- [4] Gao S L (高山林), Zhu D N (朱丹妮), Cai Z H (蔡朝晖), et al. The relation between characters and quality of crude drug in polyploid lines of Danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) [J]. Plant Resour Environ (植物资源与环境), 1996, 5(2):1-4. (in Chinese)
- [5] Thompson J D, Lumaret R. The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins; establishment and persistence [J]. Trend Ecol Evol, 1992, 7(9):303-306.
- [6] Ramsey J, Schenks D W. Pathway, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants [J]. Annu Ecol Syst, 1998, 29:467-501.
- [7] Liang F S (梁凤山), Luo Y W (罗耀武). Polyploid and its utilization in agriculture production [J]. World Agro: Rain Fed Crops (国外农学—杂粮作物), 1999, 19(2):20-23. (in Chinese)
- [8] Xie Z H (谢兆辉), Mu C H (牟春红), Wang B (王彬), et al. Plant polyploidization and its appliance in breeding [J]. Chin Agri Sci Bull (中国农学通报), 2002, 18(3):70-76. (in Chinese)
- [9] Galitski T, Saldanha A J, Styles C A, et al. Ploidy regulation of gene expression [J]. Science, 1999, 285:251-254.
- [10] Yang J (杨继). The formation and evolution of polyploid genomes in plants [J]. Acta Phytotaxon Sin (植物分类学报), 2001, 39(4):357-371. (in Chinese)