

七种犁头尖属(*Typhonium* Schott)植物和两个近缘属等位酶的研究*

卞福花 王仲朗 管开云

(中科院昆明植物研究所,昆明 650204)

摘 要 用凝胶电泳法分析了七种犁头尖属植物和两个近缘属三个种的6种酶系统,检测了7个等位酶位点,利用软件BIOSIS-2进行遗传相似性的聚类分析,绘出树状分支图,将七种犁头尖属植物分为三个组,同时澄清了犁头尖属、斑龙芋属和半夏属之间的近缘性,即犁头尖属与斑龙芋属比与半夏属有较近的亲缘关系。

关键词 等位酶;遗传相似性

THE STUDIES ON ALLOZYME OF SEVEN SPECIES IN *TYPHONIUM* SCHOTT AND TWO CLOSE GENERA

BIAN Fu-Hua WANG Zhong-Lang GUAN Kai-Yun

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract Six enzyme systems of seven species in *Typhonium* and three in two close genera were analyzed by means of electrophoresis. Seven allozyme sites were checked. Tree diagram was drawn using BIOSYS-2 for cluster analysis of genetic similarity. Seven species of *Typhonium* were divided into three groups and the relationship between *Typhonium*, *Sauromatum* Schott and *Pinellia* Tenore was clarified. Namely *Typhonium* is closer from *Sauromatum* than *Pinellia*

Key words allozyme; genetic similarity

犁头尖属(*Typhonium* Schott)是天南星科中一较大并较为进化的属,国外多数学者主要从形态学方面加以研究,且多是研究当地原产种类^[1-7],国内有关文献甚少^[8-10]。Sriboonma^[7]等查阅了世界各大标本馆本属植物的大多数标本,并作了一番整理,但基本上仍局限于形态方面,有人主张将犁头尖属与斑龙芋属(*Sauromatum* Schott)合并^[11],本文带着几个疑问对犁头尖属的7个种和两个近缘属的三个种作了等位酶分析,以期获得理想结果。

该文检测了10余种酶系统,得到6种分离较好的酶谱来分析犁头尖属7个种的亲缘关系以及

该属和斑龙芋属、半夏属(*Pinellia* Tenore)的近缘性。

1 实验材料

等位酶实验材料取自野外采集后种植于昆明植物园东园的7种犁头尖属植物——独角莲(*Typhonium giganteum* Engl.)、鞭檐犁头尖(*T. flagelliforme* (Lodd.) Blum)、单籽犁头尖(*T. calcicolum* C. Y. Wu ex H. Li et al)、昆明犁头尖(*T. kunmingense* H. Li)、马蹄犁头尖(*T. trilobatum* (L) Schott)、西南犁头尖(*T. omeiense* H. Li)、金平犁头尖(*T. jünpingense* Z. L. Wang, H. Li et F.

* 第一作者简介:卞福花(1973—),女,硕士,主要从事植物的引种驯化与分类学研究。

收稿日期:2002-05-23

H. Bian) 和三个对照类群——虎掌 (*Pinellia pedatisecta* Schott) 和高黎贡山斑龙芋 (*Sauromatum gaoligongense* Z. L. Wang et H. Li) 及斑龙芋 (*S. venosum* (Aiton) Kunth), 详见表 1, 凭证标本保存于昆明植物研究所标本馆 (KUN)。每个种随机取样 10 ~ 15 个个体, 分别取植株上幼嫩叶片研磨。

2 方法

2.1 酶液提取

取植株上幼嫩叶片约 0.5 克左右, 加 3 ~ 5 滴提取缓冲液于研钵中研磨。匀浆, 常温下 14000r/min 离心 15min, 上清液贮于 -20℃ 冰箱中备用。

通过选用几种提取缓冲液进行对比试验并根据结果作适当的修饰调整, 得出采用以下提取缓

冲液提取的酶液活性较高, 染多种酶的效果都较好。

提取缓冲液配方为:

0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (PBS)

0.029 mol/L 四硼酸钠 (Sodium tetraborate)

