

宁夏野生枸杞(*Lycium barbarum* L.)苦味性状研究

袁海静¹, 袁汉民², 刘飞³, 赵兴增³, 武小阳⁴, 董立国⁵, 刘兰英¹, 张维军², 何进尚², 王晓亮²

(¹宁夏农林科学院国家枸杞工程技术中心, 银川 750002; ²宁夏农林科学院农作物研究所, 银川 750105;

³江苏省中国科学院植物研究所, 南京 210014; ⁴中国农业科学院研究生院, 北京 100081; ⁵宁夏农林科学院荒漠化治理研究所, 银川 750002)

摘要:采用植物学分类、常规杂交、PCR-SSR 分子标记检测、超高效液相色谱-高分辨质谱[UPLC-MS(HRMS)]等方法, 围绕宁夏野生苦味枸杞的苦味性状进行了研究。结果表明:野生苦味枸杞花丝、花柱的长度、种子大小和颜色等方面与其他中国枸杞种质资源存在较大差异, 其花蕾中的雄蕊花丝、雌蕊花柱呈弓曲状, 多数情况下其浆果簇状着生。PCR-SSR 分子标记检测结果表明, 宁夏野生苦味枸杞 DNA 扩增出了栽培枸杞品种宁杞 1、2、3、4、5、7 号等所没有的条带; 在 111~147 bp 之间, 扩增出了略高于中国枸杞其他种质资源的条带, 其分子量高于中国枸杞其他种质资源相应的 DNA 的分子量, 遗传差异明显。以宁杞 7 号作母本与宁夏野生苦味枸杞杂交, 所得到的 F₁ 成熟浆果出现苦味、甜味分离个数比例接近 1:1。宁杞 7 号作母本与野生半苦味枸杞杂交的 F₁ 浆果苦、甜味的分离个数比例为 1:4。其反交 F₁ 浆果均为苦味。野生苦味枸杞苦味基因可能是杂合的。苦味性状可能受多个显性加性基因控制, 并与细胞核、质遗传物质互作有关。而甜味性状可能受隐性基因控制。初步判定, 苦味物质是具有二氢槲皮素结构的黄酮类化合物。

关键词:簇状浆果; 杂交亲和性; 苦味物质; 二氢槲皮素

Study on Bitter Taste Character of Wild Ningxia Wolfberry in China

YUAN Hai-jing¹, YUAN Han-min², LIU Fei³, ZHAO Xing-zeng³, WU Xiao-yang⁴, DONG Li-guo⁵, LIU Lan-ying¹,
ZHANG Wei-jun², HE Jin-shang², WANG Xiao-liang²

(¹ State Wolfberry Engineering Technique Center, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002;

² Crop Research Institute, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750105;

³ Plant Research Institute in Jiangsu Province, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014;

⁴ Graduate School, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

⁵ Institute of Desertification Control, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002)

Abstract: The bitter taste character of Ningxia wild bitter wolfberry was studied, using methods of botany classification, conventional hybridization, PCR-SSR molecular marker detection, Ultra performance liquid chromatography high resolution mass spectrometry [UPLC-MS(HRMS)] in this paper. The results showed that, comparing with other Chinese wolfberry germplasm, the length of filament and style, seed size and color etc. of Ningxia wild bitter wolfberry had larger differences. Its stamen filaments and pistil style of flower buds were curly shape. Most berries clustered. PCR-SSR molecular marker detection results showed that DNA of Ningxia wild bitter wolfberry was amplified a band, which had not found in cultivars that of Ningqi 1, 2, 3, 4, 5, 7, etc. . Meanwhile, between 111 bp and 147 bp, Ningxia wild bitter wolfberry DNA amplified a band which was slightly higher than other Chinese wolfberry germplasm resources. It meant that the molecular weight of the site was higher than other germplasm resources of Chinese *Lycium barbarum* L. It had a significant difference in genetic material. As a female parent, Ningqi 7, a major cultivar in Ningxia, crossed by Ningxia wild bitter wolfberry, the mature berries of hybrid F₁ generation had a propor-

收稿日期: 2016-12-02 修回日期: 2017-02-26 网络出版日期: 2017-08-14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170814.1013.022.html>

基金项目: 科技部科技基础性工作专项(2011FY110200); 宁夏农林科学院科技创新先导资金项目(NKYQ-13-11)

第一作者主要从事作物遗传资源、育种、枸杞生物技术、分子标记研究。E-mail: haijingyuan@hotmail.com

通信作者: 袁汉民, 主要从事作物遗传资源、育种研究。E-mail: hanminyuan886@aliyun.com

tion of bitterness and sweetness separation, which closed to 1:1. Meanwhile, the separation ratio of bitter to sweet berries was 1:4 in F_1 , when Ningqi 7, as female parent, crossed by wild semi bitter wolfberry. However, all of F_1 fruits were bitter from the reverse cross. Obviously, bitter genes might be heterozygous of wild bitter wolfberries in rural environment. However, it indicated that bitter traits might be controlled by multiple dominant genes with additive genetic effects, and it might relate to the interaction between nuclear and plastid genetic material. The sweet trait might be controlled by recessive genes. According to preliminary determination, the main source of bitter substance might be flavonoids with taxifolin structure.

