

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201404001

刘晓明, 陈龙清, 郑伟. 过路黄自然三倍体的发现[J]. 广西植物, 2015, 35(1):373–377

Liu XM, Chen LQ, Zheng W. Discovery of natural triploid in *Lysimachia christinae*[J]. Guihaia, 2015, 35(3):373–377

过路黄自然三倍体的发现

刘晓明¹, 陈龙清², 郑伟^{1*}

(1. 昆明理工大学 现代农业工程学院, 昆明 650224; 2. 华中农业大学 园艺林学学院, 武汉 430070)

摘要: 过路黄为报春花科的多年生匍匐草本植物, 是有名的中药材, 也是十分优质的园林地被植物。该文报道了过路黄的自然三倍体, 以期为过路黄的开发利用提供新的参考资料。该研究先将湖北省武汉狮子山和黄石月亮山的过路黄居群引种至同一实验地进行栽培, 然后观测其植株形态和叶片气孔大小, 并利用常规压片法进行细胞染色体的计数与核型分析。结果表明: 源自黄石月亮山的过路黄的叶片长度、叶片宽度、叶片面积、花瓣长度、花瓣宽度、花瓣面积及叶背气孔面积均显著高于源自武汉狮子山的过路黄; 黄石月亮山的过路黄核型公式为 $3n=36=3m+3sm+6st+24t$, 与武汉狮子山的过路黄核型 $2n=24=2m+2sm+4st+16t$ 不同。基于上述形态与核型数据, 该文认为黄石月亮山的过路黄居群为自然三倍体。过路黄自然三倍体的发现丰富了过路黄的多倍体资料, 不仅能为过路黄的遗传多样性及进化研究提供参考, 还能为过路黄的药用、园林应用及其新品种的培育提供优良材料。

关键词: 过路黄; 形态; 核型; 同源三倍体

中图分类号: Q943; Q949.773.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)03-0373-04

Discovery of natural triploid in *Lysimachia christinae*

LIU Xiao-Ming¹, CHEN Long-Qing², ZHENG Wei^{1*}

(1. College of Modern Agricultural Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China;

2. College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

Abstract: *Lysimachia christinae* Hance (Christina loosestrife), a mat-forming perennial herb from the Primulaceae family, is a famous Chinese medicinal material and excellent ground cover plant for landscaping. The natural triploid of *L. christinae* is reported here so as to provide new reference for the development and utilization of *L. christinae*. In this study, *L. christinae* plants introduced from Lion Mountain population in Wuhan and Moon Mountain population in Huangshi were cultivated in the same text site. And then the plant morphology and the stoma size were observed. The chromosome numbers and karyotypes were investigated by the conventional pressing plate method. The results showed that the leaf length, leaf width, leaf area, length of petal, petal width, petal area and leaf stoma area of *L. christinae* from Moon Mountain population in Huangshi were significantly higher than those of *L. christinae* from Lion Mountain population in Wuhan. In addition, the karyotype formula of *L. christinae* from Moon Mountain population in Huangshi was $3n=36=3m+3sm+6st+24t$, which was different with that of *L. christinae* from Lion Mountain population in Wuhan ($2n=24=2m+2sm+4st+16t$). Therefore, in this paper, the *L. christinae* from Moon Mountain population in Huangshi was identified as natural triploid based on abovementioned morphology and chromosome datum. The discovery of natural triploid in *L. christinae* enriched the polyploidy data of *L. christinae*. It would not only provide reference for research on genetic diversity and evolution of *L. christinae*, but

收稿日期: 2014-06-24 修回日期: 2014-08-21

基金项目: 国家自然科学基金(311015665, 31360488)

作者简介: 刘晓明(1989-), 男, 湖南娄底人, 硕士研究生, 从事细胞生物学研究, (E-mail)1015883384@qq.com。

*通讯作者: 郑伟, 副教授, 硕士生导师, 主要从事园林植物与应用研究, (E-mail)57280234@qq.com。

also supply the excellent material for medicine, landscaping and breeding.