0.017 mol/L 偏亚硫酸氢钠 (Sodium metabisulfite)

4% w/v 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP-40)

0.202 mol/L 抗坏血酸钠 (Ascorbic acid, sodium)

0.016 mol/L 二乙基二硫代氨基甲酸钠 (DIEAC)

调整 pH 至 7.5, 最后加入巯基乙醇 (1% v/v)。

表 1 材料来源

Table 1 The origin of Species

种名 Species	产地 Locality	海拔 Alt. (m)	凭证标本号 Vouchers
独角莲 <i>Typhonium giganteum</i>	北京药用植物研究所 (栽培) Beijing Institute of Medicine Botany (Cultured)		卞福花 206
鞭檐犁头尖 <i>T. flagelliforme</i>	云南金平县 Jinping, Yunnan	350	卞福花、李嵘 201
单籽犁头尖 <i>T. calcicolum</i>	云南西畴县法斗 Xichou Fadou, Yunnan	1400	卞福花、李嵘 106
昆明犁头尖 <i>T. kunmingense</i>	云南昆明 Kunming, Yunnan 云南西双版纳热带植物园	1900	
马蹄犁头尖 <i>T. trilobatum</i>	Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Yunnan	580	卞福花 207
西南犁头尖 <i>T. omeiense</i>	四川盐边县岩口乡 Yanbian Yankou, Sichuan	2300	王仲朗、卞福花 99-13
金平犁头尖 <i>T. jinpingense</i>	云南金平县 Jinping, Yunnan	1200	卞福花、李嵘 200
虎掌 <i>Pinellia pedatisecta</i>	云南 Yunnan		
高黎贡山斑龙芋 <i>Sauromatum gaoligongense</i>	云南保山 Baoshan, Yunnan	2290	Li Heng et al. 11309A
斑龙芋 <i>S. venosum</i>	云南昆明 Kunming, Yunnan	1900	李恒 8819

2.2 电泳

采用水平切片淀粉凝胶电泳法。

凝胶配方: 10% 混合淀粉 (马铃薯淀粉: 可溶性淀粉 = 5:3), 1% 琼脂糖, 3% 蔗糖。

凝胶缓冲液系统: 吗啡啉 - 柠檬酸缓冲液。

电泳缓冲液: 0.04 mol/L 柠檬酸, 0.068 mol/L 吗啡啉。

凝胶缓冲液: 以 1:19 的电泳缓冲液: 蒸馏水

比例稀释而成。

在 4℃ 冰箱中电泳 4 ~ 5 小时。

2.3 特异性染色

电泳完成后, 淀粉凝胶通过水平切片法切成 4 块薄片, 每片通过特异性染色检测不同的酶系统。显色参考王中仁^[12] 所述方法, 略加修改而成。显色后, 手工和照像纪录。

3 结果分析

3.1 酶位点的分析

共分析了 10 种酶系统,有 6 种酶系统表现出等位酶带,即:SKD - 莽草酸脱氢酶、MDH - 苹果酸脱氢酶、IDH - 异柠檬酸脱氢酶、PGI - 磷酸葡萄糖异构酶、PGD - 磷酸葡萄糖酸脱氢酶、PGM - 磷酸葡萄糖变位酶。综合多次实验结果,最后确定 6 种酶系统共 7 个等位基因酶位点,电泳酶谱见图 1。

(1)SKD 单体酶(monomeric enzyme),在种子植物中通常为 1~2 个基因位点编码,存在于细胞液和质体中。本研究的犁头尖属植物中,从酶谱看,是由一个基因位点上的多个等位基因编码的单体酶。

(2)IDH 二聚体酶(dimeric enzyme)存在于细胞液中,受 1~2 个基因位点编码的。从酶谱看有犁头尖属植物有两个位点编码,但其中一个位点(IDH-2)在某些种中缺少等位基因,不能称之为等位酶,因此本研究只采用和分析有等位基因的

