

二倍体与多倍体罗汉果生物学性状的比较研究*

Comparative Study on Biological Characteristics between Diploid and Polyploid *Siraitia grosvenorii*

闫海锋^{1,2},黄夕洋¹,梁萍^{1,3},蒋水元^{1**},李锋⁴,李虹¹,李志刚²

YAN Hai-feng^{1,2}, HUANG Xi-yang¹, LIANG Ping^{1,3}, JIANG Shui-yuan¹, LI Feng⁴, LI Hong¹, LI Zhi-gang²

(1. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所,广西桂林 541006;2. 广西大学农学院,广西南宁 530004;3. 桂平市实验中学,广西桂平 537200;4. 广西科学院,广西南宁 530007)

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China; 2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 3. Experimental High School of Guiping, Guiping, Guangxi, 537200, China; 4. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:以罗汉果二倍体为对照,研究二倍体与多倍体(三倍体、四倍体)植株之间地径、株径、叶片、气孔器和花器的生物学性状。结果表明:罗汉果植株的地茎、株径、叶长宽、叶面积、叶厚、气孔长宽、保卫细胞长宽、花瓣长宽、子房纵径、子房横径均表现出:四倍体>三倍体>二倍体,而且多数性状在不同倍性间的差异均达到显著水平($P < 0.05$);气孔密度呈相反的趋势:二倍体>三倍体>四倍体,不同倍性彼此间差异显著($P < 0.05$)。根据罗汉果多倍体所表现出的“巨大性”,可以进行罗汉果多倍体的快速鉴定和优良罗汉果品种的培育。

关键词:罗汉果 二倍体 多倍体 生物学性状

中图分类号:Q949.9 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2011)02-0177-04

Abstract: Compared with the diploid, biological characteristics of diploid and polyploid *Siraitia grosvenorii* were studied and polyploidy *Siraitia grosvenorii* included triploid and tetraploid. The results showed that the basal diameter, stem width, leaf length and width, leaf area, leaf thickness, stomatal length and width, guard cell length and width, petal length and width, ovary vertical diameter and horizontal diameter were $4X > 3X > 2X$, and the differences of most biological characteristics were significant between different ploidy levels ($P < 0.05$). On the contrary, the trend of stomata density was $2X > 3X > 4X$, and the differences were also remarkable between different ploidy levels ($P < 0.05$). Because polyploidy *Siraitia grosvenorii* showed largeness, it could be identified fastly, and used to breed *Siraitia grosvenorii*.

Key words: *Siraitia grosvenorii*, diploid, polyploid, biological characteristics

罗汉果 (*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey) 属葫芦科罗汉果属,是我国特有的经济和药用植

物。罗汉果的果实可入药,在治疗百日咳、慢性气管炎、咽喉炎、胃肠疾病等方面疗效显著。罗汉果的果实中所含有的甜甙 V 是一种天然的甜味剂,具有高甜度、低热量、无毒、安全、热稳定性好的特点,可以作为糖代用品和饮料甜味剂等^[1,2]。目前罗汉果药材在国内外的需求量越来越大,人们对罗汉果的产量和质量也提出了更高的要求。

多倍体是新品种选育和丰富种质资源的重要途径之一,利用多倍体的效应获得大的果实或营养器官产品,并且能够提高植株的营养成分和品质,以及获

收稿日期:2010-10-29

修回日期:2011-03-24

作者简介:闫海锋(1980-),男,硕士研究生,主要从事植物栽培学研究。

* 中国科学院“西部之光”人才培养计划项目[2009(236)],国家自然科学基金(40961019),广西科技攻关项目(桂科攻 0815005-2-2),桂林科技攻关项目(20080103-1),广西植物研究所基本科研业务费项目(09005)资助。

