

基于形态观察法和生理生化法的软枣猕猴桃性别鉴别研究

李 旭, 曹 万 万, 姜 丹, 刘 迪, 朴 一 龙

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133000)

摘 要:以软枣猕猴桃雌雄株休眠枝和新梢为试材,采用形态观察法和生理生化法对软枣猕猴桃植株的性别进行了鉴定研究。结果表明:软枣猕猴桃雌株的叶痕间距和皮孔密度显著大于雄株;组培苗雄株显著高于雌株,根系数量显著低于雌株;BTB 染色法鉴别软枣猕猴桃性别的反应时间为 4 h 以后,但以反应 4 h 差异最明显;TTC 染色法是鉴定成龄软枣猕猴桃雌雄株的有效方法,但是否适用于童期还有待进一步探讨。

关键词:软枣猕猴桃;性别鉴定;形态观察;生理生化指标

中图分类号:S 663.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)24-0006-04

软枣猕猴桃(*Actinidia arguta* Sieb. et Zucc.)属猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属(*Actinidia*)多年生落叶藤本植物。其果实营养丰富且具有各种营养保健功能,开发利用前景非常广阔。目前,软枣猕猴桃作为第三代猕猴桃在国际上受到人们的广泛关注^[1],但是由于软枣猕猴桃是雌雄异株植物,给软枣猕猴桃的人工驯化栽培和育种带来了很多不便。因此,早期有效鉴别软枣猕猴桃的性别成为首要攻克的难题之一。

早在 20 世纪 50 年代初波兰学者 Bugala^[2]就通过叶色确定欧洲山杨的性别。研究表明,银杏雌雄株幼苗期在植株、枝、叶、根等方面存在较大的差异^[3],沙棘雌雄株在冬态、花期、生长期、植株形态、植株分布等方面存在较大差异^[4],徐东生等^[5]应用多元统计分析中的判别分

析方法判别猕猴桃(*Actinidia chinensis*)雌雄株,用能开花结果的成年树建立了判别方程。赵林森等^[6]利用酒石酸铁比色法对复叶槭雌雄株叶片中水溶性酚类物质的含量进行了测定,同时研究了叶片中叶绿素的含量与水溶性酚类物含量之间的关系。对杨梅(*Myrica rubra*)等树种叶片中水溶性酚类物质研究发现,雌株普遍高于雄株^[7],在对复叶槭和千年桐等雌雄异株植物的研究中,也取得了相同的结论^[6,8]。杨俊杰等^[9]利用溴麝香草酚蓝(BTB)法进行芦笋植株早期性别鉴定。曲超等^[10]对栎类雌雄株形态、生理生化指标差异的研究结果表明,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。但目前尚鲜见软枣猕猴桃性别鉴定研究报道。课题组于 2012—2013 年通过形态观察和生理生化指标测定,研究鉴别软枣猕猴桃雌雄株性别的有效方法,以期软枣猕猴桃两性花类型植株筛选和新品种选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试软枣猕猴桃采自延边大学农学院野生浆果资

第一作者简介:李旭(1989-),男,黑龙江兰西人,硕士研究生,研究方向为果树栽培生理。E-mail:ybu09yllixu@163.com.

责任作者:朴一龙(1962-),男,博士,副教授,研究方向为果树栽培生理和果实采后生理。E-mail:piaoly@ybu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160068)。

收稿日期:2014-09-09

Abstract: Taking the leaves of 'Blomidon', 'Northland' and 'Bluecrop' blueberry as test materials, the relationship between leaf area (leaf length \times leaf width) (y) and the growth indexes include leaf length (x_1), leaf width (x_2), leaf weight (x_3) were studied. The results showed that length, leaf width, leaf weight, leaf length \times leaf width and leaf area of 3 blueberry varieties were positively correlated. A simple regression equation, and fitting equation between leaf area (y) and leaf length (x_1), leaf area (y) and leaf width (x_2), leaf area (y) and leaf weight (x_3), leaf area (y) and leaf length \times leaf width were established. After data analysis, the correlation coefficient and multiple correlation coefficients were at very significant level, thus the leaf area regression equation could be used to estimate blueberry leaf area.