Key words: *Lysimachia christinae*; morphology; karyotype; autotriploid

过路黄(*Lysimachia christinae*)为报春花科(Primulaceae)珍珠菜属(*Lysimachia* L.)的多年生草本植物,分布于我国华南、华中及西南地区,产于海拔几十米至2 300 m的林缘及路边(陈封怀等, 1989)。过路黄是著名的中草药植物,含有黄酮类和三萜皂苷类等药用成分,具有清热利湿、活血化瘀、解毒消痈、抗菌消炎的作用(常海涛等, 2004; Yang *et al.*, 2009)。除了具有较高的药用价值外,过路黄也是十分优良的乡土园林地被植物资源(Zheng *et al.*, 2009a)。由于过路黄茎匍匐,铺展能力强,厚度均匀(5~10 cm),春季布满金黄色的小花,铺地效果十分漂亮。目前,过路黄的彩脉变异类型亦被引种到园林绿化中,且被培育成彩叶地被植物新品种(Zheng *et al.*, 2009b)。

过路黄的染色体数目为24(周筱玲等, 1999; 邵剑文等, 2004; 孙爱群等, 2007),目前还没有关于过路黄多倍体的报道,本文将在形态与核型分析的基础上,报道过路黄的自然三倍体。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的过路黄于2007年3月上旬分别采自湖北武汉狮子山(30°28' 50" N, 114°21' 11" E, 海拔34 m)和湖北黄石月亮山(30°12' 40" N, 114°55' 34" E, 海拔110 m)的自然居群,每居群30~50株,凭证标本的编号分别为Zheng *et al.* 0807和Zheng *et al.* 0806。采集的植株立即在华中农业大学温室的育苗床进行扦插繁殖,繁殖基质蛭石:珍珠岩:腐殖土比为1:1:1,温室的温度控制在28/15℃,湿度控制在(85±5)%,光照为自然光照。各植株的插条数为50,扦插1周之后,各插条陆续生出3~5条不定根。10 d后,分别选择30个同质的生根植株在田间随机种植(5行×6排),各植株的间隔距离为10 cm。2个月后,观测不同居群来源过路黄的植株形态。

1.2 植株形态观测

形态观测指标包括节间长度、叶片和花瓣长度、宽度、面积和叶背气孔面积。节间长度选择茎端倒数第三个节间,用于形态测定的叶片选自顶端倒数

第三节处的成熟健康叶片。叶片和花瓣面积的测定方法:首先采用透明胶将叶片和花瓣平整的粘贴于白纸上,然后利用HP-Scanjet G4010扫描仪扫描成图片,最后采用Auto CAD 2004软件在电脑上测量。长度和宽度均采用游标卡尺进行测量。叶片背面的气孔面积采用透明胶法通过显微镜进行观测,每个叶片观测10个气孔,分别测出气孔的长度和宽度,气孔面积的计算方法为长×宽×3.14×0.25。各指标重复10次,10个样品分别从30个田间植株中随机抽取。

1.3 细胞染色体核型分析

染色体制片采用常规的压片法,取田间植株的幼嫩枝条(20~30 cm)置于18~20℃(黑暗)培养20~50 h。待根长至1~2 cm时,剪取1 cm左右的根尖投入对二氯苯饱和水溶液中处理3~4 h。在用卡诺固定液(冰乙酸:无水乙醇=1:3)固定24 h。将固定好的根尖取出,用蒸馏水洗净,加入数滴1 N的盐酸,放入60℃水浴锅中,解离15~30 min。蒸馏水冲洗干净后,用火焰法制片,用Nikon 80i正置显微镜进行观察并进行拍照。各居群采样10个田间植株,每植株至少拍摄5张染色体数目及形态清晰可见的照片,后统计染色体数目及其比例。采用Photoshop软件对照片进行适当调整,以便进行核型分析。核型分析参照Levan(1964)的标准并按李懋学、陈瑞阳(1985)建议的方法。核型分类按Stebbins(1971)的方法划分,核型不对称性系数计算用Arano(1963)的方法。

1.4 数据分析

实验数据均采用Excel进行整理,方差分析(ANOVA)及多重比较(Duncan's)采用SAS 8.0统计软件分析,显著性标准 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 形态分析

源自两个居群的过路黄植株在同一实验地中均能迅速生长,表现出良好的铺展能力(图1),茎蔓长度20~60 cm,除先端1~3个节外,基部节处均生出1~3条不定根。黄石月亮山的过路黄节间长度为4.22 cm,显著高于武汉狮子山的过路黄节间长