** 通讯作者。

得无籽或少籽的果实等特性。该技术已在四倍体不结球白菜^[3]、四倍体水稻^[4]、三倍体无籽西瓜^[5]等植物上成功应用和推广。近年也应用该技术成功培育出了多倍体罗汉果,包括四倍体罗汉果、三倍体无籽罗汉果^[6],其中三倍体罗汉果的果实所具有无籽或少籽的特性,大大提高了整果的利用率和甜甙提取收得率,有利于罗汉果新产品的开发,在提取加工行业的应用前景十分可观。但是目前对于这一新兴的罗汉果优良种质,研究还较少,因此我们对罗汉果多倍体开展了有关生物学特性方面的研究,以罗汉果二倍体为对照,与三倍体、四倍体相比较,探讨不同倍性罗汉果植株间的生物学性状和差异性,了解罗汉果多倍体、特别是三倍体无籽罗汉果的外部形态特征等,为今后多倍体罗汉果的快速鉴定、科学种植、产量品质的提高及优良多倍体罗汉果品种(品系)的选育奠定基础理论。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验材料来自桂林亦元生现代生物技术有限公司培育的不同染色体倍性的罗汉果组培苗,包括二倍体(2X)、同源四倍体(4X)、三倍体(3X)由相应的同源四倍体与二倍体雄株杂交培育成的无菌苗;2X、3X、4X 均为青皮果品种,雌株。

于 2008 年 4 月下旬种植于广西桂林市兴安县漠川乡罗汉果种植基地,栽培管理措施相同,定期观察、比较和测量二倍体与多倍体罗汉果植物学特性。

1.2 测定方法

1.2.1 地径和株径的测定

待植株上棚后,随机选取长势一致、健壮的罗汉果(二倍体、三倍体、四倍体)植株各 20 株,使用游标卡尺测量地径值(地表处主茎的直径)和株径值(主蔓中部的直径)。

1.2.2 叶片和气孔器形态特征的测定

1.2.2.1 叶片形态特征的测定

随机选取罗汉果(二倍体、三倍体、四倍体)植株发育成熟和生长良好的新鲜叶片各 20 张,使用游标卡尺测量叶片的长度(叶基部至叶尖长)、宽度(叶最宽处)、厚度(同一叶多点测量,重复 3 次取平均值),并使用 LI-3000 叶面积仪测定叶片的面积,计算叶形指数(即叶长与叶宽的比值)。

1.2.2.2 气孔器(气孔和保卫细胞)形态特征的测定

选择晴朗的天气,于上午 8:00~10:00 时在田间取样,随机选取罗汉果(二倍体、三倍体、四倍体)植株的同一部位的新鲜叶片各 20 张,用尖镊子撕取叶片

中部的下表皮,置于载玻片上,制作临时玻片。使用 Motic DMBA200 数码显微镜测量开度最大的气孔及保卫细胞的长度和宽度,每个叶片随机测量 10 个气孔,取平均值;并观察每个视野中的气孔数目(30 个不同视野),统计单位面积内的气孔个数,求其平均值,再计算出气孔密度(个/毫米²)。

1.2.3 花器形态特征的测定

于盛花期选择晴朗的天气,选取罗汉果(二倍体、三倍体、四倍体)植株的雌花(子房)各 20 个,在授粉前使用游标卡尺测量花瓣的长度、宽度和子房的纵径和横径,记录数据。

1.2.4 数据的统计分析和绘图

以上实验数据均应用 SPSS11.5 (SPSS Inc. , USA)软件进行统计分析,并对罗汉果二倍体、三倍体、四倍体的各生物学性状参数进行一元方差分析(One-Way ANOVO)。

2 结果与分析

2.1 不同倍性罗汉果的地径、株径

三倍体和四倍体植株的地径值和株径值比二倍体的大,地茎值分别高出 30.56%和 29.31%,株径值分别高出 36.11%和 34.48%,四倍体又稍大于三倍体(表 1)。随着倍性的增加,地径和株径均呈现上升趋势,4X>3X>2X,多倍体表现出“巨大性”。从方差分析结果可知,在地径上,多倍体与二倍体的差异均达到显著水平($P < 0.05$),但是多倍体(3X、4X)间则差异不显著;而在株径上,2X、3X、4X 间均差异显著($P < 0.05$)。

表 1 不同倍性罗汉果的地径和株径

Table 1 Basal diameters and stem widths of different ploidy *S. grosvenorii*

染色体 Genome	地径 Basal diameter(cm)	株径 Stem width(cm)
2X	0.72±0.01 ^b	0.58±0.01 ^c
3X	0.94±0.03 ^a	0.75±0.01 ^b
4X	0.98±0.05 ^a	0.78±0.01 ^a

a, b, c 不同字母表示在 0.05 水平上的差异。a, b, c different letters indicated significant level at $P < 0.05$.