Keywords: blueberry; leaf area; regression equation

源圃。选择生长中庸的 7 年生野生软枣猕猴桃雌雄株各 3 株取样和调查。

1.2 试验方法

生长期每株剪取 10 个新梢,调查新梢的形态特征,并在超低温冰柜中冷冻贮藏叶片供生理生化指标的测定;休眠期每株剪取 10 个休眠枝调查休眠期枝条的形态特征。随机抽取同一配方和同一时间接种并生长 2 个月的组培苗调查组培苗雌雄株间生长差异。

1.3 项目测定

1.3.1 形态观察法性别鉴定 用游标卡尺测定新梢粗度、叶柄长度、叶柄粗度和叶的纵横径。观察休眠期枝条颜色、横切面解剖结构,统计皮孔密度^[11]、叶痕间距等。采用 MS+BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基培养 2 个月后,统计雌雄株植株高度、根系数量和长度。

1.3.2 溴麝香草酚蓝法(BTB 法)性别鉴定 参照龙程等^[12]的方法制备样品和测定,略做改进。分别称取软枣猕猴桃雌、雄株成熟叶片 0.2 g,加 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 6.2)4 mL,冰浴研磨呈匀浆。然后在室温下浸提 2 h,于 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液 3 mL,加 0.1%碱性 BTB 4~5 滴,混匀,置于 30℃ 恒温水浴中保温。每隔 2 h 记录雌株和雄株提取液的颜色变化,同时用 UV-2100 分光光度计测定提取液在 480~700 nm 处(每隔 20 nm 测 1 次吸收值)的吸光值,重复 3 次。

1.3.3 氯化三苯基四氮唑法(TTC 法)性别鉴定 参照张雄^[13]的方法制备样品和测定,略作改进。分别称取软枣猕猴桃雌、雄株成熟叶片 0.2 g,放入小烧杯中,加入 0.4% TTC 溶液和 0.067 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)各 5 mL,使样品完全浸入到反应液中,置于 37℃ 黑暗条件下保温 2 h,然后加入 1 mol/L H₂SO₄ 2 mL 以终止反应,取出叶样,用滤纸吸干水分后,在研钵中加入 3~4 mL 乙酸乙酯及少量石英砂,研碎提取 TTC,用乙酸乙酯洗研钵并将提取液全部转入 10 mL 试管,并定容到 10 mL,在 485 nm 波长处测吸光值。

1.3.4 总酚含量测定 参照 Seo 等^[14]的方法制备样品和测定,略作改进。以邻苯二酚作为标准物质,制作标准曲线。加入反应物质振荡 2 h 后在 725 nm 波长处测吸光值。重复 3 次。

表 3

软枣猕猴桃组培苗生长发育情况

Table 3

Growth and development of tissue culture seedling in *Actinidia arguta*

性别 Sex	植株平均高度 The average height/cm	根系平均长度 The average length of roots/cm	根系数量 Number of roots/个
雄株 Male plant	4.02 a	3.68 a	16 a
雌株 Female plant	3.12 b	4.63 a	23 b

2.2 软枣猕猴桃雌雄株间生理生化差异比较

2.2.1 软枣猕猴桃雌雄株间 BTB 法染色差异 软枣猕猴桃雌雄株 BTB 染色法比较结果如图 2 所示。在 360 nm

1.4 数据分析

试验数据采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,采用邓肯氏新复极差法作显著性差异分析,显著水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 软枣猕猴桃形态观察

2.1.1 软枣猕猴桃新梢形态观察 调查软枣猕猴桃雌雄株新梢粗度、叶柄粗度、叶柄长度和叶的纵横径之比。由表 1 可以看出,在雌雄株新梢平均粗度相近的情况下,雄株的叶柄细长、叶的纵横径之比较小,但经统计分析均未达到差异显著水平。可见,通过雌雄株新梢形态比较只能说明软枣猕猴桃有雄株比雌株叶柄细长、叶片短的倾向。