Key words: cluster berry; cross compatibility; bitter taste substance; taxifolin

我国多数种类的枸杞分布于西北和华北,只有一种枸杞分布于南方各省^[1]。枸杞成熟果实含有枸杞多糖、多种氨基酸、微量元素、维生素、牛磺酸、生物碱、挥发油等化学成分,具有滋补肝肾、益精明目的功效^[2]。笔者在宁夏野外多处发现苦味枸杞,其红果味苦而润嗓,颇似西洋参味。到目前为止,尚未见到前人关于苦味枸杞的研究报道。本研究针对宁夏野生苦味枸杞的苦味性状,从植物学、遗传学、分子生物学、超高效液相色谱-高分辨质谱检测等方面对宁夏野生苦味枸杞进行了研究。其目的在于搞清野生苦味枸杞植物学性状、化学成分、药用价值,及其与中国枸杞其他种质资源的亲缘关系。本研究将对挖掘枸杞种质资源,丰富我国枸杞种质

资源基因库、中医药宝库具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

选取4份野生苦味枸杞为供试材料,以栽培枸杞宁杞7号为对照。此外,利用28份中国枸杞种质资源做PCR-SSR分子标记检测对照材料,分别是:盐池野生枸杞、新疆枸杞、中国枸杞、北方枸杞、黑果枸杞、云南枸杞、柱筒枸杞、截萼枸杞、蔓生枸杞、红枝枸杞、宁杞1号、宁杞2号、宁杞3号、宁杞4号、宁杞5号、宁杞7号、菜用枸杞、大麻叶、宁夏黄果、白条枸杞、尖头圆果枸杞、黄叶枸杞、04-3-32、4-B、06-16、06-03、06-02、同心县注家堰村野生枸杞。

表1 供试材料来源信息

Table 1 The sources of tested accessions

名称 Name	经纬度 Latitude and longitude	海拔(m) Altitude	取样地点 Sampling spot
宁夏海原苦味枸杞	36.35525°N, 105.27181°E	1752	宁夏海原县西安镇园河村
宁夏海原苦味白花枸杞	36.35525°N, 105.27181°E	1752	宁夏海原县西安镇园河村
宁夏西吉震湖苦味枸杞	35.50747°N, 105.27882°E	1831	宁夏西吉县震湖乡(路东)
宁夏西吉震湖半苦味枸杞	35.50747°N, 105.27882°E	1831	宁夏西吉县震湖乡(路西)
宁杞7号	38.47314°N, 106.21512°E	1109	宁夏农林科学院国家枸杞工程技术中心

1.2 植物学性状观察

2013年9月分别从上述取样点采集每个样本树3株,移植到宁夏银川市金凤区太阳岛试验基地(38.51405°N、106.23295°E,海拔1106 m)种植,行株距2 m×1.5 m,每株穴坑规格为0.6 m×0.6 m×0.6 m,移栽后灌水,1个月枸杞树成活后,每株在离样本株四周0.5 m处挖浅沟,施有机肥1 kg,覆土,再灌水,及时除草,进行驯化栽培。2014年春季,样本株发芽、开花、结果、成熟。2014-2015年,采用植物学性状观察方法重复对宁夏野生苦味枸杞的叶

片、枝条、花器、果实、种籽的颜色和形状等特征进行观察、记载。

1.3 PCR-SSR分子标记检测

参照J. Sambrook等^[3]方法提取宁夏野生苦味枸杞及其他中国枸杞种质资源28份新鲜枸杞叶片的DNA,采用SDS法,取供试材料未展开的幼嫩叶片200 g,液氮研磨成粉末,用总提取试剂盒提取其DNA用于SSR分析。*Taq*酶和反应缓冲液来自广东东胜生物工程公司,引物由Invitrogen(上海)公司合成。PCR反应体系为20 μL,0.8U *Taq* DNA聚合酶。反应

程序为:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 40 s,50 ~ 60 ℃退火 35 s,72 ℃延伸 40 s,36 个循环;72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。反应产物经 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染检测,干燥后扫描记录结果。

利用与枸杞同科的烟草植物的 637 对 SSR 引物^[4]进行反复筛选实验,鉴定、比较和分析,建立并优化枸杞 PCR 反应体系,筛选 SSR 分子标记引物。

1.4 宁夏野生苦味枸杞与宁杞 7 号杂交亲和性检测

2015 年,在宁夏银川市金凤区太阳岛试验基地,选用宁夏海原苦味枸杞、宁夏海原苦味白花枸杞、宁夏西吉震湖苦味枸杞 3 个全苦枸杞,宁夏西吉震湖半苦味枸杞以及栽培枸杞宁杞 7 号(甜味枸杞)作亲本,进行甜、苦味枸杞正、反交试验。根据父母本花期相遇数量不同,每个杂交组合授粉 20 ~ 40 朵花不等。人工杂交前一天,选择父本整朵花 3 ~ 5 朵,放入干燥的培养皿置于常温室,在大田状态下选择没有开蕾的母本花朵去雄,马上进行人工授粉,然后用硫酸纸袋封实受粉的花朵^[5]。待果实成熟后考种,考种项目包括:每袋授粉花朵数、每袋结实果实数、授粉结实率、每果结实种子数、平均种子/单果数、果实颜色、果实甜苦数、种子颜色、F₁ 种子出苗率等。

1.5 苦味物质检测

1.5.1 样品处理 称取宁夏西吉震湖苦味枸杞样品 140 g,加入约 7 倍量甲醇,超声处理 1 h 后提取,共处理、提取 3 次,合并提取液,减压蒸馏,除去甲醇;加水分散,分别使用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯萃取,获得乙酸乙酯部位。同样方式处理栽培枸杞宁杞 7 号样品 140 g,作为对照。

1.5.2 UPLC-MS 分析 采用 UPLC-MS(HRMS)(仪器型号:Agilent 1260 UPLC-DAD-6530 ESI-QTOF MS)分别对宁夏西吉震湖苦味枸杞样品与宁杞 7 号样品提取液进行分析。液相色谱条件:C18 色谱柱,流速为 0.3 mL/min,柱温 35 ℃,流动相为甲醇-水(含 0.1% 甲酸),0 ~ 60 min,甲醇 5% ~ 100%,保持 15 min,正离子模式(MS-MS)。

