

宁志怨,董 玲,李卫文,等. 栝楼性别的分化与鉴定研究进展[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):4-6.

栝楼性别的分化与鉴定研究进展

宁志怨,董 玲,李卫文,廖华俊,江 芹

(安徽省农业科学院园艺研究所,安徽合肥 230036)

摘要:栝楼是常用的大宗药用植物,其性别分化一直是研究的重点。本文对栝楼雌、雄性别分化的组织形态鉴别、生理生化鉴别、性别相关基因的分子标记鉴别等进行综述,并对今后栝楼性别研究的发展趋势进行了展望,最后提出了相关建议。

关键词:栝楼;雌雄异株;性别分化;性别鉴定

中图分类号: S567.23⁺9.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0004-03

栝楼(*Trichosanthes kirilowii* L.),又称瓜蒌、吊瓜、野葫芦等,属葫芦科栝楼属多年生草本植物,是我国常用的中药材,主要分布在东亚以及澳大利亚的北部地区,国内种植地区主要包括河北、山东、长江流域以及华南和西南等地区。栝楼的果实、果皮、仁、根皆可入药,有解热止渴、利尿、镇咳祛痰等作用,栝楼制剂对冠心病心绞痛有一定疗效。栝楼的根又名天花粉,含有淀粉、皂苷、天花粉蛋白、多种氨基酸以及多糖类物质。近些年研究发现天花粉蛋白具有抗肿瘤及抗艾滋病的活性,天花粉多糖具有明显的免疫调节作用,能增强免疫活性,具有显著的抗肿瘤和细胞毒活性。栝楼的种子营养丰富,富含不饱和脂肪酸、氨基酸以及多糖类物质。近年来栝楼种植面积迅速扩大,产业前景潜力巨大。

栝楼是雌雄异株,随着栝楼种子被开发为休闲保健食用栝楼籽、栝楼油等,生产上栝楼种植主要以雌株为主,雄株主要作为授粉植株;而另一方面以收获地下块根(天花粉)为目标的主要以种植雄株为主。用栝楼种子繁育的后代,雄株的比例一般均超过 90%,因此研究栝楼种子后代性别分化的机理以及性别的苗期鉴定对于栝楼的育种研究具有非常重要的作用。除此之外,植物性别一直是植物生殖生物学和植物遗传学研究所关注的核心。性别分化的模式植物黄瓜的性别分化研究目前已经取得了突破性的进展。最新的研究结果表明

乙烯代谢途径的相关基因对雌雄同株的黄瓜的性别分化起着非常重要的作用。而雌雄异株植物栝楼的性别分化的机理还未见相关报道。因此研究栝楼性别分化的机理以及性别的鉴定对于研究雌雄异株植物的性别分化的机理具有非常重要的作用。植物性别是一种自然现象,既有遗传物质基础,也容易受生长发育过程中各种环境因素的影响,存在着与动物性别不同的遗传规律和调节方式。因此,研究植物性别现象及其遗传机制对于寻求早期鉴定性别的方法以达到人为控制植物性别分化的目的,这在植物学和农业生产上具有非常重要的应用价值。

1 栝楼的性别表现类型与特点

栝楼属植物一般认为是严格的雌雄异株植物,但是我们在研究过程中观察到偶有少数植株是雌雄同株,存在着性别的多样性。栝楼雌株的雌花与雄株的雄花都属于生理上的单性花。研究表明在雌雄异株植物中,单性别主要由遗传决定,但是单性性别的表达可能受到激素和环境因子等影响^[1-2]。

2 栝楼性别分化与鉴定

2.1 组织形态学

在雌、雄栝楼染色体的研究方面:Karmakar 等在对栝楼二倍体雌、雄株染色体进行观察时发现,二倍体雌、雄株染色体之间不存在 XY 型染色体的分化,认为栝楼的性别表达可能主要是由遗传控制的^[3]。

在雌、雄栝楼花器官的形态学研究方面:花期雄花单生、总状花序或两者并生,雌花则为单生,据此可较为明确地区分栝楼的雌、雄株。雄株出现花蕾的同时花梗伸长,继而开花;

收稿日期:2013-10-29

基金项目:安徽省农业科学院院长青年基金(编号:13B0324)。

作者简介:宁志怨(1978—),男,安徽滁州人,博士,助理研究员,从事道地中药材遗传育种研究。E-mail:ningzhiyuan2000@163.com。

通信作者:董 玲,硕士,研究员。Tel:(0551)65160968;E-mail:674549072@qq.com。

[35]田天丽,沈 竞,徐萌萌,等. 虎杖中虎杖苷的微生物发酵转化研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,2008,45(2):437-440.