表 1 软枣猕猴桃雌雄株新梢形态比较

Table 1 Morphological comparison of

male and female plant shoot in *Actinidia arguta*

性别 Sex	新梢粗度 Shoot roughness/cm	叶柄长 Petiole length/cm	叶柄粗度 Petiole roughness/cm	叶纵径/横径 Leaves longitudinal diameter/ transverse diameter
雄株 Male plant	0.70	5.757	0.228	1.353
雌株 Female plant	0.75	5.436	0.262	1.493

2.1.2 软枣猕猴桃休眠期枝条形态观察 调查软枣猕猴桃雌雄株休眠期枝条叶痕间距、皮孔密度、枝条颜色以及横切解剖结构,由表 2 可以看出,雌株平均叶痕间距大于雄株,雌株皮孔密度大于雄株,经统计分析均达到差异显著水平($P<0.05$)。雌雄株枝条颜色大体上都是灰白色。但雄株枝条颜色白偏灰,而雌株白偏暗红。雌雄株髓部都具有隔膜,横切解剖结构未发现显著差异。

表 2 软枣猕猴桃雌雄株休眠期枝条形态比较

Table 2 Morphological comparison of

male and female plant dormancy branch in *Actinidia arguta*

性别 Sex	叶痕间距 Leaf scar spacing/cm	皮孔密度 Lenticel density /(个·cm ⁻²)	枝条颜色 Branch color	横切解剖结构 Anatomical structure of crosscutting
雄株 Male plant	4.4 a	29 a	白偏灰	有隔膜
雌株 Female plant	5.1 b	42 b	白偏暗红	有隔膜

2.1.3 软枣猕猴桃组培苗生长发育观察 软枣猕猴桃雌雄株组培苗生长发育出现差异,于是调查了幼苗期(2 个月)植株平均高度、根系平均长度以及根系数量,由表 3、图 1 可以看出,雄株平均株高显著高于雌株,但根系数量显著低于雌株。

处出现吸收高峰,而且在反应 2 h 雌雄株间差异不明显,但反应 4 h 开始波峰差异显著,其后虽波峰差异减少,但一直保持这种差异。该结果与杨俊杰等^[9]在芦笋植物

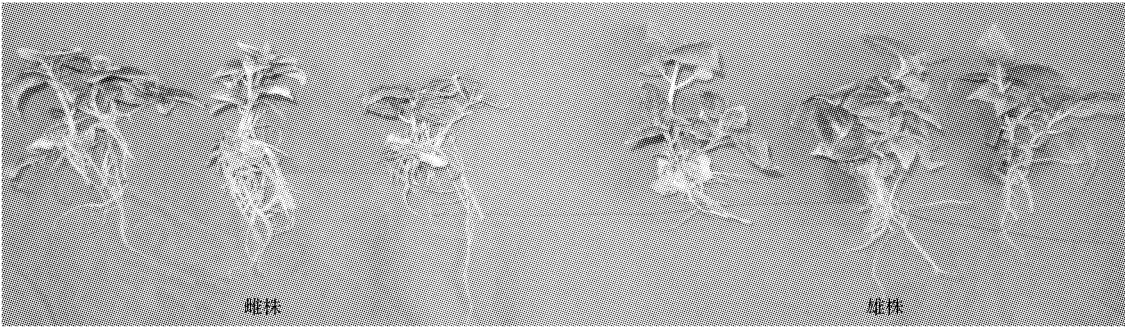


图1 软枣猕猴桃雌雄株组培苗生长发育比较

Fig. 1 Growth and development comparison of tissue culture seedling for male and female plant in *Actinidia arguta*