在超高效液相色谱-高分辨质谱仪上分别提取两份样品质谱图及差谱,分析质谱差异及差谱中所显示出的分子量,与已知的苦味物质的分子量进行比较,确定味苦素物质。

2 结果与分析

2.1 植物学性状描述

宁夏野生苦味枸杞植株基本上有两种株型,一种较高些,株高约 120 cm,浆果也较大;一种较矮

些,株高 35 ~ 40 cm,浆果较小。

叶片:野生苦味枸杞叶片比栽培枸杞宽大些,叶片呈条状、条状披针或椭圆披针状,叶柄较长(图 1)。叶面光滑,叶片上分泌有白色物质,病斑少;果枝少刺,刺较长。



图 1 宁夏野生苦味枸杞叶片形状

Fig. 1 Leaf shapes of Ningxia wild bitter wolfberry

宁夏野生苦味枸杞开花、结果习性与栽培枸杞习性相同,每年集中开花、结果成熟两次,分别于 6 月初、9 月上旬开花,7 月、10 月上旬浆果成熟。

花器:宁夏野生苦味枸杞的花冠绝大多数为 5 裂,但是 4 裂、6 裂、7 裂、8 裂花冠出现的频率较宁杞 7 号高。苦味枸杞雄蕊为 4 ~ 8 枚,但大多数为 5 裂花冠,5 枚雄蕊、雌蕊 1 枚(图 2)。苦味枸杞“花联合”现象较多,即两或多花柄联合、两或多花萼联合。花萼颜色有白色、紫蓝色、紫蓝与白色相间 3 种;花器的雄蕊花丝、雌蕊花柱均较长。如在宁夏西吉震湖苦味枸杞树上,出现多花冠联合,形成多裂花冠,而且其 6 枚雌蕊连体,子房 12 室。一般中国枸杞种质的花器呈钟状,雄蕊略比花冠长或短,花丝与花冠位于同一水平。而宁夏野生苦味枸杞花蕾的雄蕊花丝、雌蕊花柱呈弓曲状,开花后花丝、花柱伸出长度要比其他中国枸杞种质资源长 1 ~ 2 倍,花丝与花冠明显不在同一水平上,而且还可见花柱上端的弓曲状。

果实:宁夏野生苦味枸杞浆果成熟时为鲜红色,果皮较栽培枸杞厚些,果实形状有圆形、椭圆形、卵形、长圆柱形等,顶端短尖或平,不同植株之间果实性状差异较大。宁夏野生苦味枸杞浆果有一个明显的特点,就是其浆果簇状着生在叶腋部(图 3),包括独立着生果和联合果。其中,双果现象较多。宁夏苦味枸杞浆果成熟时就可嗅到苦味,而宁夏栽培枸杞宁杞 7 号浆果成熟时便可嗅到一种清香味。按照成熟浆果苦味程度,宁夏野生苦果枸杞又可分为全苦果和半苦果类型。所谓全苦果枸杞浆果味没有任何甜味,半苦果枸杞的浆果为半甜、半苦味,苦中有丝微的甜味。

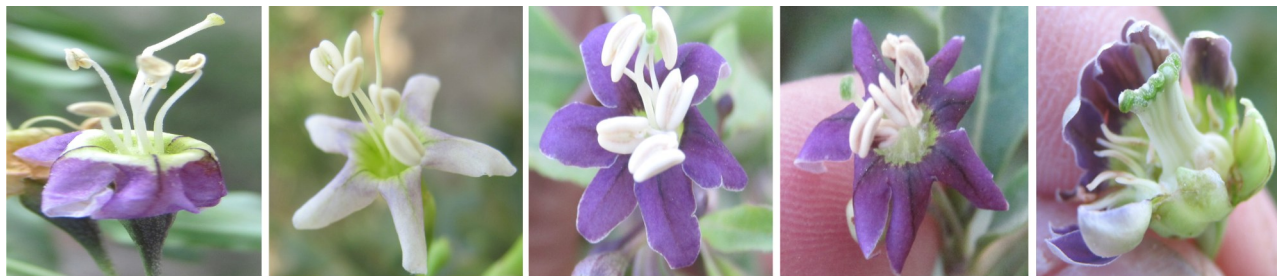


图2 宁夏野生苦味枸杞花器

Fig.2 Flower of Ningxia wild bitter wolfberry



图3 宁夏野生苦味枸杞浆果簇状着生在叶腋部

Fig.3 Ningxia wild bitter wolfberry was born in the axil of clusters

种籽:宁夏野生苦味枸杞种籽与栽培枸杞宁杞7号种籽形状相同,种籽一端较圆,另一端有一小尖,与茄科其他属、种的种子形状相似。宁夏野生全苦味枸杞、半苦味枸杞种子较为饱满,全苦味枸杞种籽直径平均为2.15 mm,半苦味枸杞种籽直径平均为2.05 mm(图4),宁杞7号的只有1.65 mm,全苦

味枸杞、半苦味枸杞种子直径分别比宁杞7号大30.3%、24.2%。宁夏野生苦味枸杞与半苦味枸杞种子的直径差别不大,只是半苦味枸杞种子表皮颜色黄底带有较多的褐斑,苦味枸杞种子表皮颜色黄底带有较淡的褐斑。



图4 宁夏野生全苦味枸杞(左)、半苦味枸杞(中)、甜味枸杞宁杞7号(右)种籽

Fig.4 The seeds of Ningxia wild bitter wolfberry(left),half bitter wolfberry(mid.)and sweet wolfberry Ningqi No.7(right)

2.2 PCR-SSR 分子标记检测结果

经过对枸杞资源 DNA 提取物的实验,初步从烟草植物 736 对 SSR 引物中筛选出了 20 对引物(表2),后经过反复实验、比较、分析,优化出 6 对引物。其中,引物 30164 和引物 30165 效果最佳。

