

雌雄栝楼植株内含物比较研究¹

李 珊, 程 舟*, 李 彦, 刘 晶, 杨晓伶, 朱云国

(同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

摘 要: 目的 分析雌雄栝楼植株内含物组成及量的差异, 为早期性别鉴定提供依据。方法 测定雌雄植株叶片生理生化指标并进行差异显著性分析, 采用 HPLC 法分析雌雄植株叶片化学成分差异。结果 雄株的光合色素、可溶性蛋白质的量、SOD、POD 活性、DNA 浓度高于雌株, 其中光合色素的量、POD 活性差异达显著性水平。雌株的 MDA、可溶性糖、紫外吸收物的量高于雄株, 其中紫外吸收物的量差异达显著性水平。HPLC 分析结果显示雌雄植株叶片的出峰数目、时间、峰高等参数明显不同。结论 栝楼雌雄植株中内含物的组成及量存在一定差异, 紫外吸收物及 HPLC 特征峰可望作为性别鉴定的指标。

关键词: 栝楼; 雌雄; 内含物

中图分类号: R 282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)02-0260-04

Comparison of inclusions in female and male *Trichosanthes kirilowii* individuals

LI Shan, CHENG Zhou, LI Yan, LIU Jing, YANG Xiao-ling, ZHU Yun-guo

(School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Objective To analyze the different composition and contents of inclusion in female and male *Trichosanthes kirilowii* individuals and to provide some references for the early sex identification.

Methods Physiological and biochemical indices in *T. kirilowii* leaves were determined and significant analysis of the difference was performed. The difference of chemical composition was analyzed using HPLC.

Results The contents of photosynthetic pigments and soluble proteins, the activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD), and the DNA concentration were higher in male individuals than those in female ones. The difference in photosynthetic pigments content and POD activity reached a significant level. The female individuals possessed higher contents of malondialdehyde (MDA), soluble saccharide, and UV-absorbing compounds than those in male ones, and the difference in UV-absorbing compounds reached a significant level. HPLC Assay revealed obvious differences in the peaking frequency, time, and the peak height. **Conclusion** There are differences in the composition and contents of inclusions in male and female *T. kirilowii* individuals, and the UV-absorbing compounds and the characteristic HPLC peak could potentially be as indices of sex identification.

Key words: *Trichosanthes kirilowii* Maxim.; sex identification; inclusions

栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 是葫芦科栝楼属多年生草质藤本植物, 其根、果实、果皮、种子均可入药, 是我国重要的传统药用植物资源^[1]。栝楼籽富含大量人体所需氨基酸、脂肪酸及多种微量元素, 可食率达 60%, 具有较高的食用价值。目前在长三角地区尤其是江浙等地已广泛种植。栝楼是雌雄异株植物, 开花前雌、雄株间无明显的形态差异, 在

生产中雌、雄株的合理搭配为 10 : 1 左右, 尽早分辨出雌雄植株是栝楼种植过程中急需解决的问题。但是以往对栝楼的研究主要集中在高产栽培技术、组织培养与快速繁殖、种质资源鉴定、化学成分分析、天花粉蛋白及其生物合成等方面, 有关性别鉴定的报道较少, 全面比较栝楼雌雄植株内含物差异并从该角度探讨雌雄鉴定的研究尚未见报道。本实验拟

¹ 收稿日期: 2007-05-15

基金项目: 同济大学科技发展基金资助项目(2000219008)

作者简介: 李 珊(1976-), 女, 陕西西安人, 博士, 研究方向为资源植物学。

Tel/Fax: (021) 65985185 E-mail: lishanbio@yahoo.com.cn

* 通讯作者 程 舟 Tel: (021) 65985185 E-mail: chengzhou@mail.tongji.edu.cn

采用生理生化指标测定及 HPLC 分析等方法, 揭示雌雄栝楼植株间内含物差异, 为探讨药用栝楼雌雄植株早期鉴定提供基础资料, 为合理开发和保护栝楼种质资源提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料: 以幼嫩栝楼叶片为实验材料。在浙江省农业科学院萧山棉麻研究所栝楼实验田中随机选取 14 株已明确性别的栝楼植株, 摘取植株中部健康无病斑叶片带回实验室用于各项指标的测定。