2.2 不同倍性罗汉果的叶片和气孔器形态特征

2.2.1 不同倍性罗汉果的叶片形态特征

表 2 测量结果显示,不同倍性罗汉果的叶形指数相差不大,叶片均为卵圆形,但是二倍体比多倍体的叶端稍尖;三倍体和四倍体植株的叶长、叶宽、叶面积、叶厚也比二倍体的大,叶长增加 4.46%和 9.34%;叶宽增加 8.15%和 18.89%;叶面积增加 10.06%和 17.64%;叶厚增加 20.69%和 41.38%;

表现出多倍体的叶片形态均比二倍体的大, $4X > 3X > 2X$, 倍性间的差异均达到显著水平 ($P < 0.05$)。

2.2.2 不同倍性罗汉果的气孔器形态特征

对三倍体、四倍体与二倍体罗汉果的气孔器观察发现, 多倍体的气孔形状与二倍体没有太大的变化, 而大小却相差很大(表 3, 图 1~图 3)。

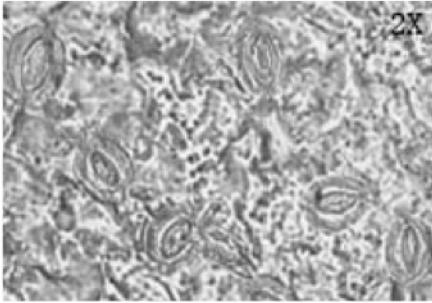


图 1 罗汉果二倍体叶片的气孔器结构($\times 400$)

Fig. 1 Characters of stomatal apparatus in diploid *S. grosvenorii* ($\times 400$)

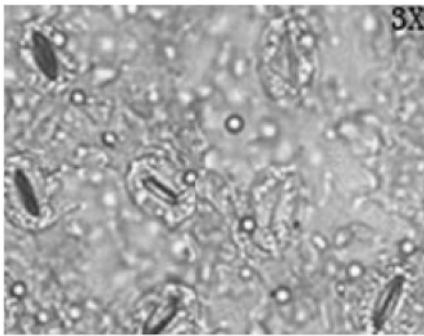


图 2 罗汉果三倍体叶片的气孔器结构($\times 400$)

Fig. 2 Characters of stomatal apparatus in triploid *S. grosvenorii* ($\times 400$)

随着染色体倍性的增加, 三倍体和四倍体罗汉果的气孔长、气孔宽、保卫细胞长和保卫细胞宽分别比二倍体增加 17.08%和 41.67%、7.75%和 13.20%、

表 2 不同倍性罗汉果的叶片形态特征

Table 2 Morphological characteristics of the leaf of different ploidy *S. grosvenorii*

染色体 Genome	叶长 Leaf length(cm)	叶宽 Leaf width(cm)	叶形指数 Index shape	叶面积 Leaf area(cm^2)	叶厚 Leaf thickness(mm)
2X	16.59 \pm 0.19 ^c	14.24 \pm 0.12 ^c	1.17	193.9 \pm 0.61 ^c	0.29 \pm 0.01 ^c
3X	17.33 \pm 0.24 ^b	15.40 \pm 0.11 ^b	1.13	213.4 \pm 1.12 ^b	0.35 \pm 0.02 ^b
4X	18.14 \pm 0.18 ^a	16.93 \pm 0.24 ^a	1.07	228.1 \pm 0.53 ^a	0.41 \pm 0.01 ^a

a, b, c 不同字母表示在 0.05 水平上的差异。a, b, c different letters indicated significant level at $P < 0.05$.

表 3 不同倍性罗汉果叶片的气孔器大小

Table 3 Stomatal apparatus size of the leaf of different ploidy *S. grosvenorii*

染色体 Genome	气孔长 Stomatal length (μm)	气孔宽 Stomatal width (μm)	保卫细胞长 Guard cell length (μm)	保卫细胞宽 Guard cell width (μm)	气孔密度 Stomatal density (个/毫米 ²)
2X	23.54 \pm 0.73 ^c	5.68 \pm 0.29 ^b	69.98 \pm 1.08 ^c	16.31 \pm 0.58 ^b	43.131 \pm 8.47 ^c
3X	27.56 \pm 0.84 ^b	6.12 \pm 0.16 ^{ab}	78.47 \pm 1.21 ^b	17.45 \pm 0.48 ^{ab}	35.537 \pm 3.85 ^b
4X	33.35 \pm 0.66 ^a	6.43 \pm 0.21 ^a	83.90 \pm 1.30 ^a	18.52 \pm 0.48 ^a	28.483 \pm 9.98 ^a

a, b, c 不同字母表示在 0.05 水平上的差异。a, b, c different letters indicated significant level at $P < 0.05$.