[36]王 辉. 微生物转化虎杖中白藜芦醇苷及其产物的分离纯化[D]. 大连:大连理工大学,2009.

[37]徐瑞超. 虎杖内生真菌与有效成分的相关性研究[D]. 成都:成都中医药大学,2012.

[38]游 松,尤 凯,王 旭,等. 白藜芦醇苷的提取纯化及其生物转化[J]. 沈阳药科大学学报,2009,26(4):312-315.

[39]刘华金,易有金,杨建奎,等. 转化白藜芦醇苷虎杖内生真菌的

分离和鉴定[J]. 食品科学,2012,33(11):172-176.

[40]肖苏尧,彭 维,李 赟,等. 虎杖中白藜芦醇生物转化菌的筛选及鉴定[J]. 现代食品科技,2012,28(7):749-752.

[41]张晶晶,兰阿峰,邓百万,等. 红豆杉愈培养内生细菌多样性的初步研究[J]. 微生物学通报,2013,40(5):766-774.

[42]Strobel G A. Endophytes as sources of bioactive products[J]. Microbes and Infection,2003,5(6):535-544.

[43]范 黎. 植物内生真菌:获取抗癌药物白藜芦醇的新途径[J]. 微生物学通报,2013,40(5):916.

而雌株最先是花梗伸长,子房开始膨大,然后出现花蕾继而开花,即雌株果实从分化初始就出现子房膨大。因此雌、雄花蕾未出现前即可通过花梗伸长后是否出现子房膨大判定雌、雄株。根据这种方法并结合花期和果期来判定性别进行验证,准确率达 100%。除此之外,花蕾开放以后,雄花的五朵花瓣完全展开,雌花花瓣仍皱缩在一起;雄花中可见明显的黄色花药,不见柱头,雌花中可见明显的三裂柱头。通过以上几种特征,均可以可靠区分雄株和雌株。曲超等在对栝楼种子的质量与栝楼性别的研究过程中发现,随着种子质量的增加,由该种子长出的植株的雄株比例逐渐减少,雌株比例逐渐增加,雌株比例与种子大小存在显著正相关,相关系数为 0.948 8,同时也发现 18% 的雌花中出现花药的情况,但电镜扫描的结果却表明花药中并不存在花粉^[4]。另一方面我们在研究中发现少量雄株中存在雌蕊发育的情况。

2.2 生理、生化

植物激素、多胺、可溶性糖的含量以及一些酶的活性等都与性别分化关系密切。因此可以通过对不同性别栝楼叶片内的激素、多胺、可溶性糖含量以及一些酶的活性等生理、生化方面的差异来对栝楼的性别进行鉴别。

孙永刚利用 BTB、甲基红和溴酚蓝对栝楼的雌、雄株幼苗叶片的提取液进行研究,结果表明雄株的反应明显比雌株深,分光光度计的研究结果同时显示雌、雄株的染色液在特定波长的吸光值差异显著^[5]。李珊等测定雌、雄植株叶片生理生化指标以及采用 HPLC 法对雌雄植株叶片化学成分进行研究,结果表明雄株的光合色素含量、可溶性蛋白质含量、SOD 活性、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水平^[6]。郭晓亮用比色法研究了雌、雄栝楼幼苗叶片中水溶性酚类物质、可溶性糖、还原性糖、抗坏血酸及光合色素等内含物含量的差异,结果表明,雄性栝楼幼苗叶片中水溶性酚类物质、叶绿素 B 及光合色素含量极显著高于雌性栝楼;可溶性糖、抗坏血酸、叶绿素 A、类胡萝卜素等含量,雄性显著高于雌性,而还原性糖含量雌性极显著高于雄性^[7]。