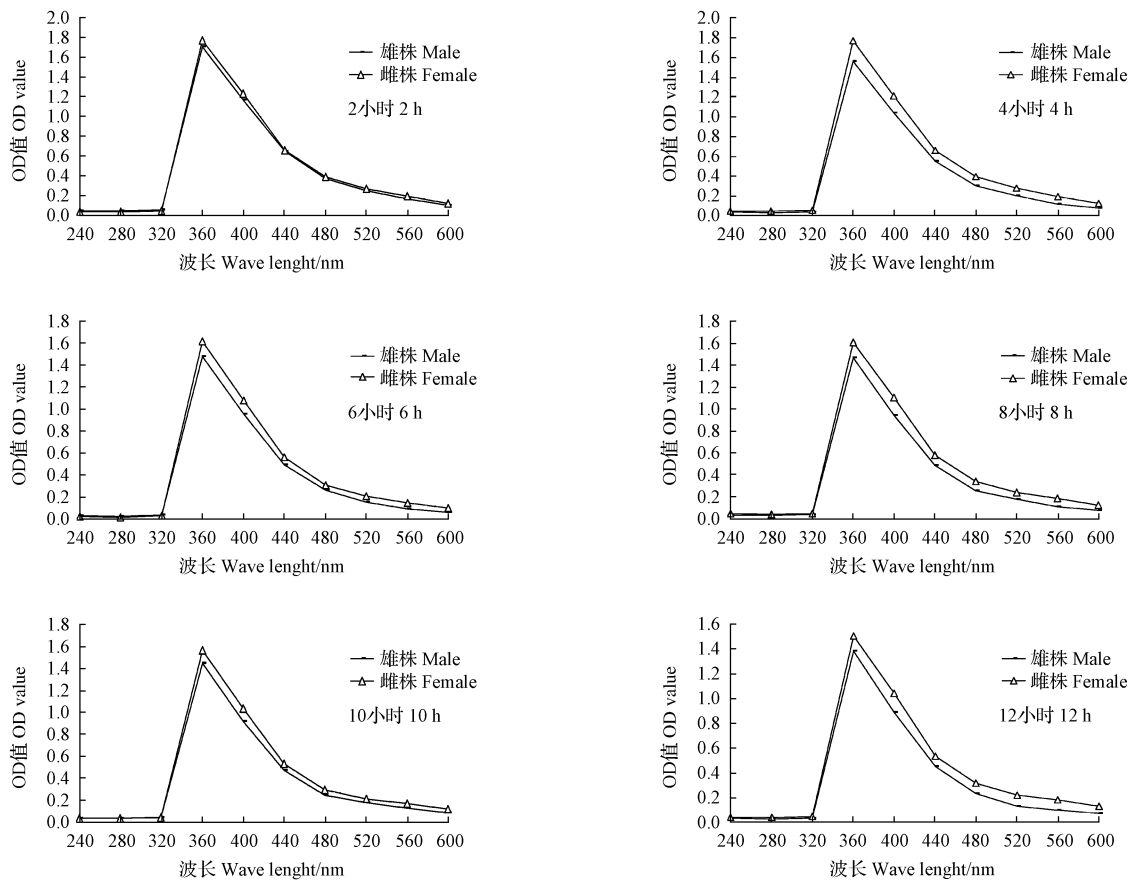


图2 软枣猕猴桃雌雄株 BTB 染色法比较

Fig. 2 BTB dyeing comparison between male and female plants in *Actinidia arguta*

上研究的结果类似,但反应到一定时间时反差减少不明显。根据以上结果 BTB 染色法鉴别软枣猕猴桃性别的时间可以确定为反应 4 h 以后,最好是在反应 4 h,因为反应 4 h 时反差最明显。

2.2.2 软枣猕猴桃雌雄株间 TTC 染色法染色差异

表 4 软枣猕猴桃成熟叶片 TTC 染色法染色结果表明,在 485 nm 处雌株的吸光值显著高于雄株。这个结果与李珊等^[15]在栝楼植株上的研究结果相一致。可见 TTC 染色法是鉴定软枣猕猴桃成龄植株性别的简单而有效

的方法,但童期植株是否适用,还有待于进一步研究证实。

表 4 软枣猕猴桃雌雄株 TTC 法染色差异

Table 4 TTC dyeing differences between male and female plants in *Actinidia arguta*

性别 Sex	吸光度 OD 值 Absorbance OD value (485 nm)
雌株 Male plant	0.290 a
雄株 Female plant	0.208 b

2.2.3 软枣猕猴桃雌雄株间总酚含量的差异 由表 5 可以看出,软枣猕猴桃雌株的总酚含量高于雄株,但未达到差异显著性水平。这个结果与李珊等^[15]、李国梁等^[7]、赵林森等^[6]在栝楼、猕猴桃、杨梅以及复叶槭树上的研究结果倾向一致,但因差异不显著不能作为软枣猕猴桃性别鉴定的有效方法来使用。