引物 30165 的分子标记属于显性标记,从图 5 可以看出,主要的扩增条带在 67 ~ 110 bp 之间,如

箭头所示,在海原苦味枸杞、西吉震湖苦味枸杞、中国枸杞、北方枸杞、黑果枸杞、红枝枸杞、菜用枸杞、04-3-32 中扩增出显性条带。说明,宁夏野生苦味枸杞与部分中国枸杞种质资源显示出相同的条带,而且这些条带是栽培枸杞品种宁杞 1、2、3、4、5、7 号等所不具有的。

表 2 初步筛选出的 20 对 SSR 引物

Table 2 The preliminary selection of 20 pairs of SSR primers

引物名称 Primer name	重复类型 Repeat type	产物长度 (bp) Product length	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
30353	TA	209	CTGCAAATATCAACGGCTCA	TCATCAGGAAGAGAAGTTGGC
30002	GA	120	CCATTCTCCACAAGTGCAA	TGCGATGAATATCGAGGTGA
30005	TAA	230	GGTAGGAGGAGGACGACCTTT	AAGACACAATCCCATGGCTA
30014	TA	205	TGCCGTGTAAATTTTCATTGG	AGGATTCTTAACGTGTATTATGTTCT
30257	TA	143	TTGTCAAGAAGACCCAACGA	GGCCTAGTGAGCTAGGGTT
30021	TA	224	CATTTGAACATGGTTGGCTG	CTCAACTCTCGTCGCTCTTG
30028	CA	171	AAACTTGAAGCAGAGACGGC	GCACATCGGGATCTTGATTT
30057	CAT	101	GGATGTGGATGCGGGTAA	CAAACGCTGCAGTGTCTCTGT
30165	TAA	224	ACCTCTGTGGCCGTAAGCTA	CCTCTACTTCAACAGGGTAAGAAA
30183	TA	227	CCAGCACAGTCAACTCTCCA	TGTAGCCATGACATAGCCGA
30067	TA	204	AAGCCTGGTCAGTTATCCCA	ATTTCGACCACTTAATCCCA
30412	TAGA	136	CATTTAGCCGGGAACATTCA	CATGGGATACACACGCAAAAG
30477	TA	163	TCCAGAACTTAGAAGCCTTGAA	ATGCAATTTGATGTCTGCCA
30098	TA	230	TTGTTGCTCTCTCGAGTTCTTT	GCAGTCGACTCATTGGCA
30304	GA	141	GCCTTCCGGTTTGTCTTAT	CCGTGGTGACAGAGAAAGAA
30164	CAG	153	GACGAGAGAGGAGGGAAG	GAGAACTGTGGAAGTTGCCG
30186	GAA	230	GAGCCAGAAACAGAGCAAGAA	GATGAATAGCTCTGAATGCTGC
30368	CAA	142	TCACCAATTATGCCGATTCA	CACACACTTCTTTGGAATTGAGA
30197	TAA	209	TTGTCTATTCTGCCATGTCTCTC	AAGCAAATCAAGTTTCTACCAGA
30255	GAAA	228	CTGCTCCATCATTGCTCAAA	GCAACATATCCGAACCTCCA

30021,30067,30098,30164,30165,30477 是用于野生苦味枸杞材料扩增的 6 对 SSR 引物

The 30021,30067,30098,30164,30165,30477 of 6 pairs of primers for SSR amplification of wild bitter wolfberry

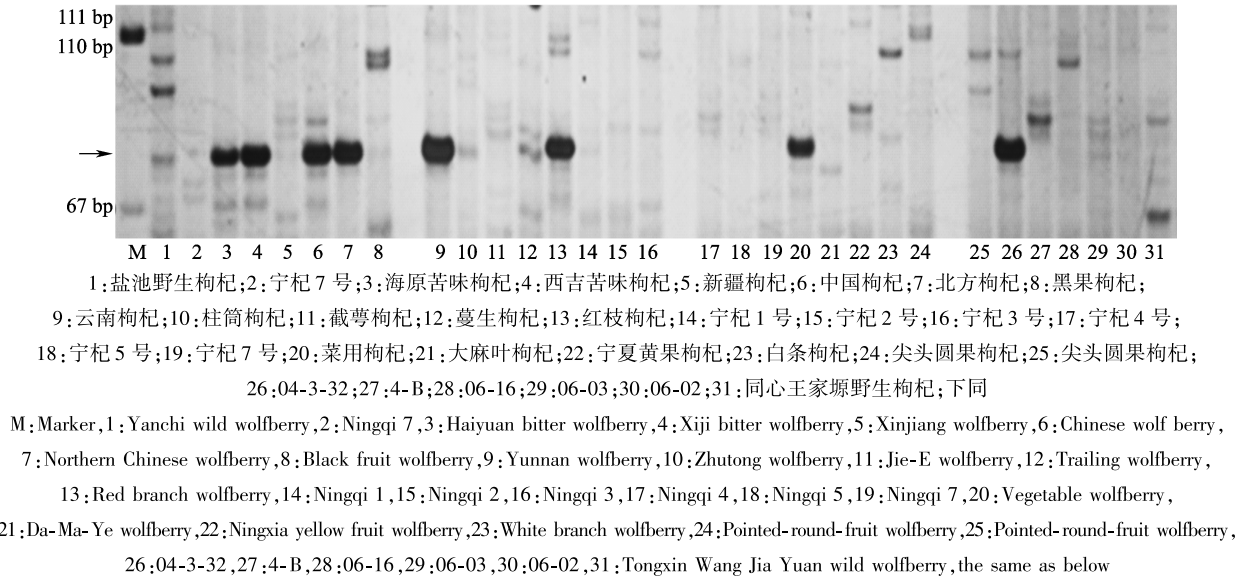


图 5 分子标记 30165 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 5 Polyacrylamide gel electrophoresis results of molecular marker 30165