12.13%和 19.89%、6.99%和 13.55%, 气孔密度显著降低。因此, 气孔器的形态特征中, 气孔长、保卫细胞长表现出: $4X > 3X > 2X$, 倍性间的差异均达到显著水平 ($P < 0.05$); 气孔宽、保卫细胞宽也表现出: $4X > 3X > 2X$, 但是三倍体与四倍体、二倍体间无显著差异, 只有四倍体和二倍体间差异显著 ($P < 0.05$); 而气孔密度则相反, 表现出: $2X > 3X > 4X$, 倍性间的差异均达到显著水平 ($P < 0.05$)。

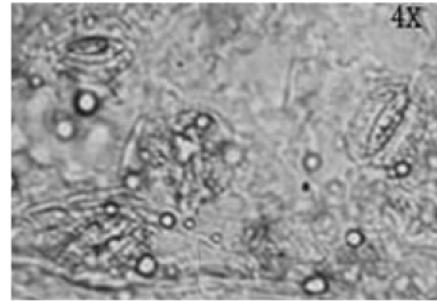


图 3 罗汉果四倍体叶片的气孔器结构($\times 400$)

Fig. 3 Characters of stomatal apparatus in tetraploid *S. grosvenorii* ($\times 400$)

2.3 不同倍性罗汉果的花器形态特征

表 4 和图 4 结果显示, 随着倍性的增加, 花瓣的长和宽逐渐增大, 多倍体的花瓣明显大于二倍体, 三倍体和四倍体分别比二倍体长 13.62%和 28.02%, 宽 17.59%和 25.93%; 子房情况与花瓣相同, 多倍体比二倍体的子房长且宽, 三倍体和四倍体分别比二倍体长 2.67%和 10.67%, 宽 2.78%和 5.56%; 花瓣长、宽和子房纵径、横径均表现出: $4X > 3X > 2X$, 倍性间的差异均达到显著水平 ($P < 0.05$)。田间观察还发现, 随着倍性的增加, 花瓣形态变大、颜色逐渐加深, 柱头也逐渐变粗、颜色加深。

表 4 不同倍性罗汉果的花器形态特征

Table 4 Morphological characteristics of the flower of different ploidy *S. grosvenorii*

染色体 Genome	花瓣长 Petal length (cm)	花瓣宽 Petal width (cm)	子房纵径 Ovary vertical diameter (cm)	子房横径 Ovary horizontal diameter (cm)
2X	2.57±0.01 ^c	1.08±0.01 ^c	1.50±0.01 ^c	0.72±0.01 ^c
3X	2.92±0.02 ^b	1.27±0.01 ^b	1.54±0.01 ^b	0.74±0.01 ^b
4X	3.29±0.03 ^a	1.36±0.03 ^a	1.66±0.01 ^a	0.76±0.01 ^a

a, b, c 不同字母表示在 0.05 水平上的差异。a, b, c different letters indicated significant level at $P < 0.05$.

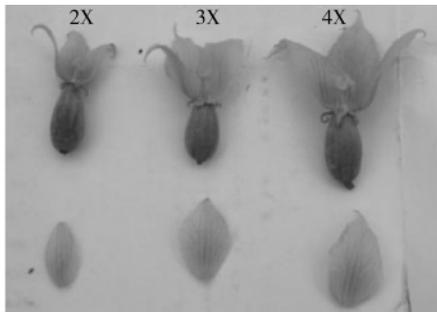


图 4 不同倍性罗汉果花器的比较

Fig. 4 Comparison of the flower of different ploidy *S. grosvenorii*

3 讨论

多倍体育种是加大植物遗传变异、改良作物品性的重要手段。多倍体植株一般表现为外部形态的巨大性,化学成分含量的相应增加,抗性的增强等优良性状^[7]。本研究的结果也发现,多倍体罗汉果包括三倍体无籽罗汉果、四倍体罗汉果,由于染色体成倍增加,其形态特征和二倍体有明显的差别:地径和株径变粗,叶片变长变宽、增厚,叶面积变大,气孔和保卫细胞变长变宽,花瓣变长、变宽,子房变大等。通过方差分析也可看出多倍体与二倍体间差异显著,而且大多数性状在多倍体间的差异也是显著的,即:四倍体比三倍体更表现出“巨大性”。已有研究认为形态观察是直观而简易的倍性鉴定方法,可以通过对植株生长发育期间的外部特征进行观察,如叶片变大加厚、叶色加深、叶形指数变小、花果较二倍体大等,都可以用于初步鉴定倍性,有利于减少工作量^[8]。因此这些特征也可以作为多倍体罗汉果鉴定的依据之一。