表 5 软枣猕猴桃雌雄株间总酚含量差异

Table 5 Total phenol content differences between male and female plants in *Actinidia arguta*

性别 Sex	总酚含量 Total phenol content/(mg · g ⁻¹)
雌株 Male plant	24.33
雄株 Female plant	23.85

3 讨论与结论

软枣猕猴桃枝叶形态调查结果表明,软枣猕猴桃雌株叶痕间距和皮孔密度显著大于雄株,而枝条颜色、横切解剖结构、叶柄粗细长短和叶纵横径之比均未出现显著差异。软枣猕猴桃雄株组培苗显著高于雌株,但根系数量显著低于雌株,这种差异只能有一种解释,就是雄株的根系功能强。BTB 染色法鉴别软枣猕猴桃性别的反应时间为 4 h 以后,但以反应 4 h 差异最明显。TTC 染色法是鉴定软枣猕猴桃雌雄株的有效方法,但是否适用于童期还有待进一步探讨。很多专家在不同植物上均得到雌株水溶性酚的含量要高于雄株的结论,但该试验结果只得到类似的倾向。

参考文献

- [1] 陕西省果协赴澳考察组. 新西兰猕猴桃考察报告[J]. 果农之友, 2009(8):36-37.
- [2] Bugala W. Sex determination of poplars from the color of leaves[J]. Forestry Abstracts, 1951, 52(2):13-16.
- [3] 丁之恩. 银杏[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999:39-40.
- [4] 罗晶. 沙棘植株性别的判断[J]. 中国水土保持, 1986(II):46.
- [5] 徐东生, 华光安, 刘殊, 等. 猕猴桃雌雄识别的多元统计分析[J]. 武汉植物学研究, 1998, 16(3):283-284.
- [6] 赵林森, 徐锡增. 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(3):229-232.
- [7] 李国梁, 林柏年, 沈德绪. 酚类物质在鉴别园艺雌雄性植物中的应用研究[J]. 园艺学报, 1993, 20(4):397-398.
- [8] 曹宗羹. 植物的性别分化及其控制[J]. 生物学通报, 1965(2):4-7.
- [9] 杨俊杰, 张天翔, 蔡坤秀, 等. 用溴麝香草酚蓝鉴别芦笋成年植株的雌雄性[J]. 福建热作科技, 2008, 4(33):18-22.
- [10] 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.
- [11] 李广旭, 沈永波, 高艳敏, 等. 皮孔组织结构及密度与苹果枝干粗皮病发生的关系[J]. 果树学报, 2005, 21(4):350-353.
- [12] 龙程, 潘瑞炽. 用溴麝香草酚蓝鉴定石刁柏(芦笋)雌雄株[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(3):204-205.
- [13] 张雄. 用“TTC”法(红四氮唑)测定小麦根和花粉的活力及其应用[J]. 植物生理学通讯, 1982, 48(3):50.
- [14] Seo J H, Hwang Y S, Chun J P, et al. Changes of phenolic compounds and occurrence of skin browning, and characterization of partially purified polyphenol oxidases in oriental pear fruits[J]. Journal-Korean Society For Horticultural Science, 2001, 42(2):184-188.
- [15] 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.

Study on Sex Identification of *Actinidia arguta* by Morphology and Physiological Biochemical

LI Xu, CAO Wan-wan, JIANG Dan, LIU Di, PIAO Yi-long
(College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 133000)

Abstract: Taking male and female plants of *Actinidia arguta* dormant branches and shoots as experimental materials, with the method of morphology observation and physiological biochemical index determination for the *Actinidia arguta* plant gender identification were studied. The results showed that, leaf scars spacing and lenticel density of female plants were significantly greater than the male plants in *Actinidia arguta*; tissue culture seedling height of male plants was significantly higher than female plants; root number of male plants was significantly lower than female plants; BTB staining method to identify *Actinidia arguta* gender reaction after 4 hours, but the most obvious difference appear at 4 hours; TTC staining method was an effective method for the identification between male and female plants of *Actinidia arguta*, whether it was suitable for the juvenile phase remains to be further discussed.

Keywords: *Actinidia arguta*; sex identification; morphology observation; physiological biochemical index