引物 30164 的分子标记属于共显性标记。从图 6 看引物 30164 效果更佳,扩增条带在 111 ~ 147 bp 之间,宁夏西吉、海原苦味枸杞 DNA 泳带扩增出了略高于中国枸杞其他种质资源的条带(如箭头所示),这意味着其分子量高于中国枸杞其他种质资源相应的 DNA 的分子量,遗传物质差异明显。

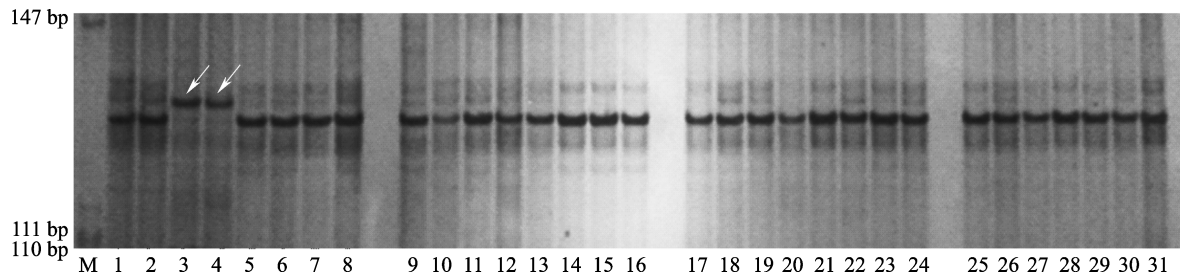


图 6 分子标记 30164 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 6 Polyacrylamide gel electrophoresis results of molecular marker 30164

2.3 宁夏野生苦味枸杞与宁杞 7 号杂交亲和性检测

2.3.1 正、反交 F_1 结实率和出苗率 从海原县野生苦味枸杞原生地采集的样本株中,只发现其中 1 株为白花苦味枸杞,且植株幼小,花蕾较少,开花较晚,与宁杞 7 号花期相遇性较差。用其花蕾做反交组合(海原白花苦味/宁杞 7 号)后,正交组合(宁杞 7 号/海原白花苦味)的母本开花期结束。因此,缺少正交结果。尽管如此,由表 3 可以看出一种明显的趋势,即宁夏野生苦味枸杞与栽培枸杞杂交,无论是正交,还是反交均能正常结实。

正交:以宁杞 7 号作母本、苦味枸杞作父本, F_1 结

实率较高,平均每个组合结实率变幅为 85.6% ~ 95.0%。正交 F_1 种子出苗率较高,为 51.1% ~ 77.1%。

反交:以宁夏野生苦味枸杞作母本、宁杞 7 号作父本,反交结实率变幅为 54.8% ~ 62.0%,明显低于正交,相差 30.7% ~ 33.0%。反交 F_1 种子出苗率较低,为 5.0% ~ 9.4%,仅为正交的 9.8% ~ 12.2%。说明栽培枸杞宁杞 7 号与宁夏野生苦味枸杞杂交 F_1 种子出苗率因正交、反交方式不同而差异较大。正交 F_1 种子可育性较好,反交 F_1 种子可育性较差。

表 3 甜味、苦味枸杞杂交结果统计

Table 3 Statistical analysis of the hybridization results of sweet and bitter wolfberry fruit

杂交 类型 CT	组合名称 Combination name	每袋	每袋	授粉	每果结实 种子数 Number of Seed/Fruit								平均 种籽/ 单果 AS/F	果实 颜色 FC	果实味道		种皮颜色			F ₁ 出苗 率(%) SGR
		授粉	结实	结实率											FF		SCC			
		花朵数	果实数	(%)											甜	苦	黄	褐	黄褐 相间	
		NPF/B	NF/B	SSRP											S	B	Y	B	YBA	
正交 OC	宁杞 7 号/ 西吉震湖 (路东) 苦味	2	2	100.0	11	41							26.0	红	1	1	2			51.1
		7	7	100.0	46	40	35	51	55	58	35	45.7	红	2	5	2	2	3		
		8	8	100.0	64	51	24	24	30	28	36	46	37.9	红	5	3	6	2		
		4	3	75.0	52	47	28							42.3	红	3	3			
		6	6	100.0	44	37	42	48	25	49			40.8	红	4	2	4	2		
		平均值		95.0									38.6	合计	15	11	17	4	5	
	宁杞 7 号/ 西吉震湖 (路西) 半苦味	5	3	60.0	39	30	42							37.0	红	3		2	1	77.1
		7	7	100.0	43	18	42	15	44	34	28			32.0	红	6	1	6	1	
		6	6	100.0	49	45	37	39	43	38			41.8	红	6	1	5	1		
		5	5	100.0	38	24	34	45	36					35.4	红	5	0	5		
		11	8	72.7	20	37	10	40	14	38	22	29	26.3	红	7	1	7			
		平均值		86.5									34.5	合计	24	6	23	2	3	
	宁杞 7 号/ 海原苦味	8	8	100.0	39	51	56	39	45	32	44	40	43.3	红	7	1	8			
		7	7	100.0	50	28	58	53	30	35	54			44.0	红	5	2	4	2	1
		9	7	77.8	41	46	32	32	50	54	41			42.3	红	7		1	1	5

表 3(续)