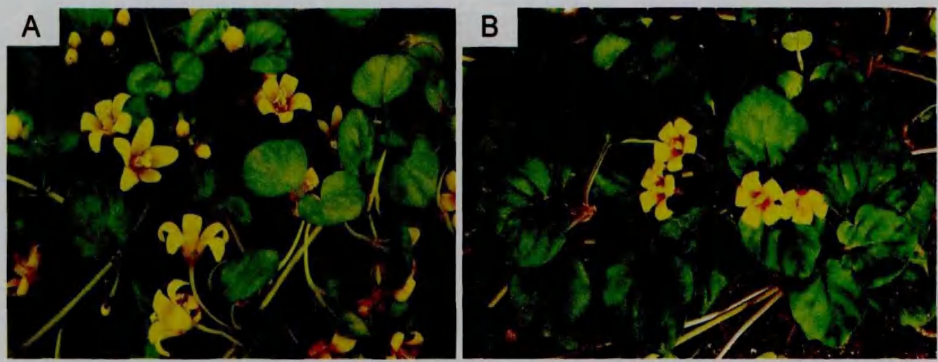


图 1 两个过路黄居群的植株形态 A. 源自武汉狮子山；B. 源自黄石月亮山。下同。

Fig. 1 Plant morphology in two populations of *L. christinae* A. From Lion Mountain in Wuhan; B. From Moon Mountain in Huangshi. The same below.

表 1 两个过路黄居群的形态特征

Table 1 Morphological traits of two populations of *L. christinae*

居群 Population	叶面积 Leaf area (cm ²)	叶长 Leaf length (cm)	叶宽 Leaf width (cm)	气孔面积 Stoma area (μm ²)	花瓣面积 Petal area (cm ²)	花瓣长 Petal length (cm)	花瓣宽 Petal width (cm)
黄石月亮山 Moon Mountain in Huangshi	7.85 ± 0.80a	3.49 ± 0.21a	3.38 ± 0.31a	659.11 ± 51.57a	0.88 ± 0.06a	1.94 ± 0.10a	1.02 ± 0.05a
武汉狮子山 Lion Mountain in Wuhan	6.08 ± 0.66b	2.95 ± 0.18b	2.82 ± 0.22b	477.05 ± 47.80b	0.72 ± 0.05b	1.75 ± 0.07b	0.84 ± 0.05b

度(2.85 cm)。武汉狮子山的过路黄结实率为 10.18%，而黄石月亮山的过路黄结实率为 0。

源自黄石月亮山的过路黄的叶面积、叶长、叶宽、气孔面积、花瓣面积、花瓣长和花瓣宽均显著高于源自武汉狮子山的过路黄(表 1)。由此可见，两个过路黄居群的遗传背景差异较大，是否存在染色体倍性差异，还需要细胞染色体方面的证据。

2.2 细胞染色体核型分析

细胞染色体的核型分析表明，武汉狮子山的过路黄的 50 个细胞染色体数目均为 24(图 2)，核型公式为 $2n=24=2m+2sm+4st+16t$ (表 2)，其染色体臂比的变异幅度为 1.01~∞，臂比大于 2:1 的染色体比例为 91.67%，最长与最短染色体之比为 2.20，属 3B 型。

黄石月亮山的过路黄的 50 个细胞中，有 94.12% 的细胞染色体数目为 36(图 2)，按李懋学等(1985)提出的“超过 85% 的细胞具恒定一致的染色体数目，即可认为是该植物的染色体数目”的建议，黄石月亮山的过路黄细胞染色体数目可确定为 36，其核型公式为 $3n=36=3m+3sm+6st+24t$ (表 2)，染色体臂比的变异幅度为 1.01~∞，臂比大于 2:1 的染色体比例为 83.33%，最长与最短染色体之

