

四川王朗自然保护区大熊猫主食竹—— 缺苞箭竹(*Fargesia denudat*)不同发育时期 酯酶和 α -淀粉酶同工酶的研究

罗定泽

(四川师范大学
生物系, 成都)

赵佐成

(中国科学院
成都生物研究所)

王季勋

(四川省林业科
学研究所, 成都)

提 要 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳, 对生长在亚高山地带的大熊猫主食竹的实生苗、成竹和开花竹中不同发生年龄鞭系, 以及同一鞭系内一系列生长年龄竹株作了酯酶、 α -淀粉酶同工酶的比较研究。结果表明, 同一竹种的不同发生年龄鞭系之间叶酯酶电泳类型存在明显差异, 而同一鞭系内 α -淀粉酶同工酶的变化表现与竹株生长年龄有关。由此认为, 上述同工酶系统可以用作竹类无性系发育分析的生理指标。

关键词 竹子; 植物发育年龄; 同工酶

王朗自然保护区位于四川盆地西北边缘的岷山南段, 境内地势相对高差悬殊, 涪江支流白马河横贯此区, 自西北直泻奔下东南。在海拔2600—2800米的沿河地带, 多有干涸支流河谷, 气候温和, 雨量适中, 植被属亚高山阴暗针叶林。缺苞箭竹(*Fargesia denudat*)和紫箭竹(*F. nitida*)等高山箭竹主要沿干涸河谷分布, 多生长在原始云杉和冷杉林下, 是本区大熊猫的主食竹。1974年以来在大窝凼和竹根岔一带, 缺苞箭竹发生了成片开花枯死现象, 部分存活竹丛仍继续零星开花。与此同时, 天然更新的实生苗近半数已高达80—110公分。如何促进林下竹丛开花之后的人工更新, 为珍稀动物大熊猫创造栖息基地, 乃是目前面临的重要理论与实践问题。

一般认为, 导致大熊猫种族退化和绝灭的主要原因是箭竹周期性的开花枯死^[4]。但目前对于竹子植物开花的生理机制不清楚, 有关竹子开花的周期性规律^[6,7,11], 尚在探索之中。竹子开花间隔期可长达几十年至上百年^[7], 这造成了认识竹子植物生长发育及开花结实规律的困难。至今对某些竹种开花习性的观察表明, 同一竹种可以表现定期成片开花, 也可以表现无规则零星开花^[5,11]。1974—1976年, 王朗自然保护区内缺苞箭竹大面积开花、枯死, 但是仍有少数竹丛营养生长旺盛, 另外一部分存活竹中, 有的继续发生整丛开花, 有的逐年零星开花而地下鞭系发育良好, 可继续发新笋。可见在古老的野生竹种群内, 植物开花习性表现出明显的多样性。这一现象为促进竹林开花后复壮

本文于1987年8月23日收到。

*四川省林业科学研究所杨其昌同志参加了部分野外工作。

更新,或向自然保护区移植大熊猫主食竹种的不同无性系材料混合造林,提供了启示。植物种内和种间开花习性的多样性,来自其遗传多型与环境的相互作用^[9],但有关竹类植物发育进程与开花周期等生理性状研究,至今尚缺乏单克隆实验系统的完整资料。如何分析竹子天然无性繁殖系的发生年龄,则是认识竹子开花周期性与判别相同竹种内开花习性生态型差异的重要研究途径。为此,本工作试图借助同工酶分析高山箭竹的发育过程,通过比较、研究一系列发生年龄的鞭系和竹株的酶谱类型,为各种促进竹林开花后人工更新的措施提供发育生理学指标。

材料与 方法

供试材料:缺苞箭竹,属灌木状竹类。地下茎为复轴型,5年生以上实生苗由丛生渐转散生。秆高1—3米,圆筒形,直径1—2厘米,每节具多数紧密簇生的小枝;秆箨早落;叶片狭矩形,长5—10厘米,宽5—10毫米,先端渐尖,边缘具小锯齿,基部楔形。着生花枝的主轴弧状弯曲,每节分出花枝1—数枚;总状花序密生多数小穗,颖二片,几等长;外稃膜质,披针形,先端尖;内稃具二脊,脊上粗糙;雄蕊三枚,花丝分离;花柱三枚。花期6—8月。