杂交 类型 CT	组合名称 Combination name	每袋	每袋	授粉	每果结实 种子数						平均	果实 味道		种皮颜色				F ₁ 出苗 率(%) SGR
		授粉	结实	结实率							种子/							
		花朵数	果实数	(%)							单果							
		NPF/B	NF/B	SSRP							AS/F	果实 颜色 FC	甜 S	苦 B	黄 Y	褐 B	黄褐 相间 YBA	
反交 RC	海原苦味/ 宁杞 7 号	6	6	100.0	16	34	48	30	31	27	31.0	红	2	4	2	4		52.5
		6	3	50.0	25	40	36				33.7	红	2	1	2	1		
		平均值		85.6							38.8	合计	16	15	17	8	6	
		14	6	42.9	20	2	13	4	6	17	10.3	红		6	2	4		
		2	2	100.0	14	16					15.0	红		2	2			
		5	3	60.0	17	17	18				17.3	红		3	3			
		8	6	75.0	17	20	15	18	21	17	18.0	红		6	1	1	4	
		7	1	14.3	18						18.0	红		1		1		
		5	4	80.0	8	14	16	12			12.5	红		4	2	2		
		平均值		62.0							15.2	合计	0	22	10	8	4	
	海原苦味白花 /宁杞 7 号	5	3	60.0	9	8	15				10.7	红		3		2	1	9.4
		13	8	61.5	9	17	12	16	13	13	13.9	红		8		8		
		平均值		60.8							12.3	合计	0	11	0	10	1	
		3	3	100.0	24	16	14				18.0	红		3	2	1		
	西吉震湖 (路东) 苦味/ 宁杞 7 号	7	6	85.7	66	25	18	24	24	10	27.8	红		6	4	2		5.0
		7	2	28.6	20	18					19.0	红		2		2		
		5	3	60.0	8	20	20				16.0	红		3	1	1	1	
		5	2	40.0	12	18					15.0	红		2		1	1	
		7	1	14.3	21						21.0	红		1	1			
		平均值		54.8							19.5	合计	0	17	8	7	2	

CT: Cross type, OC: Orthogonal cross, RC: Reciprocal cross, NPF/B: Number of pollinated flowers/bag, NF/B: Number of fruit/bag, SSRP: Seed setting rate of pollination, AS/F: Average seed / fruit, FC: Fruit color, FF: Fruit flavor, S: Sweet, B: Bitter, SCC: Seed coat colour, Y: Yellow, B: Brown, YBA: Yellow and brown alternate, SGR: Seed germination rate

2.3.2 正、反交 F₁ 果实甜、苦性状分离表现 正交:以宁杞 7 号作母本的正交试验中所得果实(F₁)出现苦味、甜味的分离。其中,宁杞 7 号/海原苦味、宁杞 7 号/西吉震湖(路东)苦味组合 F₁ 果实苦、甜味分离个数分别为 15:16、11:15;即 1:1.06、1:1.36,接近 1:1。宁杞 7 号/西吉震湖(路西)半苦味组合的 F₁ 果实苦、甜味的分离个数为 6:24,即 1:4。这说明,苦味性状可能是受多个、具有加性基因效应控制的。

反交:以宁夏野生苦味枸杞作母本的反交试验中所得到的果实均为苦味。说明苦味性状对甜味性状来说是显性遗传性状,并与细胞核、质遗传物质互作有关。

2.3.3 正、反交 F₁ 种子表皮颜色性状分离表现

由图 4 得知,宁杞 7 号的种子表面呈黄色,宁夏野生苦味枸杞的种子表面呈褐斑或淡褐斑。本项研究发现,宁杞 7 号作母本的正交 F₁ 种子较小,像母本,但是颜色有分离。而以苦味枸杞作母本的反交 F₁ 种子较大,像母本,颜色也有分离。这说明苦味枸杞与栽培枸杞杂交后,其种子形状具有倾母性。F₁ 种子

的颜色性状分离表现为:

正交:以宁杞 7 号作母本组合的种子颜色出现褐色(黄褐相间色的种子可归为褐色种子)、黄色分离个数比为 9:17、14:17、5:23(半苦味枸杞作父本),即 1:1.89、1:1.21、1:4.6,这与上述果实甜、苦味分离比 1:1、1:4 相似。

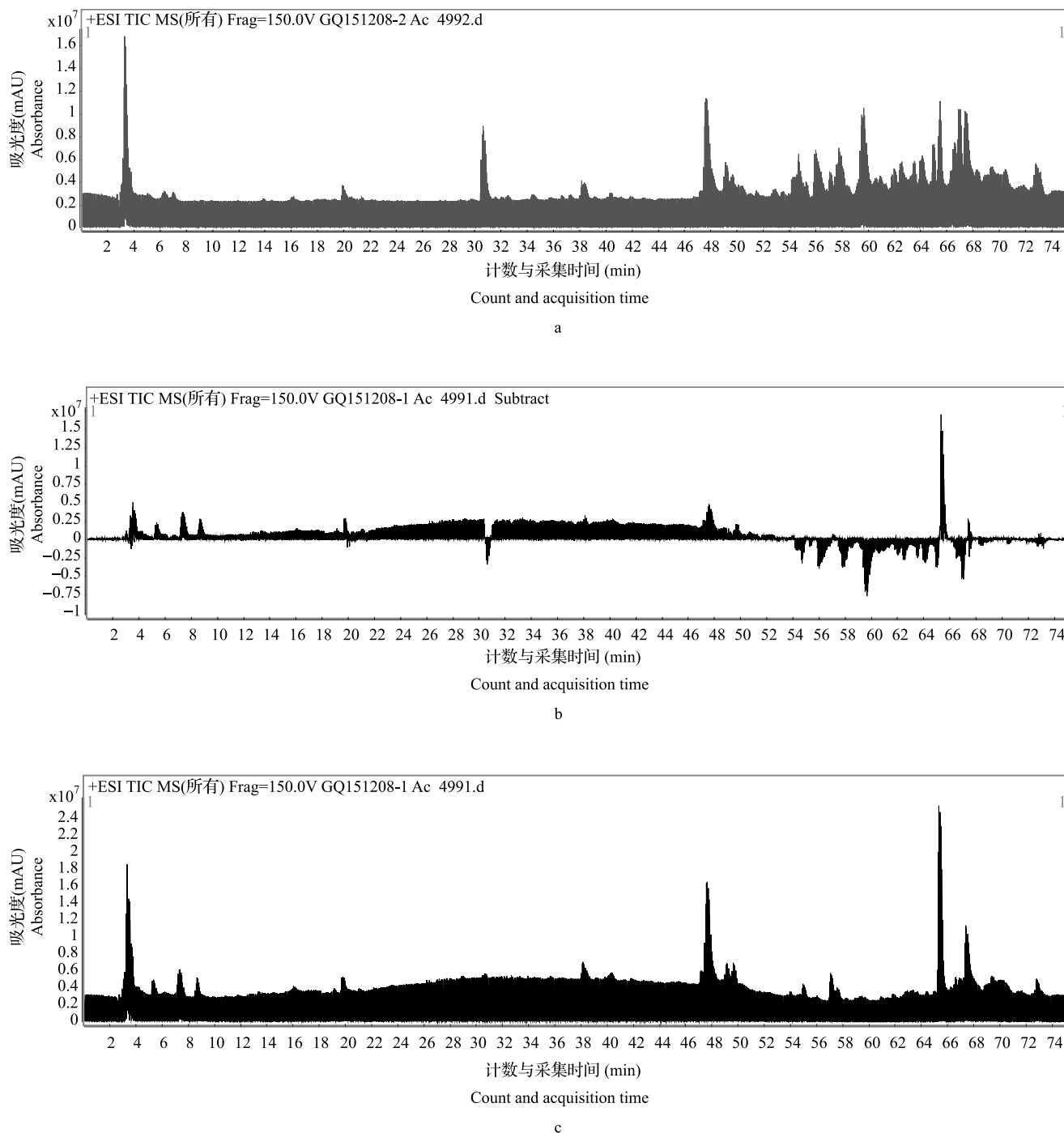
反交:在反交试验中出现两种情况:以海原苦味枸杞、西吉苦味枸杞作母本的组合 F₁ 种子表皮褐色、黄色分离个数比例为 12:10、9:7,近于 1:1。F₁ 种子颜色分离表现证实,海原、西吉苦味枸杞种皮颜色基因为杂合的,而宁杞 7 号种皮颜色基因为纯合的。此外,以海原野生白花苦味为母本的苦、甜味枸杞杂交的组合 F₁ 种子全部为褐色,说明海原野生白花苦味枸杞种皮颜色受细胞核、细胞质遗传物质互作控制效应较强,致使种子颜色全部为褐色。