比为 1.98，属 3A 型。

3 讨论与结论

武汉狮子山和黄石月亮山两个居群的过路黄被引种到环境条件完全一致的试验地进行栽培时，在形态上表现出了较大的差异。这就说明，两个居群野生植株的形态变异并不是由于两个居群的环境条件差异引起的环境饰变，而是由遗传所控制的。黄石月亮山的过路黄的叶长、叶宽、叶面积、叶背气孔面积、花瓣长、花瓣宽、花瓣面积等显著高于武汉狮子山的过路黄，这就暗示，黄石月亮山的过路黄可能为多倍体。而进一步的染色体核型分析结果显示：黄石月亮山的过路黄染色体核型为 $3n=36=3m+3sm+6st+24t$ ，而武汉狮子山的过路黄染色体核型为 $2n=24=2m+2sm+4st+16t$ 。因此，基于形态和染色体核型数据，黄石月亮山的过路黄应为自然三倍体，甚至可能为同源三倍体。但是，黄石月亮山的过路黄核型类型为 3A 型，而武汉狮子山的过路黄核型类型为 3B 型，因此，黄石月亮山的过路黄是否为同源三倍体，还需通过花粉特征(Karlsdottir et al., 2008)，尤其是花粉母细胞减数分裂行为(刘学

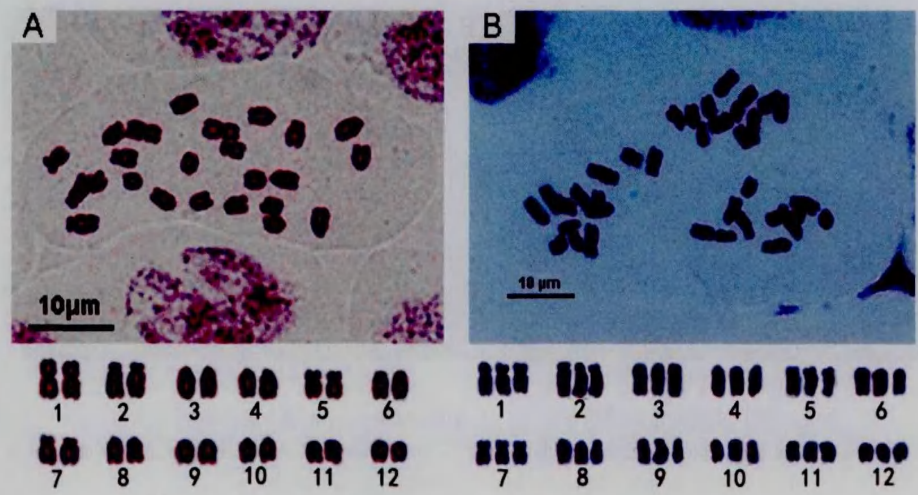


图 2 两个过路黄居群的细胞染色体核型
Fig. 2 Chromosomal karyotypes of two populations of *L. christinae*

表 2 两个过路黄居群的细胞染色体参数
Table 2 Parameters of cell chromosomes
of two populations of *L. christinae*

居群 Population	序号 No.	相对长度 Relative length (%) (S+L=T)	臂比 Arm ratio (Long/ Short)	类型 Classification
武汉狮子山 Lion Mountain in Wuhan	1	5.54+5.65=11.19	1.03	m
	2	2.53+8.50=11.03	3.36	st
	3	10.71	∞	t
	4	8.46	∞	t
	5	1.62+6.43=8.05	3.96	st
	6	8.37	∞	t
	7	1.85+5.51=7.36	2.99	sm
	8	8.11	∞	t
	9	7.25	∞	t
	10	6.69	∞	t
	11	6.64	∞	t
	12	6.14	∞	t
黄石月亮山 Moon Mountain in Huangshi	1	4.91+8.14=13.05	1.66	m
	2	2.03+8.75=10.78	4.31	st
	3	9.52	∞	t
	4	9.04	∞	t
	5	2.07+6.59=8.66	3.18	st
	6	8.1	∞	t
	7	2.72+4.71=7.43	1.73	sm
	8	7.08	∞	t
	9	7.38	∞	t
	10	7.33	∞	t
	11	6.27	∞	t
	12	5.36	∞	t

生等,2013)展开进一步的验证。

本研究中,武汉狮子山的过路黄核型公式为 $2n=24=2m+2sm+4st+16t$,与孙爱群等(2007)报道的过路黄核型一致,而与周筱玲等(1999)和邵剑文等(2004)报道的 $2n=24=2m+4sm+6st+12t$