位点(IDH-1)。

(3)MDH 由 3~4 个基因位点编码的二聚体酶,存在于细胞液、线粒体、微粒体中。从谱带上看,除鞭檐犁头尖表现出 6 条带之外(三倍体),其余均表现为杂合体的三条带,是由一个位点的两个不同等位基因编码。种间表现出较大的差异。

(4)PGM 由 2 个基因位点编码的单体酶,存在于细胞液和质体中。犁头尖属中,其中一个基因位点有某些种中未检测到等位基因,另一个位点种间差异也较大。

(5)PGD 常见由 2 个基因位点编码的二聚体酶,存在于细胞液和质体中,谱带分析表明该酶由两个不同的位点来编码,其中一个位点在某些种中未检测到等位基因。

(6)PGI 常见由 2 个基因位点编码的二聚体酶,存在于细胞液和质体中,从酶谱来看,犁头尖属植物中很明显是由一个基因位点多个等位基因编码的二聚体酶。

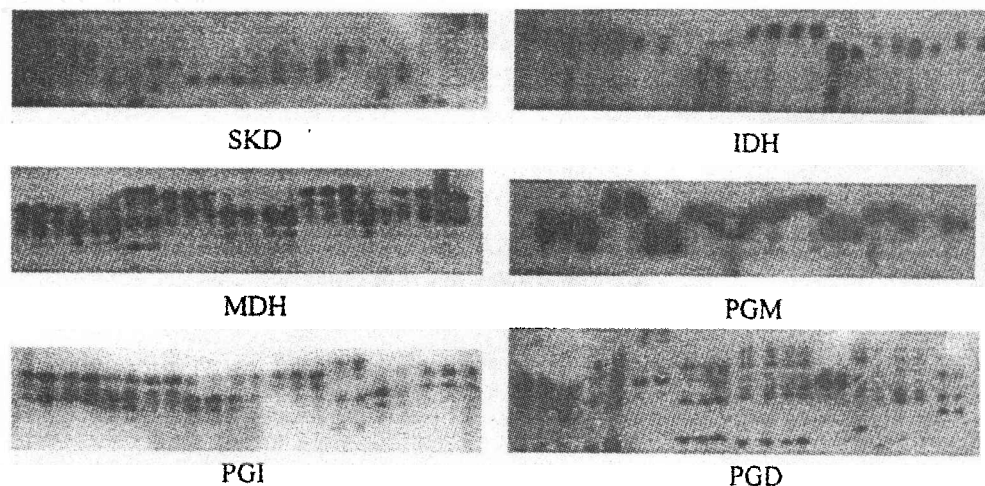


图 1 六种酶系统的等位酶电泳图谱

Fig. 1 Zymograms of six enzyme systems

3.2 聚类分析

对多倍体的遗传学计算目前尚未见有成熟的方法,但从理论上推断,在多倍体中表现出杂合位点的比率取决于其两个亲本亲缘关系的远近。就四倍体而论,若为“同源四倍体”(通常认为来自种内杂交),同工酶的表现型将没有可见的多倍化的效果,杂合位点的比率将会接近祖先二倍体居群的平均预期杂合度,若为“异源四倍体”(通常认为来自种间杂交),其杂合位点的比率将接

近 1-I,这里 I 是两个亲本种遗传一致度的平均值^[12]。独角莲、单籽犁头尖、昆明犁头尖虽为四倍体^[10],但从酶谱上似乎看不出到底是同源四倍体还是异源四倍体,然而均表现出杂合二倍体的酶型,所以此分析按二倍体进行处理。

根据等位酶的表现型写出其基因型,采用“不加权对儿平均聚类分析法”(UPGMA, unweighted pair-group method with arithmetic averaging)计算遗传一致度,通过 BIOSYS-2 软件进行遗传相似

性的聚类分析(Cluster analysis)。绘出各种之间的遗传相似性分支图,遗传相似性系数见表2,分支图见图2。

表2 遗传相似性系数表
Table 2 Table of genetic similarity

Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1.000								
2	0.362	1.000							
3	0.362	0.430	1.000						
4	0.362	0.430	1.000	1.000					
5	0.362	0.430	0.793	0.793	1.000				
6	0.768	0.362	0.362	0.362	0.362	1.000			
7	0.362	0.808	0.430	0.430	0.430	0.362	1.000		
8	0.362	0.430	0.630	0.630	0.630	0.362	0.430	1.000	
9	0.362	0.430	0.630	0.630	0.630	0.362	0.430	0.857	1.000

