

• 药材与资源 •

不同倍性盾叶薯蓣的生理指标和薯蓣皂苷元量的比较研究

周媛¹, 胡春根², 朱健¹, 姚家玲^{1*}

(1. 华中农业大学生命科学技术学院, 湖北 武汉 430070; 2. 华中农业大学园艺林学学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:目的 通过比较盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* 人工四倍体植株和普通二倍体植株在抗性相关指标及薯蓣皂苷元量方面的差异, 探索药用盾叶薯蓣倍性育种的应用前景。方法 以秋水仙素诱导加倍的、经鉴定确认的 3 个不同株系四倍体盾叶薯蓣为材料, 以二倍体原种为对照, 采用分光光度法测定叶片超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(PPO)活性以及可溶性糖的量; 高锰酸钾滴定法测定过氧化氢酶(CAT)活性; 采用 HPLC 法测定根状茎薯蓣皂苷元的量。结果 四倍体植株 SOD、PPO、CAT 的活性以及可溶性糖的量明显高于二倍体; 四倍体植株薯蓣皂苷元的量显著高于二倍体, 增加幅度最大为二倍体原种的 27%。结论 人工四倍体植株薯蓣皂苷元量高, 其生理指标也显示较强的抗性基础, 可望直接利用或作为进一步培育高产、高薯蓣皂苷元量薯蓣新品种的良好育种材料。

关键词: 盾叶薯蓣; 四倍体; 生理指标; 薯蓣皂苷元; HPLC

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)03-0423-04

Comparison of physiological index and diosgenin content in different ploidy of *Dioscorea zingiberensis*

ZHOU Yuan¹, HU Chun-gen², ZHU Jian¹, YAO Jia-ling¹

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China; 2. College of Horticulture and Forestry Science, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

Abstract: **Objective** By comparing the physiological index and diosgenin content of rhizome between the artificial tetraploid and the wild type diploid of *Dioscorea zingiberensis*, it is aimed at revealing the potential utility of polyploid breeding in medicinal *D. zingiberensis*. **Methods** Three clones of the natural diploid and the artificially induced tetraploid of *D. zingiberensis* were used as materials in this study. The content of SOD, PPO, and soluble sugar of leaves was determined by spectrophotometry, CAT content was measured by using the method of KMnO_4 titration. And the diosgenin content in rhizome was analyzed by HPLC. **Results** The tetraploid plants showed higher level of SOD, PPO, CAT, soluble sugar content in leaves, and diosgenin content in rhizome than those of the diploid origins. The diosgenin content in the three clones of tetraploid plants increased to 27% as compared to wild type. **Conclusion** Artificially induced tetraploid presents high content of diosgenin and great potential in stress resistance, which would be available in good seed breeding for high yield of diosgenin.

Key words: *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; tetraploid; physiological index; diosgenin; HPLC

盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright 俗称黄姜、火头根等, 是薯蓣科薯蓣属植物, 为我国特有种。其根状茎提取的薯蓣皂苷元是合成甾体激素类药物的重要原料^[1]。近年来, 人工栽培盾叶薯蓣的薯蓣皂苷元量有下降趋势, 常规育种较难解决这一问题^[2]。根据诱导同源多倍体可以提高药用植物产量和有效成分量的特性, 笔者通过组织培

养结合秋水仙素诱变技术, 在离体条件下处理愈伤组织块, 获得四倍体盾叶薯蓣的诱导率达 35%^[3], 并在此基础上对诱导得到的 3 个不同居群的四倍体盾叶薯蓣进行了进一步的研究, 结果表明, 四倍体植株在田间的适应性较强, 倍性稳定并具有一定育性^[4]。本实验研究四倍体植株与其二倍体原种所含薯蓣皂苷元量的差异, 并分析和比较不同倍性植株

收稿日期: 2005-05-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770084)