有一定的差异。造成以上差异的原因可能在于实验材料的地理距离相差较远,而这些不同产地的过路黄在细胞的染色体核型上本身存在着一定的多样性。这也暗示,不同产地的过路黄可能存在较高的遗传多样性。

多倍体是植物进化的主要力量,在应用中,多倍体因其具有巨大性等特点而备受人们的亲睐。目前,三倍体的发生主要是通过人工获得,如通过四倍体与二倍体杂交后通过胚抢救获得三倍体柑橘植株(刘可慧等,2010),而自然三倍体相对较少。因此,在后继研究中,探索过路黄自然三倍体的发生机理,将有利于人们发现或创造更多的三倍体植株。

过路黄自然三倍体植株没有种子产生,但可通过匍匐茎进行茎段撒播繁殖(Zheng *et al.*, 2011),从而减少了种子扩散带来的入侵性问题。因此,过路黄自然三倍体具有培育成园林地被植物新品种的潜力。此外,过路黄自然三倍体的药用成份含量是否有较大的变化,还有待进一步的研究。

参考文献:

Arano H. 1963. Cytological studies in subfamily Carduoideae (Compositae) of Japan. IX. The karyotype analysis and phylogenetic considerations on *Pertya* and *Ainsliaea*[J]. *Bot Mag Tokyo*, **76**:32-39
Chang HT(常海涛), Kong WL(孔维梁), Tu PF(屠鹏飞). 2004. Chemical and pharmacological advances of study on *Lysimachia*(珍珠菜属植物化学成分及药理作用研究进展)[J]. *Chin J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **29**(4):295-298
Chen FH(陈封怀), Hu QM(胡启明). 1989. *Flora of China*(中国植物志)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社):1-160

Karlsdottir L, Hallsdottir M, Thorsson AT, et al. 2008. Characteristics of pollen from natural triploid *Betula hybrids*[J]. *Grana*, **47**(1):52-59

Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. *Hereditas*, **54**(2):201-220

Li MX(李懋学), Chen RY(陈瑞阳). 1985. A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants(关于植物核型分析的标准化问题)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **4**(2):297-302

Liu XS(刘学生), Chen L(陈龙), Wang JX(王金鑫), et al. 2013. Discovery and identification of natural triploid ploidy of Chinese jujube cultivar 'Pingguozao'('苹果枣')自然三倍体倍性的发现与鉴定[J]. *Acta Horti Sin*(园艺学报), **40**(3):426-432

Liu KH(刘可慧), Yu FM(于方明), Zhang QM(张秋明), et al. 2010. Regenerating triploid citrus plants by embryo rescue technique(应用胚挽救技术获得三倍体柑橘植株)[J]. *Guihaia*(广西植物), **30**(2):246-249

Shao JW(邵剑文), Li XH(李晓红), Han L(韩露), et al. 2004. A study on karyotypes of five species in *Lysimachia*(5种珍珠菜属植物的核型分析)[J]. *Acta Bot Yunan*(云南植物研究), **26**(4):427-433

Stebbins GL. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants [M]. London:Edward Arnold(Publishers) Ltd

Sun AQ(孙爱群), Xiang H(向红), Tian YZ(田应洲), et al. 2007. Study on karyotypes of four species in *Lysimachia*(珍珠菜属四种植物的核型分析)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **25**(5):509-512

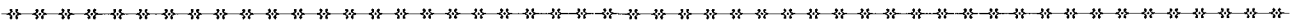
Yang SL, Lihua TLH, Tian JK, et al. 2009. Anti-tumor constituents of four medicinal plants from *Lysimachia* genus [J]. *Planta Medica*, **75**(4):412-412

Zheng W, Xu XD. 2011. Single-node stolonizing, an innovative propagation method for two landscape stoloniferous *Lysimachia* L. ground covers[J]. *Inter Conf Agric & Biosyst Eng*;317-319

Zheng W, Xu XD, Zhao KG, et al. 2009a. *Lysimachia christinae* 'Zixin': a new groundcover plant[J]. *Hortic Sci*, **44**(2):474-475