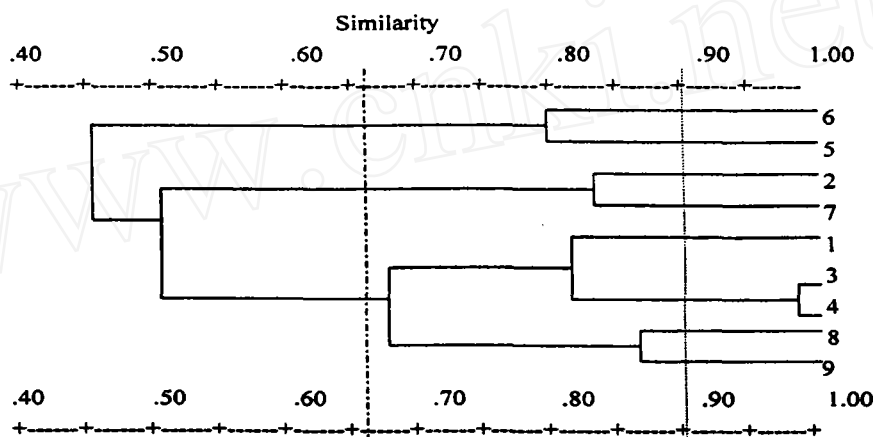


图2 各种之间遗传相似性图

Fig. 2 Phenogram of genetic similarity

1. 独角莲(*Typhonium giganteum*); 2. 单籽犁头尖(*T. calcicolum*); 3. 昆明犁头尖(*T. kunmingense*); 4. 西南犁头尖(*T. omeiense*); 5. 马蹄犁头尖(*T. trilobatum*); 6. 金平犁头尖(*T. jinpingense*); 7. 高黎贡山斑龙芋(*Sauromatum gaoligongense*); 8. 斑龙芋(*S. venosum*); 9. 虎掌(*Pinellia pedatisecta*)

4 讨论

4.1 犁头尖属的种间亲缘关系

通过等位酶资料进行遗传学计算,可以对类群之间的亲缘关系的远近给出一个数量上的表示,常用的就是遗传一致度(genetic identity)。Crawford^[13]等人从已有的等位酶资料的大量类群的统计结果表明:种子植物属内种间的遗传一致度约为0.67,种内居群间为0.9。参考这个标准,从图2可以看出,所研究的9个种可分为三组(group):(1)马蹄犁头尖(*T. trilobatum*)和金平犁头尖(*T. jinpingense*)为一组;(2)单籽犁头尖

(*T. calcicolum*)和高黎贡山斑龙芋(*S. gaoligongense*)为一组;(3)其余5种:独角莲(*T. giganteum*),昆明犁头尖(*T. kunmingense*),西南犁头尖(*T. omeiense*),斑龙芋(*S. venosum*),虎掌(*P. pedatisecta*)为一组。昆明犁头尖和西南犁头尖较接近,遗传一致度大于0.9,属于种内居群间的差异,其余各种的遗传一致度都小于0.9,被认为是分化较好的“种”。

等位酶分析结果与Sriboonma的形态学分析^[7]和叶绿体DNA的限制性片段分析^[14]结果基本相符。据犁头尖属内的分组而言,Sriboonma^[7]利用形态学性状进行表征分析,得出树状分支图,

进而将犁头尖属分成 5 个组: sect. *Hirsuta*、sect. *Diversifolia*、sect. *Pedata*、sect. *Gigantea*、sect. *Typhonium*。按其分组法,独角莲属 sect. *Gigantea*, 马蹄犁头尖属 sect. *Typhonium*, *T. horsfieldii* [Sriboonma 将单籽犁头尖归并为 *T. horsfieldii* (Miq.) v. Steenis] 属 sect. *Pedata*。本研究等位酶分析结果与此结果一致,很明显单籽犁头尖、独角莲、马蹄犁头尖分别归属于三个不同的组。