曲超等利用酒石酸铁和萘酚比色法来对不同性别的栝楼生理、生化指标进行测定,结果显示,在花期雌、雄株叶片在水溶性酚和可溶性糖含量上存在显著差异,同时研究结果也显示雌株叶片的还原性高于雄株叶片^[4]。刘芸等在栝楼生长发育各阶段,采用高效液相色谱技术分别对雌、雄植株叶片内源激素及多胺含量进行分析,结果表明,在所测定的生长发育期,吲哚乙酸、亚精胺含量,雌株始终高于雄株;而脱落酸、精胺含量雌株始终低于雄株;玉米素核苷、赤霉素和腐胺含量在营养生长期雄株高于雌株,雄株进入生殖生长阶段后迅速下降^[8]。刘芸等对栝楼雌、雄植株生长发育关键时期的光合作用和蒸腾作用进行研究,结果表明,在营养生长阶段,栝楼雄株的光合速率、蒸腾速率、气孔导度和水分利用效率均大于雌株;雄株比雌株提前 22 d 进入生殖生长阶段。当雄株进入生殖生长阶段后,其光合速率、蒸腾速率和气孔导度大于雌株,但水分利用效率略小于雌株^[9]。张伟等以 4 个地区的 8 个栝楼品系为材料,采用萘酚比色法测定了不同栝楼品种开花期间叶片的可溶性糖含量,结果表明,不同产区的栝楼雌、雄株

叶片中的可溶性糖在开花期不尽相同,认为单纯的从开花期叶片可溶性糖含量表现出差异的角度试图揭示栝楼雌、雄差异的现象,进而寻求对其进行早期鉴别的技术可能比较困难^[10]。刘伟等采用阳离子交换树脂分离 Ca、Mg、Fe、Mn、Cu、Zn 6 种元素的游离态和非游离态,结果显示雌、雄栝楼花粉中的 6 种元素存在形态不一致,游离态和无机态为主要存在形式,雌、雄栝楼在元素形态上的差异仅存在于无机态的 Ca 和 Mg^[11]。

2.3 分子标记

于凤池等对栝楼雌、雄株不同器官进行过氧化物酶同工酶活性和电泳分析。结果表明,雌株的过氧化物酶同工酶活性高于雄株,且雌株叶片中有一条特异性的过氧化物酶同工酶谱带;雄株花芽中存在一种 23 400 的特异蛋白质,雄花中一种 32 300 的蛋白质在受精后消失^[12]。李彦农通过叶片总 DNA 抽提、RAPD 标记分析及反复的试验筛选。在 80 个 RAPD 引物中,用引物 AN18 扩增得到一条约 0.6 kb 与雄性栝楼相连锁的多态性片段 (TKM647),对该片段进行了克隆与序列分析,但是转化 SCAR 标记却没有成功^[13]。孙永刚在栝楼的雌、雄株之间进行同工酶电泳,结果表明雌、雄株在过氧化物酶同工酶图谱分析中共得到 4 条和性别相关的谱带;多酚氧化酶同工酶则有 3 条与雌株有关的标记。另一方面建立了可用于栝楼雌、雄鉴别的 AFLP 反应体系,雌、雄集群间检测到 71 个 AFLP 多态性标记,其中 40 条来自雌株,31 条来自雄株,分离比大约为 1.3 : 1^[5]。Kumar 等利用 41 对随机引物分别对雌性、雄性和单性结实系的基因池进行研究,结果显示 2 个标记 *OPC05-1000* 和 *OPC14-400* 能够在雌、雄栝楼中稳定扩增出差异常带,可以用于栝楼性别的鉴别^[14]。Seneviratne 等利用几百条 RAPD 引物对雌、雄栝楼的基因组进行扩增反应,结果显示引物 OPC-7 扩增产生的 1 条 564 bp 的条带能够准确地区分雌、雄株,并认为雌、雄株之间差异性的条带的发现将有助于在分子水平上了解双子叶植物的性别决定^[15]。Roy 等在栝楼性别发育时期采用 cDNA-AFLP 的方法对雌、雄栝楼的表达水平进行研究,在雌雄株之间共有 31 个上调或下调的基因片段被选择用于测序,其中 23 个来源于雄性,8 个来源于雌性。生物信息学分析结果表明其中一个来源于雄性的克隆,具有多聚半乳糖醛酸酶基因的功能,该基因参与花粉的发育、萌发以及在花粉管的伸长过程中起解聚角质的作用^[16]。郭晓亮对不同时期栝楼幼苗叶片中的酯酶、过氧化物酶、细胞色素氧化酶等同工酶进行了电泳分析,结果表明,同一时期,不同性别的栝楼,同工酶在谱带、酶含量上存在一定的差异;其中,酯酶同工酶中的特异性谱带 Rf 0.439 在雄性栝楼苗期较长时期内表现比较明显,可望作为栝楼苗期性别鉴别的特异性指标^[7]。曲益涛利用 92 个随机引物并选用优化过的 RAPD 反应体系对同一来源的栝楼组培后代雌、雄株 DNA 分别进行 PCR 扩增,发现 1 条 600 bp 特异性条带与雄性连锁,将这一特异条带最终成功实现 RAPD 转化为 SCAR 标记。但是笔者所在研究室进一步的研究结果显示,当采用不同来源的栝楼雌、雄株时,SCAR 标记却未能有效地鉴别栝楼的雌、雄株^[17]。Kumar 等利用 RAPD 引物对 42 个栝楼组培后代的雌、雄株以及单性结实系进行分子鉴别研究,结果表明标记 *OPC05-1000* 的条带只存在于雄性栝楼