1.2 生理指标测定: 光合色素测定采用丙酮浸提法^[2]; 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑法; 过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法; 丙二醛(MDA)测定采用硫代巴比妥酸法; 可溶性蛋白质测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法; 可溶性糖测定采用蒽酮比色法^[3]; 紫外吸收物测定采用 Mirechi 和 Teramura 的方法^[4]。

1.3 基因组 DNA 提取及浓度测定: 基因组 DNA 提取参考李珊等^[5]的方法并加以改进, DNA 质量浓度测定采用紫外分光光度法。按总核酸浓度= $(0.062\ 9\ A_{260} - 0.036\ A_{280}) \times 1\ 000$ 计算。

1.4 高效液相色谱分析(HPLC)

1.4.1 样品液制备: 取叶片 0.3 g, 剪碎, 80 ℃ 烘干至恒重, 置于广口瓶内, 加 80% 甲醇 40 mL 超声处理 2 h, 滤过得上清液, 经 0.45 μm 针式滤器滤过得到 HPLC 供试样品液。

1.4.2 HPLC 分析: 采用 Agilent 1100 HPLC 色谱仪进行分析, 色谱柱为 Zordox SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm); 柱温: 37 ℃; 流动相: 甲醇水溶液, 梯度洗脱, 甲醇的体积分数由 5% 增加到 100%; 体积流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 273 nm; 进样量: 20 μL。

1.5 数据处理: 实验数据用 SPSS 11.0 和 Excel 软

件进行统计分析, 并用 Excel 软件制图。

2 结果与分析

2.1 雌雄植株叶片光合色素定量比较: 图 1 结果显示, 在整体水平上, 栝楼雄株的叶绿素 a(Ca)、叶绿素 b(Cb)、类胡萝卜素(Ct)、总叶绿素(Cc)等光合色素的量高于雌株, 经独立样本 *T* 检验得知雌雄植株间 Ca、Cb、Ct 和 Cc 的显著性概率分别为 0.005、0.049、0.003、0.008 ($P < 0.05$), 说明雌雄植株间光合色素的量差异达显著性水平。

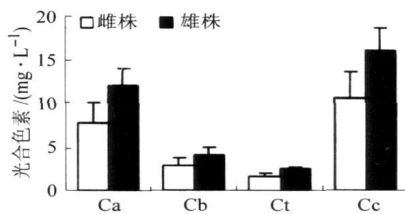


图 1 栝楼雌雄植株光合色素量比较

Fig. 1 Comparison of chlorophyll contents between female and male plants of *T. kirilowii*

2.2 雌雄植株叶片抗氧化酶活性及 MDA 定量比较

2.2.1 SOD 活性及比活力大小: 从表 1 数据可知, 雄株的 SOD 活性高于雌株, 雌株的比活力大于雄株, 独立样本 *T* 检验的结果显示, 雌雄植株间 SOD 活性、比活力大小的显著性概率分别为 0.091、0.579 ($P < 0.05$), 说明雌雄植株间 SOD 活性和比活力大小差异未达显著性水平。

2.2.2 POD 活性: 栝楼雌雄植株的 POD 活性分别为 2 858.333、4 558.333 U/(g · min) (表 1), 雄株的 POD 活性比雌株高 1 700 U/(g · min), 独立样本 *T* 检验结果显示, 显著性概率为 0.021 ($P < 0.05$), 雌雄植株间 POD 活性差异达显著性水平。

表 1 栝楼雌雄植株抗氧化酶活性及 MDA 的量比较

Table 1 Comparison of anti-oxidative enzyme activities and MDA content between female and male plants of *T. kirilowii*

植株	SOD 总活性/(U · g ⁻¹)	SOD 比活力/(U · mg ⁻¹)	POD 活性/(U · g ⁻¹ · min ⁻¹)	MDA/(μmol · g ⁻¹)
雌株	9.747 ± 0.790	2.257 ± 1.706	2 858.333 ± 1 158.195	0.488 ± 0.265
雄株	10.831 ± 1.178	1.706 ± 1.320	4 558.333 ± 989.650	0.458 ± 0.159