4.2 犁头尖属与斑龙芋属和半夏属的亲缘关系

4.2.1 等位酶分析推测犁头尖属与斑龙芋属比与半夏属有较近的亲缘关系

两个近缘关系越近的种类,在所有位点上的所有等位基因频率越相近,遗传相似性系数越接近 1;反之,两个近缘关系越远的种类,在所有位点上的所有等位基因频率差别越大,遗传相似性系数越接近 0^[12]。由遗传相似性系数和树状图可看出,六种犁头尖属植物与高黎贡山斑龙芋、斑龙芋的遗传相似性系数比与虎掌的平均遗传相似性系数大,由此可推断犁头尖属与斑龙芋属比与半夏属有较近的亲缘关系。

4.2.2 犁头尖属内种间的差异比三属间的差异还大些

从等位酶的研究结果还可看出,犁头间属内种间的酶谱遗传差异比属间差异还要大些,这是与以往的分类学结果差异较大的、甚至是相悖的。可能的原因我们认为:

(1)这三个属可能在遗传上比较接近,应该归并为同一个属,而且在形态和细胞学上,这三个属也有较近的亲缘关系^[15,16]。如果是同一个属内,这种种间的酶谱遗传差异是在合理的范围之内。

(2)等位酶技术上的缺陷或者是试验的材料和检测的酶不够量而得到误差较大的结果。为确证最后结果,还需从分子等水平上进一步加以研究。

参 考 文 献

- Banerji I. Life history of *Typhonium trilobatum* Schott. Proc Nat Inst Sci Ind, 1947, 13(5): 207 ~ 230
- Steenis C G, Van G J. *Typhonium horsfieldii* in Miscellaneous Notes. Bull Bot Gard Burtenz Se, 1948, 3(17): 403
- Nicolson D H, Sivadasan M. Four frequently confused species of *Typhonium* Schott (Araceae). Blumea, 1981, 27(2): 483 ~ 497
- Murata J. Diversity of Shoot Morphology of *Typhonium* (Araceae). Amer J Bot, 1990, 77: 1475 ~ 1481
- Murata J, Mayo S J. A new combination in *Typhonium* (Araceae). Kew Bull, 1991, 46(1): 129 ~ 131
- Hay A. The genus *Typhonium* (Araceae - Araceae) in Australia. Blumea, 1993, 37: 345 ~ 376
- Sriboonma D, Murata J, Iwatsuki K. A Revision of *Typhonium* (Araceae). J Fac Sci Univ Tokyo Bot, 1994, SEC III, 14(4): 255 ~ 313
- 李恒. 中国植物志 13(2). 北京: 科学出版社, 1979
- 李恒. 犁头尖属. 见: 吴征镒主编. 新华本草纲要. (第 3 册). 上海: 上海科学技术出版社, 1990
- 卞福花, 王仲朗, 李恒, 等. 六种犁头尖属植物的核型研究. 广西植物, 2002, 22(2): 147 ~ 153
- Hettterscheid W L, Boyce P C. A reclassification of *Sauroratum* Schott and new species of *Typhonium* Schott (Araceae). Aroideana, 2000, 23: 48 ~ 55
- 王中仁. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 1998
- Crawford D J. Enzyme Electrophoresis and Plant Systematics. In: Soltis D E, Soltis P S eds. Isozymes in Plant Biology. Portland, Oregon: Dioscorides Press. 1989. 146 ~ 164
- Sriboonma D, Hasebe M, Murakami N, et al. Phylogeny of *Typhonium* (Araceae) inferred from restriction fragment analysis of chloroplast DNA. J Plant Res, 1993, 106: 11 ~ 14
- Petersen G. Cytology and systematics of Araceae. Nord J Bot, 1989, 9(2): 119 ~ 166
- Petersen G. Chromosome numbers of the genera of Araceae. Aroideana, 1994, 16: 37 ~ 46