作者简介: 周媛(1980-), 女, 湖北武汉人, 华中农业大学生命科学技术学院硕士研究生, 研究方向为药用植物育种。

* 通讯作者 姚家玲 Tel: (027)87282866 E-mail: yaojlm@mail.hzau.edu.cn

与生长和抗逆性相关的几个生理指标的差异,为进一步选育高产、高薯蓣皂苷元量的盾叶薯蓣新种质提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料:用于加倍的 3 种材料原种分别为引自陕西石泉的 43 号、陕西凤县的 31 号以及湖北十堰的 HA₄ 号,离体加倍后经流式细胞仪检测和染色体计数鉴定后确认为四倍体的植株^[3],与其二倍体植株试管苗,同期移栽于华中农业大学试验基地内。其中 43 号盾叶薯蓣移栽时间为 2003 年 6 月;31 号和 HA₄ 号材料移栽时间为 2004 年 6 月。本试验在 3 个居群中各选取 10 株为试验材料进行测定和分析。

1.2 生理指标的测定:于生长旺盛期,取不同倍性各 10 个单株同一节位的叶片,测定其过氧化物酶(PPO)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性以及可溶性糖的质量分数^[5]。

1.3 薯蓣皂苷元量的测定

1.3.1 仪器与色谱条件:本试验采用高效液相色谱法测定薯蓣皂苷元的量。仪器为美国 VARIAN 公司 ProStar 高效液相色谱仪。色谱条件:Microsorb MV 100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(95:5);体积流量:1 mL/min;柱温为室温;检测波长:208 nm;进样量为 10 μL。

1.3.2 对照品溶液的配制:对照品由江西省药品检验所提供。准确称取干燥后的薯蓣皂苷元对照品 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,终质量浓度为 1 mg/mL。

1.3.3 样品溶液的制备^[6,7]:于 2004 年 12 月,采集 3 个株系盾叶薯蓣四倍体和二倍体植株的根状茎,在 60 ℃烘箱内烘干至恒重,粉碎后(过 40 目筛)准确称取 1 g,加入 80%甲醇 25 mL,超声处理 20 min,倒出上清液,重复上述操作。合并两次提取的上清液,定容至 50 mL,自然挥干溶剂,再加入 4 mol/L HCl 溶液 20 mL 高压酸解 2 h,压力为 0.1~0.15 MPa。酸解后的溶液用 1 mol/L Na₂CO₃ 溶液调节 pH 值至中性,再用 30 mL 氯仿分 3 次回萃取,每次 10 min。合并氯仿萃取液于旋转蒸发仪中回收溶剂,残渣用甲醇溶解并定容至 10 mL,制成样品溶液,过 0.22 μm 有机膜滤过后供进样用。

1.3.4 样品测定:按 1.3.1 项下条件测定,每个样品重复测定 3 次,取其平均值。

2 结果与分析

2.1 四倍体与二倍体盾叶薯蓣生理指标的差异:大量研究表明,植物体内一些酶及可溶性糖的量等物

质与生长和抗逆性相关,这些生理指标常用以评价植物抗逆性强弱。多倍体植物由于其倍性水平的改变,对逆境的适应和抵抗可能会发生相应的变化,与其生理代谢的变化相关,本研究主要测定并比较四倍体与二倍体植株叶片 SOD、CAT、PPO 的活性以及可溶性糖的量,各项指标的测定结果见表 1。

表 1 四倍体与二倍体盾叶薯蓣生理指标的比较

Table 1 Comparison of physiological index between tetraploid and diploid of *D. zingiberensis*

材料 编号	倍性 水平	PPO/(U · min ⁻¹ · g ⁻¹)	CAT/(mg · g ⁻¹ · min ⁻¹)	SOD/ (U · mg ⁻¹)	可溶性糖 /%
43 号	四倍体	30.2	7.055	0.284	1.21
	二倍体	21.2	4.505	0.253	0.98
	比值	142%	157%	113%	123%
31 号	四倍体	28.4	2.890	0.269	0.90
	二倍体	20.2	2.125	0.202	0.73
	比值	141%	136%	133%	123%
HA ₄ 号	四倍体	28.0	2.805	0.290	0.86
	二倍体	21.4	2.295	0.236	0.76
	比值	131%	122%	123%	113%