在植物多倍体育种中,倍性鉴定作为不可或缺的重要环节,其鉴定速度和精度,关系着多倍体育种的进程。传统的鉴定技术采用根尖、茎尖或花粉粒直径进行染色体计数和观察开花结实情况,这对技术要求高,需要有相当熟练的操作技能,而且过程繁琐,耗时

多^[9,10]。因此寻找一种快速有效的鉴定方法,对于加快育种进程有十分重要的意义。由于多倍体的根、茎、叶、花、果实、种子、气孔等与二倍体相比都有明显的差异,具有特殊的农艺性状和细胞生物学特性^[11],而且利用气孔性状鉴定操作简单、易行,已在许多植物中得到了应用^[12,13]。学者们对倍性与植株叶片气孔大小的关系的研究也已有许多文献报道^[14~16],气孔的保卫细胞,已经成为区分二倍体与四倍体细胞型及有关物种的经典方法^[17]。罗汉果叶片的气孔和保卫细胞大小、以及气孔密度与染色体倍性密切相关,而且气孔器越大,气孔的密度就越低,该结果得出了多倍体叶片气孔增大、气孔密度下降等与前人的研究结论一致的现象^[18]。因此,本研究获得的气孔指标也可以作为判定罗汉果倍性的重要依据,而且将外部形态特征与气孔特征相结合来判定倍性更加简便、快速、节省成本,缩小检测范围,减少操作量,对于加快多倍体罗汉果育种进程有十分重要的意义。

罗汉果叶片含有抗氧化性较强的黄酮^[19],罗汉果果实含有多种具有药用活性的物质^[20],罗汉果果实为其主要药用和食用部位。结合我们进一步研究可知,四倍体罗汉果的成熟果实比三倍体、二倍体的明显大,差异显著,三倍体无籽罗汉果与二倍体相比,由于其无籽的特性,虽然大小和重量不如二倍体的^[21],但是其整果利用率却大大提高;经测定罗汉果多倍体甙 V 的含量显著提高,其中 $4X > 3X > 2X$ ^[21];多倍体由于其外部形态的巨大性和化学成分含量的提高,显然比二倍具有更大的开发利用价值。因此,多倍体罗汉果的育种和研究对罗汉果产业的升级和发展有着重要的意义。

参考文献:

- [1] 农毅清,蒋林. 罗汉果甜苷的提取与药理作用研究概况[J]. 广西中医药,2008,31(1):6-8.
- [2] 苏小建,徐庆,梁荣感. 罗汉果甜苷的毒性作用研究[J]. 食品科学,2005,2(3):221-224.
- [3] 刘惠吉,曹寿椿,王华,等. 南农矮脚黄四倍体不结球白菜新品种的选育[J]. 园艺学报,1995,22(3):193-194.
- [4] 宋文昌,张玉华. 水稻四倍化及其对农艺性状和营养成分的影响[J]. 作物学报,1992,18(2):137-144.
- [5] 赵辉. 四倍体西瓜的人工诱变及无籽西瓜的新品种选育[D]. 合肥:安徽农业大学,2007.
- [6] 李锋,蒋向军,蒋水元,等. 无籽(少籽)罗汉果培育成功(简报)[J]. 广西植物,2008,28(6):727.
- [7] 何韩军,杨跃生,吴鸿. 药用植物多倍体的诱导及生物学意义[J]. 中草药,2010,41(6):1000-1006.

(下转第 184 页 Continue on page184)

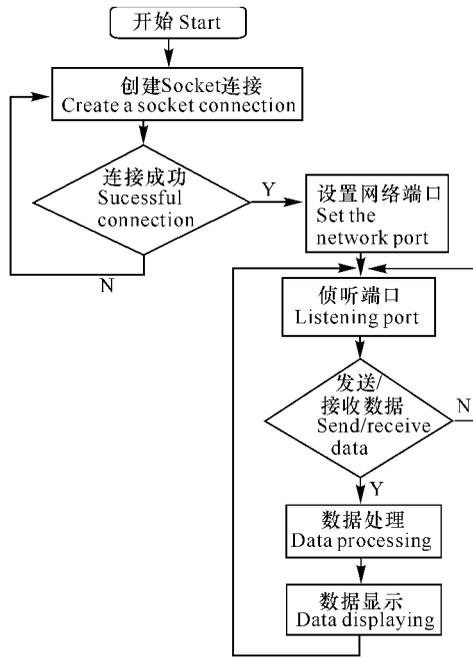


图 6 监控中心软件工作流程

Fig. 6 Program flow of the monitoring center

模块 GPRS 可实现监控中心与车载监控终端之间的远程无线通信, 监控中心可向车载监控终端发送控制命令, 控制车载监控终端的运行方式, 还可以对工程机械的运行状态进行查询。新设计的系统在功能强大的 ARMS3C2410X 硬件平台上, 将 3S 技术与