2.2.3 MDA 的量: 栝楼雌雄植株的 MDA 的量分别为 0.488、0.458 μmol/g (表 1), 雌株高于雄株, 两者间显著性概率为 0.814 ($P > 0.05$), 说明其间 MDA 的量差异未达到显著性水平。

2.3 雌雄植株叶片可溶性糖、可溶性蛋白质及紫外吸收物定量比较

2.3.1 可溶性糖量: 如表 2 所示, 栝楼雌雄植株叶片中可溶性糖的量分别为 10.06%、8.985%, 雌株

高于雄株, 但其间差异未达显著性水平, 显著性概率为 0.634 ($P > 0.05$)。

2.3.2 可溶性蛋白质: 栝楼雌雄植株叶片可溶性蛋白质的量分别为 6.965、9.927 mg/g (表 2)。差异显著性概率为 0.204 ($P > 0.05$), 说明雌雄植株间可溶性蛋白质的量差异未达显著性水平。

2.3.3 紫外吸收物: 表 2 数据显示, 雌雄植株紫外吸收物的量分别为 0.133、0.126, 雌株的紫外吸收

物的量高于雄株,经独立样本 T 检验得知显著性概率为 0.008($P < 0.05$),说明雌雄植株间紫外吸收物的量差异达显著性水平。

2.4 雌雄植株叶片 DNA 浓度比较: 从栝楼雌雄植株叶片中提取的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳均可检测

表 2 雌雄植株叶片可溶性蛋白、可溶性糖、紫外吸收物的量及 DNA 浓度比较

Table 2 Comparison of soluble protein, saccharide, and UV absorbing compound contents between female and male plants of *T. kirilowii*

植株	可溶性糖/ %	可溶性蛋白质/(mg · g ⁻¹)	紫外吸收物 A	DNA 质量浓度/(μg · mL ⁻¹)
雌株	10.060±0.844	6.965±4.601	0.133±0.003	0.727±0.041
雄株	8.985±5.295	9.927±2.694	0.126±0.001	0.775±0.083

2.5 雌雄植株叶片提取物 HPLC 分析: 图 2-A、B 为栝楼雌雄植株的色谱图。可以看出,雌雄栝楼植株叶片提取物的出峰数目、出峰时间、峰高均存在较大差异。其中出峰时间的差异最为显著,雌株样品在 27~37 min 出现了一些峰高明显高于雄株的峰。雄株样品在 10~22 min 出现了大量峰高明显高于雌株的峰。

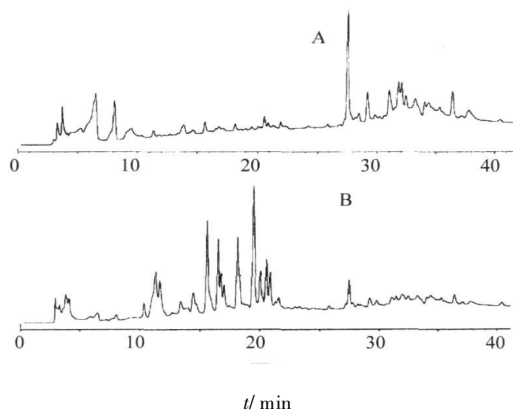


图 2 雌(A)、雄(B)植株色谱分析图

Fig. 2 HPLC Analysis of female (A) and male (B) plants of *T. kirilowii*

3 讨论

3.1 雌雄栝楼植株内含物差异: 性别是植物最为重要的生物性状之一。不同性别的植物在形态、生理特性、化学成分及经济价值等方面存在一定差异,在种植业、园林绿化以及农林业生产中常需要根据经营目的与利用方向选择栽培不同性别的植物以满足需要。如以果实、种子入药的罗汉果、吴茱萸等需要栽种大量的雌株;以纤维为收获物的大麻其雄株纤维的拉力优于雌株,以栽种雄株较好。因此对植物的性别鉴定尤其是早期鉴定显得尤为重要,具有重要的理论和实践意义。由于多数雌雄异株植物在幼苗期未表现出外部形态差异,而雌雄植株之间存在许多生理及代谢差异,对其进行研究有助于性别的早期鉴定。