结果表明,相同栽培条件及相同生长发育时期,比较所测定的几个生理指标,3 个居群四倍体植株较其二倍体原种均有明显增加,其中 PPO 和 CAT 的活性,四倍体植株增幅非常明显,平均较二倍体高出 38%;SOD 的活性和可溶性糖的量两个指标增幅次之,也达到了 20% 左右,这表明倍性的增加使植株叶片中相应酶和物质的活力和量得到明显提高。

比较 3 个株系的四倍体植株发现,田间栽培时间较长的 43 号植株各项生理指标均略高于生长时间较短的 31 和 HA₄ 号植株,尤其是 CAT 的活性差异最大;而田间栽培时间相同的 31 和 HA₄ 号四倍体植株,几个生理指标之间则没有出现明显的差异。说明这些生理指标除随着倍性水平的改变发生变化外,田间栽培时间长短对其也有一定影响,但是倍性水平较田间栽培时间的影响更大,关系也更为密切,可能与其体内和抗性相关的酶以及其他渗透调节物质的量增加有一定关系。

2.2 薯蓣皂苷元的测定

2.2.1 HPLC 分析:薯蓣皂苷元对照样品 HPLC 色谱图如图 1-A;样品根状茎甲醇提取液水解后的 HPLC 色谱图如图 1-B。结果表明,在上述色谱条件下,盾叶薯蓣根状茎中薯蓣皂苷元可与其他物质分离,通过对照色谱图对其吸收峰定性,其保留时间与对照品一致。

2.2.2 不同倍性根状茎薯蓣皂苷元量的比较:采用 HPLC 测定供试 3 个株系的四倍体及其二倍体原种

根状茎薯蓣皂苷元量,取各株系 10 株样品的平均量,测定结果见表 2。

由表 2 可以看出,43 号四倍体植株试管苗移栽田间 18 个月后采挖,皂苷元量达到 1.842%,是 3 个株系四倍体植株中量最高的;31 和 HA₄ 号四倍体植株,试管苗移栽田间后仅生长 6 个月,其根状茎皂苷元量相对较低,但也达到 1.035%和 0.823%。说明离体加倍的试管苗移栽田间后,其根状茎薯蓣皂苷元量的积累遵循一般规律,随生长时间的增加而增加,并且能保持原种性。在相同的栽培管理条件下,3 个株系的四倍体植株根状茎皂苷元平均量均显著高于其二倍体原种,但增加幅度随基因型不同而有差异,以 31 号四倍体植株的皂苷元量增幅最为显著,达 27%。表明倍性水平的增加可以有效提高

根状茎薯蓣皂苷元的量,同时也说明加倍后有效成分的增加幅度可能与植株的基因型有关。

3 讨论

3.1 染色体加倍与植物生长和抗逆性的关系:多倍体植株由于染色体加倍,使得体内各种生理指标发生变化。如四倍体大麦叶片中 SOD 的活性比二倍体高出 21%,CAT 的活性也较二倍体高 17%~20%^[8];三倍体苹果叶片中可溶性蛋白质的量较原二倍体高出 40%等^[9]。已有的研究表明,SOD 是细胞抵御活性氧伤害的酶保护系统,与植物的抗盐、抗低温、抗旱、抗病密切相关;CAT 则是一种可以增强植物代谢强度、抗病、抗逆性的酶^[10];而 PPO 是一种与抗病性有关的酶;可溶性糖是很多植物主要的渗透调节剂,在细胞内起保护酶类的作用^[11]。本研究中,四倍体盾叶薯蓣叶片中 PPO、CAT、SOD 活性以及可溶性糖量较二倍体大幅增加,表明四倍体植株可能比二倍体具有更强的生长优势和抗逆性。曾报道一些多倍体植物具有较强的抗逆性,如苜蓿四倍体比二倍体植株有较强的耐盐性^[12];生姜四倍体品种的抗寒性和抗热性均比二倍体强^[13]。多倍体植物生长和抗逆性的优势可能是由于染色体加倍所致。一般认为植物营养器官性状的变化与基因的剂量有关,即随着基因拷贝数的增加,基因转录产物的量发生变化,导致性状出现相应的变化,但不一定存在直线相关,因此,比较四倍体盾叶薯蓣与二倍体之间的抗逆性差异,还需要在各类逆境胁迫条件下进行更深入的研究。