2.3.4 宁夏野生苦味枸杞苦味物质化学成分分析

结果表明,宁夏西吉震湖乡野生苦味枸杞、宁杞 7 号鲜果样品质谱图差别明显(图 7)。提取其一级质谱图与相应二级质谱图(图 8)。分析质谱可知:主要差

别在保留时间 65.493 min 处,一级质谱 $[M+H]^+$:分子量 585.5370;二级质谱主要离子碎片分子量 304.2626,与分子量 304.25 的二氢槲皮素吻合(图

9)。因此,据二级质谱离子碎片初步推测主要物质为具有二氢槲皮素结构的黄酮类化合物。通常情况下,槲皮素型的黄酮类化合物味道非常苦。



a:宁夏西吉震湖乡野生苦味枸杞乙酸乙酯部位;b:宁杞7号乙酸乙酯部位;c:宁夏西吉震湖乡野生苦味枸杞与宁杞7号差谱

a:Ethyl acetate position of Ningxia Xiji Township earthquake Lake wild bitter wolfberry,b:Ethyl acetate position of Ningqi 7,

c:The difference spectrum between wild bitter wolfberry of Ningxia Xiji Township earthquake Lake and Ningqi 7

图7 总离子流图

Fig.7 Total ion flow diagram

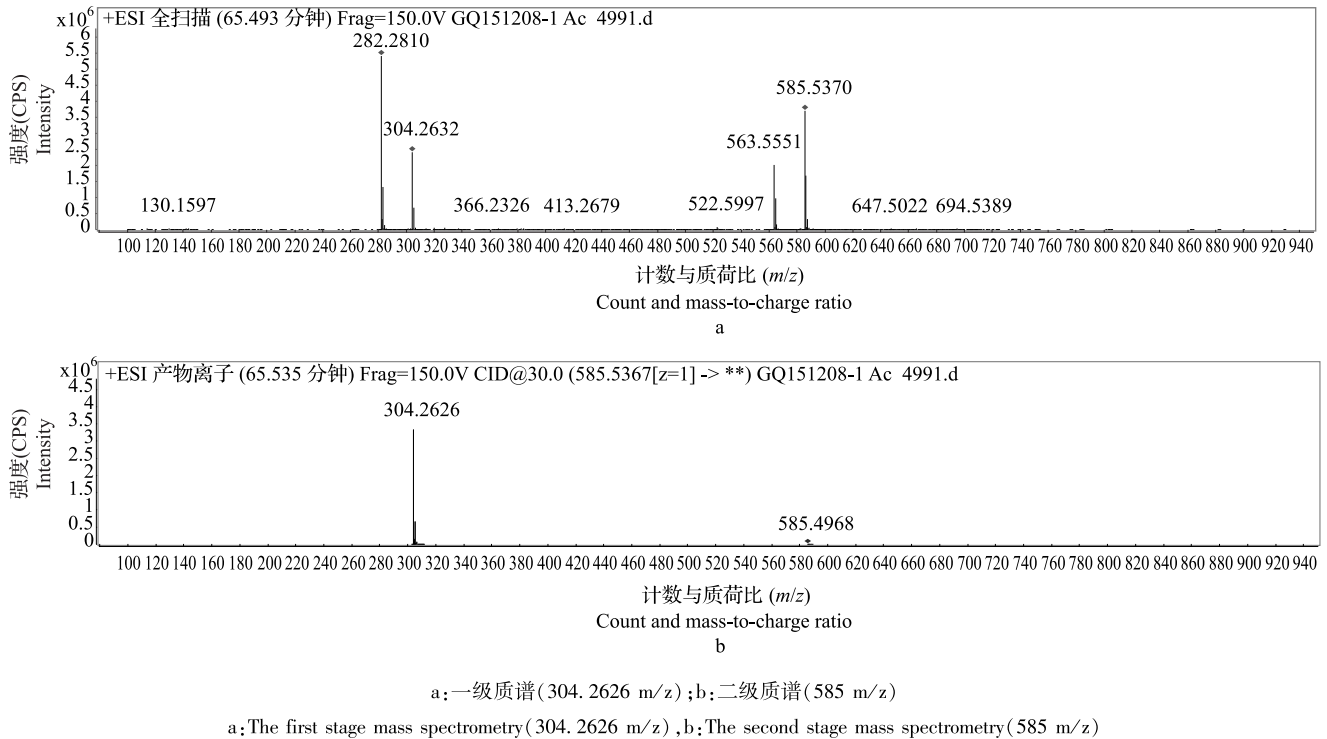


图8 一级质谱与相应二级质谱提取图

Fig.8 Extraction of the first stage mass spectra and the second stage of mass spectra

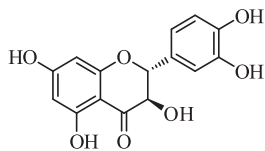


图9 二氢槲皮素化学结构式

Fig.9 The chemical structure of dihydroquercetin

3 讨论

3.1 宁夏野生苦味枸杞植物分类问题

宁夏野生苦味枸杞叶片比栽培枸杞宽大些,叶面光滑,病斑少,果枝少刺,刺较长,叶片形成条状。宁夏野生苦味枸杞的雄蕊比花冠长出许多,其雌蕊花柱较长,靠近柱头呈拳曲状。宁夏野生苦味枸杞浆果另外一个特点是,其许多植株的浆果簇状着生在叶腋部。因此,苦味枸杞与其他中国枸杞在形态上存在一定的差异。沈剑明等^[6]推测,宁夏枸杞的祖先可能具有螺旋状聚伞花序,即花联合现象。这意味着宁夏野生苦味枸杞可能是更远古些的物种。PCR-SSR 分子标记检测结果表明,宁夏野生苦味枸杞 DNA 扩增出了栽培枸杞品种宁杞 1、2、3、4、5、7 号等所没有的条带;在 111 ~ 147 bp 之间扩增出了略高于中国枸杞其他种质资源的条带,这仅能说明宁夏苦味枸杞在遗传方面

与栽培枸杞,或者其他中国枸杞种质资源存在差异。按照目前枸杞分类学的划分法,尚无法将苦味枸杞划为一个新种或亚种。