取样:仔细刨开各供试竹丛的地下茎(竹鞭),按竹鞭发生顺序,选取不同生长年龄竹株的叶片进行分析。1.对各种发生年龄竹鞭系中两年生立竹主枝梢部按相同叶层次(枝盘)取当年生展开叶片:(1)5—6年生实生苗,(2)9—10年生实生苗,(3)20年以上成年竹鞭系,(4)局部零星开花竹鞭系,(5)全部开花竹鞭系。2.对未开花的成年竹鞭系内各种生长年龄的竹株梢部按相同叶层次取当年生展开叶片:(1)1—2年生竹株,(2)3—4年生竹株,(3)5年生竹株,(4)6年生竹株,(5)8年生竹株。

制样:叶片迅速冰冻,进入实验室研磨提取。制备缓冲液:酯酶采用0.1M Tris-HCl缓冲液,pH 8.0,并含6 mM 抗坏血酸和6 mM 半胱氨酸。 α -淀粉酶采用0.1M 醋酸缓冲液,pH 5.0。匀浆经10,000转/分离心10分钟,取上清液测定。

同工酶的测定:采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法。选用7%下层胶,4%上层胶和低离子强度的阴离子缓冲系统^[10]。按各样品槽100mg可溶性蛋白质质量加样。电泳在4℃下进行3小时。酯酶活性以醋酸- α -萘酯加坚牢兰(B盐)染色显示, α -淀粉酶以稀碘液负染法^[10]显带。上述酶制备液中可溶性蛋白质含量用Folin-酚法测定^[8]。各同工酶酶谱及时拍照记录。

实验结果

1.竹子叶片酯酶同工酶条带按电泳迁移快慢分为快(F)、中(M)和慢(S)三个谱区,各区别有6或5条带(图1)。同工酶的主要变化出现在F和M两区。不同发生年龄鞭系之间酯酶电泳类型有明显差异:

(1)开花竹与未开花竹鞭系之间同工酶电泳类型的差别主要是:实生苗和未开花成年竹的F区酶带有5—6条(图1:A、B),而开花竹或部分开花竹的F区只有1或3条带(图1:C)。实生苗和未开花成年竹的M区酶带强度较弱(图1:A、B),而开花竹或部分开花竹的M区产生2或3条强带(图1:C)。

(2) 实生苗的两个鞭系与成年竹鞭系之间同工酶电泳类型的差别主要在于 F_4 和 F_5 两条 F 区酶带迁移率的变化 (图 1: A、B), 其中实生苗的 F_{4a} 和 F_{5a} 迁移率分别略低于成年竹中 F_4 和 F_5 。

(3) 实生苗两个鞭系之间酶谱变化的主要特点是: 随实生苗年龄增大, F_3 和 F_6 两条较弱酶带的迁移率趋同成年竹 (图 1: A)。在部分开花竹与全部开花竹鞭系之间酶谱异同是: M 区都有相同的三条强带, 但全部开花竹的 S 区酶带消失, 且 F 区酶带减少二条 (图 1: C)。