Zheng W, Xu XD, Dai H, et al. 2009b. Direct regeneration of plants derived from *in vitro* cultured shoot tips and leaves of three *Lysimachia* species[J]. *Sci Hortic*, **122**(1):138-141

Zhou XL(周筱玲), Liao L(廖亮), Chen Y(陈晔), et al. 1999. Study on karyotypes of two species in *Lysimachia*(Primulaceae) from China(两种过路黄的核型研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **19**(3):236-238



(上接第 392 页 Continue from page 392)

The review of higher plants glutamine synthetase(高等植物谷氨酰胺合成酶研究进展)[J]. *J Biol*(生物学杂志), **18**(4):1-3

Martin A, Lee J, Kichey T, et al. 2006. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production[J]. *Plant Cell*, **18**:3 252-3 274

Masakazu T, Ulrika V, Brad B, et al. 2004. Arabidopsis thaliana GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts[J]. *Plant Cell*, **16**:2 048-2 058

Miflin BJ, Habash DZ. 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops[J]. *J Exp Bot*, **53**:979-987

Morey KJ, Ortega JL, Sengupta-Gopalan C. 2002. Cytosolic glutamine synthetase in soybean is encoded by a multigene family, and members are regulated in an organ-specific and developmental manner[J]. *Plant Physiol*, **128**:182-193

Takashi T, Takeshi Y, Katsushige M, et al. 1998. γ -Glutamyl Transfer Reactions by glutaminase from *Pseudomonas nitroreducens* IFO 12694 and their application for the syntheses of theanine and γ -Glutamylmethylamide[J]. *Biosci Biotechnol & Biochem*, **62**(7):1 279-1 283

Sasaoka K, Kito M, Onishi Y. 1965. Some properties of the theanine synthesizing enzyme in tea seedlings[J]. *Agric & Biol Chem*, **29**:984-98

Shi CY(史成颖), Wan XC(宛晓春), Jiang CJ(江昌俊) et al. 2007. Method for high-quality total RNA isolation from tea plant [*Camellia sinensis*(L.) O. Kuntze](提取高质量茶树总 RNA 的方法研究)[J]. *J Anhui Agric Univ*(安徽农业大学学报), **34**(3):360-363

Tsushida T, Takeo T. 1984. Occurrence of theanine in *Camellia japonica* and *Camellia sasanqua* seedlings [J]. *Agric Biol Chem*, **48**(11):2 861-2 862

Qiao FL(乔富廉). 2002. Analysis Determination Technique of Plant Physiology Experiment(植物生理学实验分析测定技术)[M]. Beijing(北京): China Agriculture Science and Technique Press(中国农业科技出版社):130

Shi CY(史成颖), Wan XC(宛晓春), Jiang CJ(江昌俊), et al. [J]. 2007. Method for high-quality total RNA isolation from tea plant(提取高质量茶树总 RNA 的方法研究)[J]. *J Anhui Agric Univ*(安徽农业大学学报), **34**(3):360-363

Wan XC(宛晓春). 2003. Tea Biochemistry(茶叶生物化学)[M]. 3rd Ed(第3版). Beijing(北京): China Agriculture Science and Technique Press(中国农业科技出版社):32-34, 319-350

Yang XQ(杨贤强). 1987. Physiological and biochemical basis of nitrogen metabolism characteristics of tea plant [*Camellia sinensis*(L.) O. Kuntze](茶树氮代谢特点的生理生化基础)[J]. *J Tea Fujian*(福建茶叶), **1**:11-14

Yang XQ(杨贤强). 1987. The physiological and biochemical basis of nitrogen metabolism characteristics in tea plant(茶树氮代谢特点的生理生化基础)[J]. *Tea Fujian*(福建茶叶), **1**:11-14

Zhang CF, Peng SB, Peng XX, et al. 1997. Response of glutamine synthetase isoforms to nitrogen sources in rice(*Oryza sativa* L.) roots[J]. *Plant Sci*, **125**:163-170

Zhu WX(朱文嫻), Li XH(黎星辉), Wang LY(王丽鸳), et al. 2008. Construction of *E.coli* recombinant engineered strain for theanine biosynthesis with GS gene embedded(利用 GS 基因构建茶氨酸生物合成工程菌的研究). [J]. *J Tea Sci*(茶叶科学), **28**(4):242-248