的基因池中,标记 *OPC14-400* 只存在雌性栝楼的基因池中,上述 2 个标记能够稳定在开花前用于栝楼雌、雄株的鉴别^[18]。Nanda 等利用 40 个 ISSR 引物对雌、雄性基因池进行筛选,结果筛选到 1 个和雄性连锁的 720 bp 标记 *TdMSM*, Southern 杂交结果表明该标记仅存在于雄性栝楼中,除此之外该标记可以有效地区分未知性别的 15 个不同性别的栝楼^[19],但是在笔者的研究中该标记未能有效地鉴别栝楼雌、雄株。Karmakar 等对二倍体栝楼雌、雄株块根的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示:在还原性的 SDS-PAGE 电泳时,雌、雄株之间没有发现明显条带差异,只是存在条带浓度的差异;然而当使用 15 μg 的蛋白进行非还原性电泳时,栝楼雌雄株之间出现条带的有无以及强度差异^[3]。

3 展望

栝楼的性别表达由基因决定,因此利用分子生物学技术在基因表达水平上研究雌、雄株之间的差异性,从中找到性别差异的片段并进行分析,从而建立栝楼性别分化的遗传规律。但是栝楼的性别分化的差异归根结底是表现在花器官上,花器官形成机理的研究将有助于了解其性别分化的形态发生过程和控制机理,在此基础上进一步了解其性别分化各时期中各种生理生化指标的变化规律,将为栝楼的性别遗传规律的研究提供切实的依据。目前一般认为栝楼的性别分化主要受遗传控制并且是严格的雌、雄异株植物,但是我们在最新的研究中则发现一些植物激素能够使离体的栝楼组织性别发生变异^[17,20]。与此同时,最新的研究结果表明番木瓜原始 Y 染色体的雄性特异区中 DNA 甲基化和异染色质化参与番木瓜的性别发育过程,从而达到开启或关闭一些和性别相关基因的表达最终来控制番木瓜的性别的分化^[21]。栝楼和番木瓜一样同属于雌雄异株植物,可能通过染色体区段的异染色质化来调控栝楼的性别分化。也可能在外界激素的作用或组织培养条件下,可能通过开启或关闭一些和花器官发育相关的基因表达来调控栝楼的性别分化。