到带型清晰的明亮条带,测定 260、280 nm 处的吸光度值并计算 DNA 的质量浓度,结果显示雌雄植株的 DNA 量分别为 0.727、0.775 μg/mL,显著性概率为 0.423($P > 0.05$),说明雌雄植株的 DNA 质量浓度差异未达到显著性水平。

光合色素的量是反映植物光合能力的一项重要指标,一般情况下植株光合色素的量高则光合能力强,植株生长旺盛,生物量高。王双明等^[6]对银杏雌雄植株代谢差异的研究发现雄株的光合速率普遍高于雌株。赵林森等^[7]对复叶槭叶片中叶绿素定量测定的结果显示雄株中叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素的量均高于雌株。在本研究中,雄株中的光合色素的量平均值高于雌株,且其间的量差异均达显著性水平。田间观察发现,栝楼雄株一般较雌株强壮,该现象可能与雄株光合色素的量高于雌株有关。

氧化还原能力不同是雌雄植株代谢差异的表现形式之一。一般来说,雌性个体处于较还原状态,雄性个体处于相对氧化状态。温伟庆等^[8]的研究结果表明,银杏雄株的过氧化物酶活性大于雌株,即雌株过氧化物酶活性处于较还原的状态,雄株过氧化物酶活性处于相对氧化的状态。本研究得到了与之相似的结果,雄株的 POD 活性比雌株高,且其间的活性差异达显著性水平。吴少华等^[9]对猕猴桃的研究发现,雌株的 SOD 总活力大于雄株。何长征等^[10]对不同性型黄瓜植株保护酶类活性差异的研究显示,雌雄同株系黄瓜中 SOD 活性较雌性系中高。在本研究中雄株的 SOD 活性高于雌株。SOD、POD 均具有在一定程度上忍耐、减缓或抗御逆境胁迫,延缓植物器官衰老,增强其生存适应的能力,栝楼雄株中 SOD、POD 活性高于雌株表明雄株具有较强的抗逆性及适应能力,这也是造成栝楼雄株较雌株强壮的可能原因之一。

可溶性糖是反映植株碳素营养状况的重要指标,其量的变化影响着植株的碳素代谢状况。蛋白质是生命中最重要物质基础,其量的变化可在一定程度上反映植株氮素同化的水平。本研究结果显示栝楼雌株叶片中可溶性糖的量高于雄株,蛋白质的量低于雄性植株,说明雌、雄栝楼植株在碳素代谢、

氮素同化上存在着一定差异。紫外吸收物主要是酚类化合物如类黄酮、黄酮醇、花色素苷以及烯萜类化合物等,其中类黄酮是最主要的组分。本研究结果显示所有雌性栝楼植株的紫外吸收物的量均高于雄性植株,且其间差异达显著性水平。与李国梁等^[11]对杨梅、猕猴桃等树种中水溶性酚类物质的结果一致。推测此现象的形成原因是与类黄酮合成有关的基因在雌性栝楼植株内的表达水平高于雄性,从而使合成紫外吸收物酶的活性增高。

3.2 雌雄栝楼性别鉴定:对大多数雌雄异体的植物而言,性别分化和性别表现较迟给植株性别的早期鉴定带来很大困难,如何通过鉴定幼苗的雌雄性别而决定取舍,有助于提高经济效益。国内外学者从不同方面进行了探索,主要包括外部形态、生理生化差异、同工酶图谱、特异蛋白、染色体组型、核酸的量等方面^[12]。在本研究中,光合色素、紫外吸收物的量及 POD 活性在雌雄植株间均呈显著性水平差异,但仅紫外吸收物的量在所有栝楼雌株中均高于雄株,如采用更多已知性别的植株作进一步验证,紫外吸收物可作为鉴定栝楼植株性别的有效指标。HPLC 分析结果显示在相同色谱条件下,雌雄植株样品的出峰时间、出峰数目、峰高等均存在差异,说明雌雄植株所含的化学物质组分及量存在较大差别。进一步检测更多的样品,确定图谱差异与性别的相关性并