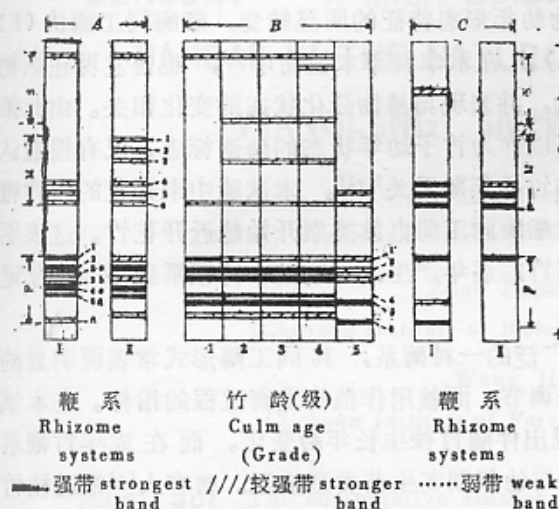


图 1 不同竹鞭系之间酯酶同工酶的比较。

A: 实生苗, 包括 5—6 年 (I) 和 9—10 年 (II) 实生苗。B: 未开花成竹, 竹龄按 1—5 级增加, 详细见正文。C: 开花竹, 包括部分开花 (I) 和整丛开花 (II)。

Fig. 1 Comparison of leaf EST isozymes between different bamboo rhizome systems. A, Seedlings. Including 5—6 years old (I) and 9—10 years old (II). B, Nonflowering bamboo. Culms ages increase in the series 1—5, for details refer to text. C, Flowering bamboo. Including part flowering (I) and full flowering (II).

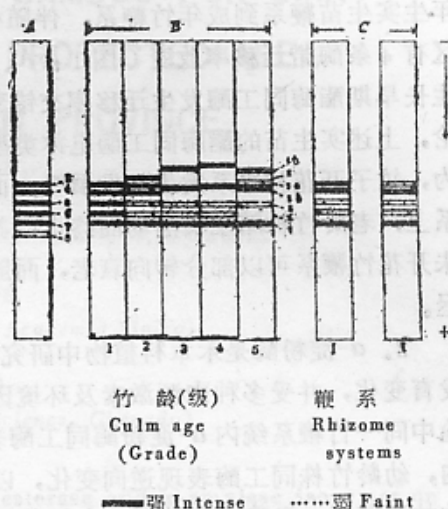


图 2 不同竹鞭系之间 α -淀粉酶同工酶的比较。

A: 实生苗。B: 未开花成竹, 竹龄分 1—5 级, 与图 1 相同。C: 开花竹, 包括部分开花 (I) 和整丛开花 (II)。

Fig. 2 Comparison of leaf α -AMY isozymes between different bamboo rhizome systems. A, Seedlings. B, Nonflowering bamboo. Culms ages in series 1—5 as for Fig. 1. C, Flowering bamboo. Including part flowering (I) and full flowering (II).

2. 在同一未开花成年竹鞭系中, 2—6 年生竹株之间酯酶同工酶电泳类型相同, 但 8 年生竹株发生明显变化 (图 1: B-5), 即: M_5 和 M_6 两条带强度增加, F 区的 F_2 — F_4 三条带减弱至消失, F_1 和 F_6 两条带增强, 其中 F_6 迁移率并略增大。上述变化导致 8 年生竹株的酶谱类型接近部分开花竹 (图 1: C-I)。

3. α -淀粉酶同工酶的变化明显发生在未开花成年竹鞭系内一系列生长年龄的竹株之间 (图 2: B)。随竹株生长年龄增大, 离负极较近的酶带电泳迁移率表现快—慢—快的连续变化, 而以 6 年生竹株酶带迁移最慢 (图 2: B-4)。实生苗和开花竹则缺乏具上述变化特征的酶带。比较各竹鞭系统之间幼龄竹株酶谱, 表明未开花成竹鞭系上幼竹酶谱与实生苗相近, 而开花竹鞭系上幼竹的 α -淀粉酶强带数目减少 (图 2: C)。