综上所述,一般认为栝楼的性别的表达主要由遗传决定,但是最近的研究结果表明,栝楼性别的表达除了受到遗传控制之外,还受到一些激素等因素的影响,从而在受到外源激素的作用或在组织培养过程中出现花器官畸变和性别变异的现象。因此在未来的栝楼性别的研究过程中,除了主要从遗传上来进行研究外,还要充分考虑植物激素对栝楼花器官性别分化的影响。尤其是在组织培养过程中,栝楼茎尖分生组织有可能会由于激素的作用而不能保持外植体原有的性别的可能性。今后栝楼性别的研究方向为:(1)构建栝楼性别分化的无性系,研究植物激素对栝楼性别的影响。分别对栝楼雌株和雄株进行离体组织培养,研究不同的植物激素对不同性别的无性系后代群体性别的影响,筛选合适的植物激素,从而避免栝楼在组织培养过程中性别容易发生变异的情况。(2)提高栝楼种子的发芽率,以便于深入研究栝楼杂交后代群体的性别表达的遗传规律,为探讨栝楼的性别分化的遗传规律奠定基础。(3)通过在基因水平上对不同性别的栝楼进行研究,同时借鉴同属于葫芦科的模式植物黄瓜的性别分化的机理研究成果,来探索激素调控栝楼性别分化的可能机理。

参考文献:

- [1] Durand B, Durand R. Sex determination and reproductive organ differentiation in *Mercurialis* [J]. Plant Science, 1991, 80(1): 49-65.
- [2] Chailakhyan M K, Khrianin V N. Sexuality in plants and its hormonal regulation [M]. Heidelberg: Springer-Verlag, 1987.
- [3] Karmakar K, Sinha R K, Sinha S. Karyological and electrophoretic distinction between sexes of *Trichosanthes bracteata* [J]. American Journal of Plant Sciences, 2013(4): 494-497.
- [4] 曲超, 胡兰英, 字肖萌, 等. 栝楼雌雄株形态、生理生化指标差异的研究 [J]. 种子, 2010, 29(10): 4-7.
- [5] 孙永刚. 栝楼苗期雌雄株鉴别的研究 [D]. 合肥: 安徽大学, 2007.
- [6] 李珊, 程舟, 李彦, 等. 雌雄栝楼植株内含物比较研究 [J]. 中草药, 2008, 39(2): 260-263.
- [7] 郭晓亮. 栝楼苗期性别差异及组织培养研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [8] 刘芸, 钟章成, 王小雪, 等. 栝楼雌雄植株激素和多胺含量的比较 [J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1645-1650.
- [9] 刘芸, 钟章成, 王小雪, 等. 栝楼雌雄植株的光合作用和蒸腾作用特性 [J]. 应用生态学报, 2011, 22(3): 644-650.
- [10] 张伟. 栝楼叶片可溶性糖含量的分析比较 [J]. 商丘师范学院学报, 2012, 28(6): 78-81.
- [11] 刘伟, 方磊, 王晓, 等. 雌雄栝楼花粉中 6 种元素次级形态分析研究 [J]. 中药材, 2012, 35(3): 421-423.
- [12] 于凤池, 孙耘子, 袁高峰, 等. 栝楼性别分化特异大分子标记物研究 [J]. 浙江农业学报, 2003, 15(6): 332-335.
- [13] 李彦农. 栝楼性别的分子标记研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [14] Kumar S, Singh B D, Sinha D P, et al. Sex expression-associated RAPD markers in pointed gourd (*Trichosanthes dioica*) [C]// Cucurbitaceae. Proceedings of the IXth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae. Avignon, France, 2008: 543-550.
- [15] Seneviratne G. Female sex-associated RAPD marker in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.) [J]. Current Science, 2002, 82(2): 131.
- [16] Roy S K, Gangopadhyay G, Ghose K, et al. A cDNA-AFLP approach to look for differentially expressed gene fragments in dioecious pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.) for understanding sex expression [J]. Current Science, 2008, 94(3): 381-385.
- [17] 曲益涛. 栝楼性别转化的 RAPD-SCAR 标记研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [18] Kumar S, Singh B D, Sinha D P. RAPD markers for identification of sex in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.) [J]. Indian Journal of Biotechnology, 2012, 11(3): 251-256.
- [19] Nanda S, Kar B, Nayak S, et al. Development of an ISSR based STS marker for sex identification in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.) [J]. Scientia Horticulturae, 2013, 150: 11-15.
- [20] 忻雅, 张延恒, 童建新, 等. 吊瓜试管苗快繁技术研究及性别验证 [J]. 杭州农业与科技, 2009(2): 35-37.
- [21] Zhang W, Wang X, Yu Q, et al. DNA methylation and heterochromatinization in the male-specific region of the primitive Y chromosome of papaya [J]. Genome Research, 2008, 18(12): 1938-1943.