寻找最具代表性的性别相关峰,该方法亦有望成为鉴定栝楼性别的有效途径。

致谢:本实验材料的收集工作得到浙江省农业科学院萧山棉麻研究所金关荣高级实验师的大力支持。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1986.
- [2] 王英典, 刘宁. 植物生物学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [3] 李合生. 植物生理生化实验原理 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [4] 韩榕, 岳明, 王勋陵. He-Ne 激光对小麦幼苗增强 UV-B 辐射损伤的修复效应 [J]. 西北植物学报, 2002, 22(2): 263-269.
- [5] 李珊, 钱增强, 蔡宇良, 等. 金钱槭和云南金钱槭遗传多样性比较研究 [J]. 植物生态学报, 2005, 29(5): 785-792.
- [6] 王双明, 李琼芳, 李庆. 雌雄银杏植株叶片生理生化特性的比较研究 [J]. 农业现代化研究, 2003, 24(6): 470-472.
- [7] 赵林森, 程向阳, 徐锡增, 等. 复叶槭雌雄株叶片中水溶性酚类物质的比较分析 [J]. 新疆农业大学学报, 1998, 21(3): 229-232.
- [8] 温伟庆, 陈友吾. 银杏雌雄株过氧化物酶和过氧化氢酶活性差异研究 [J]. 福建林业科技, 2002, 29(2): 34-39.
- [9] 吴少华, 史锋, 沈德绪. 超氧化物歧化酶在猕猴桃植物中的分布 [J]. 果树科学, 1996, 13(3): 181-182.
- [10] 何长征, 艾辛, 匡逢春. 不同性型黄瓜植株保护酶类活性的差异 [J]. 湖南农业大学学报, 2001, 27(4): 289-291.
- [11] 李国梁, 林伯年, 沈德绪. 酚类物质在鉴别园艺雌雄植物中的应用研究 [J]. 园艺学报, 1993, 20(4): 397-398.
- [12] 李瑞丽, 卢龙斗, 高武军, 等. 雌雄异株植物性别鉴定的研究进展 [J]. 广西植物, 2006, 26(4): 387-391.

青箱 SRAP 体系的建立和优化¹

郭庆华, 郭美丽*, 薛芊, 冯娜, 张汉明

(第二军医大学药学院 生药学教研室, 上海 200433)

摘要:目的 探讨影响青箱 SRAP(sequence-related amplified polymorphism)扩增的各种因素,建立并优化青箱 SRAP 反应体系,为分子水平鉴定青箱子及其伪品,探讨青箱不同种质间的亲缘关系奠定基础。方法 用 CTAB 法提取青箱 DNA,设计 *Taq* 酶浓度(0.02、0.04、0.06 U/ μ L)、dNTP 浓度(0.10、0.20、0.30 mmol/L)、Primer 浓度(0.15、0.30、0.45 μ mol/L)3 水平 3 因素试验和 Mg^{2+} 浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mmol/L)8 水平单因素试验。在 25 μ L 体系中加入模板 DNA 20 ng,对体系进行优化,用琼脂糖进行检测。结果 建立了适合青箱的 SRAP 体系,在 25 μ L 体系中, DNA 为 20 ng, *Taq* 酶浓度为 0.04 U/ μ L, dNTP 浓度为 0.30 mmol/L, Primer 浓度为 0.30 μ mol/L, Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L, 优化后的体系目标条带增多,且比较稳定,重现性好,得到了较好的扩增效果。结论 本研究建立的反应体系适合青箱 SRAP 的研究。为从分子水平鉴定青箱子正品与伪品以及鉴定青箱不同种质资源奠定了基础。

关键词:青箱;SRAP;反应体系

中图分类号:R 282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)02-0263-04

¹ 收稿日期:2007-06-08

作者简介:郭庆华(1976-),女,山东潍坊人,药师,在读硕士研究生。E-mail: lily-gqh@126.com

* 通讯作者 郭美丽 Tel: (021) 25074576 E-mail: mlguo@smmu.edu.cn