CAN 总线技术相结合, 成为一个能对施工现场的工程机械进行智能化管理的监控系统, 打破了以往单纯依靠单一网络的工程机械远程监控系统的局面。新系统融合多种功能, 其工况参数采集模块具有较强的通用性, 可推广应用到目前大部分工程机械系统, 具有较广的应用前景。

参考文献:

[1] 王国彪. 国外工程机械发展趋势[J]. 机电新产品导报, 2001(01):160-162.
 [2] 焦生杰, 顾海荣. 沥青洒布车及其控制技术现状[J]. 筑路机械与施工机械化, 2007(01):1-4.
 [3] 牛占文, 土树新, 郑尚龙. 机群智能化工程机械故障诊断系统研究[J]. 机械科学与技术, 2003(06):999-1002.
 [4] S3C2410A 中文数据手册(第一章), 杭州立宇泰电子有限公司编著(Version1.0).
 [5] 陈彩华, 龙卫兵, 刘彬. 基于 ARM-Linux 的家用网络平台设计与实现[J]. 计算机测量与控制, 2010, 18(9): 2176-2177, 2193.
 [6] 杜力坤·苏来曼, 刘吉超, 艾德海江·马那甫. 基于 LM2576 的数控可调开关电源设计[J]. 新疆师范大学学报: 自然科学版, 2009, 12(4): 69-72, 87.

(责任编辑: 陈小玲 邓大玉)

(上接第 180 页 Continue from page180)

[8] 张全美, 张明方. 园艺植物多倍体诱导研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 2003, 25(4): 223-228.
 [9] 鲁文英, 漆燕玲. 饲用甜菜染色体倍性与叶片气孔性状相关性研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2008, 43(2): 70-73.
 [10] 张凌媛, 郭启高, 李晓林, 等. 枇杷气孔保卫细胞叶绿体数目与倍性相关性研究[J]. 果树学报, 2005, 22(3): 229-233.
 [11] 常月梅. 果树多倍体鉴定进展[J]. 山西林业科技, 2001(1): 1-4.
 [12] Ahmed N. A technique for rapid identification of ploidy levels in tea[J]. Two and a Bud, 1993(2): 31-33.
 [13] Choi Miyong. Improvement of chloroplast observation technique in guard cells for ploide detection of microspore derived plants in broccoli[J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 1997, 38(6): 666-669.
 [14] 贾兴华. 用气孔保卫细胞叶绿体计数法测定烟草单倍体和二倍体[J]. 中国烟草, 1980(3): 55-57.
 [15] 李贲, 石荫坪, 岭怀瑞. 应用气孔性状对苹果与梨的倍性判别分析[J]. 果树科学, 1999, 16(1): 9-13.
 [16] 杨今后, 扬新华. 桑叶气孔保卫细胞叶绿体数与染色体倍性数关系[J]. 浙江农业科学, 1990(5): 238-240.
 [17] Stebbins, G L. Chromosomal Evolution in Higher Plants [M]. London: Edward Arnold Press, 1971: 216.
 [18] 付金娥, 覃斯华, 李天艳, 等. 秋水仙素诱变薄皮甜瓜同源四倍体研究[J]. 中国瓜菜, 2008(2): 11-15.
 [19] 陈全斌, 杨建香, 程忠泉, 等. RP-HPLC 法测定罗汉果叶中总黄酮含量[J]. 广西科学, 2005, 12(1): 43-45.
 [20] 黄志江, 黄捷, 孙滢川, 等. 罗汉果的药用研究[J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 1998, 16(4): 75-79.
 [21] 黄夕洋, 梁萍, 李锋, 等. 不同倍性罗汉果果实的生长与甙类含量动态变化规律的研究[J]. 广西植物, 2009, 29(6): 875-880.

(责任编辑: 邓大玉)