讨 论

1. 在禾本科植物中,酯酶同工酶常用于遗传与发育分析。在植物个体发育过程中同工酶常见的变化形式是酶带强度或数目的改变,一般归属于同工酶的数量型变化。本工作对竹子叶片酯酶同工酶的分析表明,同一竹鞭系统内各幼龄和壮龄竹株之间酶谱类型相同,而不同发生年龄的鞭系之间,同工酶差异已超过数量型变化特征。酯酶同工酶这一变化特点可为研究竹类无性系间发育状态差异提供有用的参考。本试验箭竹从5—6年生实生苗鞭系到成年竹鞭系,伴随植物幼年形态特征的明显转变,酯酶同工酶快(F)区有4条酶带迁移率改变(图1:A、B)。在禾本科草本植物中^[3],也曾发现在植物生长早期酯酶同工酶发生迁移率交错变动,并表现与植物分化状态的变化相关。由此推论,上述实生苗的酯酶同工酶电泳类型可以作为竹子幼年状态的酶谱标志。已有报道认为,竹子开花按鞭系发生和发展^[5],而与竹株年龄无关^[1,2]。本试验中未开花的成竹鞭系上,老龄竹株随生长活动而终止,其叶酯酶同工酶电泳类型开始趋近开花竹。这表明未开花竹鞭系可以部分转向衰老,而随新竹的逐年产生,导致整个竹鞭系统衰老的延迟。

2. α -淀粉酶是禾本科植物中研究最广泛的一种酶系,其同工酶形式常表现明显的发育变化,并受多种内源激素及环境因子调节,而被用作植物发育过程的指标。在本试验中同一竹鞭系统内 α -淀粉酶同工酶表现出伴随竹株生长年龄变化。而在成年竹鞭系内,幼龄竹株同工酶表现逆向变化,以至与幼年期实生苗类型接近。曾有人^[1]报道桂竹竹林开花后,靠残存幼竹秆基上侧芽仍可再生新竹和新鞭,向营养生长逆转。上述 α -淀粉酶同工酶的电泳特征表明,该酶系有希望为竹林开花后天然复壮及各种人工促进生长或推迟开花的措施,提供有用的生理指标。

参 考 文 献

- 1 卢炯林. 林业科学, 1981; 17(2): 173—177
- 2 张家贤. 竹类研究汇刊, 1985; 4(1): 86—88
- 3 肖翊华, 罗定泽. 中国植物学会50周年年会学术报告及论文摘要汇编, 1983: 728—729
- 4 秦自生. 竹类研究汇刊, 1985; 4(1): 1—10
- 5 廖光庐. 竹类研究, 1983; 2(2): 82—85
- 6 Adamson W C. *Economic Botany*, 1978; 32(4): 360—362
- 7 Janzen D H. *Ann Rev Ecol Syst*, 1976; 7: 347—391
- 8 Lowry O H et al. *J Biol Chem*, 1951; 193a: 265—275
- 9 Murfet I C. *Ann Rev Plant physiol*, 1977; 28: 253—278
- 10 Nishikawa K et al. *Japan J Genet*, 1971; 46: 345—353
- 11 Watanabe M et al. *J Jap For Soc*, 1982; 64: 107—111

STUDIES ON ESTERASE AND α -AMYLASE ISOZYMES AT DIFFERENT DEVELOPMENT STAGE OF FARGESIA DENUDAT—A MAIN EDIBLE BAMBOO FOR GIANT PANDAS IN THE NATURAL PROTECTED AREA WANGLANG, SICHUAN PROVINCE

Luo Dingze

(Biology Department, Sichuan Normal University, Chengdu)

Zhao Zuocheng

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica)

Wang Jixun

(Sichuan Institute of Forest Science, Chengdu)

Abstract The comparative studies of esterase and α -amylase isozymes on the bamboo rhizome systems with different developmental ages, and standing culms in same rhizome with a series of growthages were made by means of polyacrylamide gel electrophoresis. The samples were from edible bamboo species for giant pandas in sub-mountain areas, including seedlings, full-grown and flowering bamboo plants. The results showed that the leaf EST can present various electrophoretic patterns for different rhizome systems of the same species. But the Shifts in AMY isozymes appear related to age level of bamboo culms. As a consequence it is suggested that two of above mentioned isozyme systems may be used as a physiological index for development analysis of bamboo clone.

Key words Bamboo; Plant Developmental Age; Isozymes