3.2 盾叶薯蓣多倍体育种前景:盾叶薯蓣是收获地下根状茎的药用植物,前期的研究表明,通过离体诱导结合秋水仙素处理可以在较短时间内获得大量的四倍体植株^[3]。生物学性状观察发现,获得的四倍体植株在田间的适应性较强,倍性稳定性好,但生长、发育较缓慢,育性降低;通过比较四倍体与二倍体植株的光合作用、呼吸作用强度以及生物产量等,表明四倍体植株较其二倍体原种具有一定的优势(结果另文发表);本研究证明四倍体植株的一些重要生理指标也显著高于二倍体,表明其可能具有较强的抗逆性;供试的 3 个居群四倍体根状茎薯蓣皂苷元的量均高于二倍体。这些研究结果表明,四倍体盾叶薯蓣在生长势、生长适应性和有效成分的量上有较大的优势,是进一步培育高薯蓣皂苷元量新品种有价值的育种材料。植物多倍体育种中,有经济价值的主要是四倍体和三倍体,因此可以利用人工染色体加倍技术,选择薯蓣皂苷元量高的原种获得四倍体植

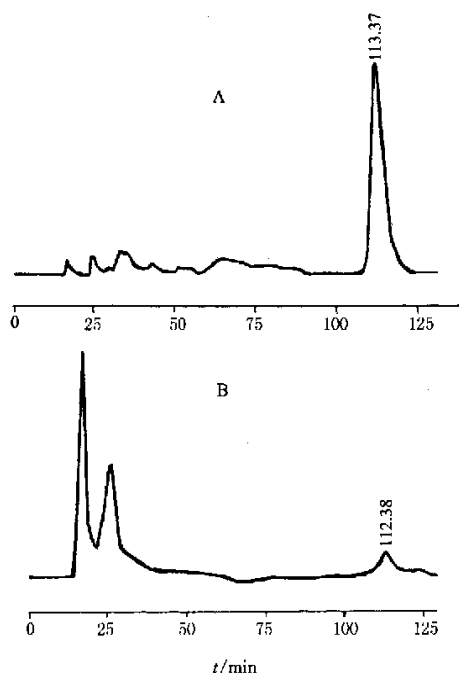


图 1 薯蓣皂苷元(A)和根状茎甲醇提取液(B)HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of diosgenin (A) and rhizome methanol extract after hydrolysis (B)

表 2 3 个株系盾叶薯蓣四倍体和二倍体植株根状茎中薯蓣皂苷元测定结果

Table 2 Diosgenin content of rhizome in tetraploid and diploid plants of three clones in *D. zingiberensis*

编号	倍性水平	薯蓣皂苷元/%	四倍体/二倍体/%
43 号	四倍体	1.842	121
	二倍体	1.517	
31 号	四倍体	1.035	127
	二倍体	0.817	
HA ₄ 号	四倍体	0.823	116
	二倍体	0.707	

株,通过与二倍体杂交获得三倍体后代,以拓宽育种资源。进一步研究不同倍性材料的生物学性状和薯蓣皂苷元量,筛选出高产、高薯蓣皂苷元量的最适倍性,有望解决目前盾叶薯蓣人工栽培后有效成分下降的问题,振兴皂素工业。

References:

- [1] Feng Y X, Zhou Z Q. Review and prospects for industrial production and resource of diosgenin in China [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1994, 6(3): 3.
- [2] Li J C, Li X M, Guo X S. Advances in study of *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2003, 23(10): 1842-1848.
- [3] Li Y H, Hu C G, Yao J L, et al. Studies on tetraploid *Dioscorea zingiberensis* inducement [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(3): 16-20.
- [4] Zhou Y, Hu C G, Shi G, et al. Biological characters of tetraploid *Dioscorea zingiberensis* [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 2005, 23(4): 358-362.
- [5] Li H S. *Theory and Technology of Plant Physiology and Biochemistry* (植物生理学及生物化学理论与技术) [M]. Beijing: High Education Press, 2000.
- [6] Liu Y, Deng S W, Yuan W P. Determination of diosgenin in *Dioscorea nipponica* by RP-HPLC [J]. *J Jiangxi Univ Tradit Chin Med* (江西中医学院学报), 2004, 116(14): 42-43.
- [7] Yang W Y, Xiong C M. RP-HPLC Determination of diosgenin in Chinese medicinal herb [J]. *Anal Lab* (分析实验室), 2002, 21(1): 74-75.
- [8] Zhao Y. Analysis of superoxide dismutase, catalase and soluble protein content of tetraploid barley [J]. *J Chin Cereals Oils Associa* (中国粮油学报), 2001, 16(5): 33-35.
- [9] Wu L J, Xu J B, Liu X X. Comparison of physiological index between diploid and triploid apples [J]. *Hebei Fruits* (河北果树), 2002(1): 4-5.
- [10] Liu D L, Yu B C, Sun Y Y. Effects of the temperature stress on SOD and CAT activities and their isozymes of rice seedling [J]. *J Central China Normal Univ: Nat Sci* (华中师范大学学报:自然科学版), 1994, 28(4): 525-528.
- [11] Xu H F, Jin Y M, Zhang C Y. Content of soluble sugar in sunflower leaves [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2000, 22(1): 23-25.
- [12] Zhang J J, Yin L Q, Zhang W P. Features and heat-resistance of SHICAI (*Brassica campestris*) tetraploids [J]. *Acta Agric Shanghai* (上海农业学报), 1998, 14(2): 35-40.
- [13] Shang H L, Guo Q G, Song M. A preliminary study of heat and cold-resistance of tetraploid Ginger (*Zingiber officinale*) [J]. *J Southwest Agric Univ* (西南农业大学学报), 2003, 25(3): 231-233.

山东产瓜蒌不同农家品种的 RAPD 研究

孙稚颖^{1,2}, 周凤琴¹

(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250014; 2. 山东师范大学生命科学学院, 山东 济南 250014)

摘要:目的 探讨瓜蒌不同农家品种的遗传多样性和亲缘关系,对其进行分子标记鉴定。方法 用 25 个随机引物对山东瓜蒌不同农家品种、野瓜蒌及对照湖北桔楼进行 RAPD 分析。采用 NTSYS-pc 软件计算瓜蒌各农家品种(及种)间的 Jaccard 遗传相似系数,按非加权配对算术平均法(UPGMA)建立各品种间的聚类图。结果 共扩增出 266 个条带,其中多态带为 232 条,占 87.2%。聚类图显示,对照湖北桔楼与瓜蒌各农家品种和野生种间的差异最大,牛心瓜蒌与仁瓜蒌、大瓜蒌与八棱瓜蒌、小光蛋与野瓜蒌彼此间亲缘关系较近。结论 RAPD 分子标记法可以在分子水平上规范、整理和鉴定瓜蒌的不同农家品种,揭示了瓜蒌种质资源的亲缘关系以及遗传背景,为山东道地药材瓜蒌的栽培育种及资源保护提供了重要参考。

关键词:瓜蒌;农家品种;RAPD;亲缘关系;遗传多样性

中图分类号:R282.7 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2006)03-0426-04

RAPD Analysis on farm cultivars of fruits of *Trichosanthes kirilowii* from Shandong Province

SUN Zhi-ying^{1,2}, ZHOU Feng-qin¹

(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China;

2. College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: Objective To explore the genetic diversity and relationship of different cultivars of the fruits of *Trichosanthes kirilowii*, and determine them in molecular level. **Methods** Different farm cultivars and fruits in wild plant of *T. kirilowii* from Shandong Province and *T. hupehensis* were detected by

收稿日期:2005-05-16

基金项目:山东省中医药管理局课题(编号:2001-09)

作者简介:孙稚颖(1971-),女,山东省滕州市人,讲师,在读博士,主要从事植物资源分类学研究工作。

Tel:(0531)2613292 E-mail:szyww@sohu.com