3.2 宁夏野生苦味枸杞苦味性状遗传及其与栽培枸杞 F₁ 结实率、出苗率表现

宁夏野生苦味枸杞与宁杞 7 号杂交亲和性较好,不存在遗传隔离。在本研究中,以宁夏野生苦味枸杞作母本所得到的果实均为苦味。而以宁杞 7 号作母本所得果实(F₁)出现苦味、甜味的分离。其中,宁杞 7 号/海原苦味组合、宁杞 7 号/西吉震湖(路东)苦味组合 F₁ 果实苦、甜味分离个数比例分别为 15:16、11:15;接近 1:1。宁杞 7 号/西吉震湖(路西)半苦味组合的果实苦、甜味的分离个数比例为 6:24,即 1:4。这说明自然条件下生长的宁夏野生苦味枸杞在遗传基因方面很可能是一个杂合体。苦味性状可能是受多个、具有加性基因效应显性遗传的控制,并与细胞核、质遗传物质互作有关。而甜味性状可能是受隐性基因控制。

宁夏栽培枸杞与野生苦味枸杞杂交,以苦味枸杞作母本、宁杞 7 号作父本的反交,F₁ 结实率及种子出苗率低可能与母本(野生苦味枸杞)雌蕊花柱较长和其细胞质中的二氢槲皮素化学成分有关。由于野生苦味枸杞的花柱长度要比其他中国枸杞种质资源

源长 1~2 倍,授粉时父本(栽培枸杞)的雄配子在通过母本野生苦味枸杞花柱到达子房与胚珠受精的行程要长 1~2 倍,一些活性弱勢的雄配子未能到达子房而中途夭折。加上二氢槲皮素对栽培种的花粉粒产生一定的抑制作用,造成授粉结实率低。有关研究^[7-8]表明槲皮素对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶活性有较强的抑制作用。种子萌发过程中,均有 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶参与^[9]。以宁夏栽培枸杞作母本正交所得到的 F_1 的胚乳为栽培枸杞宁杞 7 号胚乳,对其胚芽的形成与生长影响较小。反交种子胚乳来自亲本野生苦味枸杞,而野生苦味枸杞在长期演变过程中,由于其种子适应了二氢槲皮素的环境,具有 1/2 栽培枸杞遗传成分的胚对野生苦味枸杞胚乳环境的适应性相对较差。所以造成了宁夏栽培枸杞与野生苦味枸杞正反交 F_1 结实率和种子出苗率差异较大。

3.3 关于苦味枸杞苦味素

无论是遗留下来或整理的古代中草药书籍^[10-14],还是现代中医药文献^[15-20],除了本项研究之外,尚查不到关于苦味枸杞的苦味素的研究文献。然而在其他属、种植物中关于槲皮素、二氢槲皮素研究较多^[21-22]。通常情况下,槲皮素型的黄酮类化合物味道非常苦^[23-24]。二氢槲皮素属黄酮醇类化合物,广泛地存在于植物天然产物之中^[24-25],而黄酮又是多酚类化合物中最的一种。植物体中多酚类化合物含量以及苦味的程度是受其内在基因和外在环境影响的^[24]。本研究发现宁夏西吉震湖乡野生苦味枸杞与宁杞 7 号鲜果两份样品质谱图及差谱的差别明显。其二级质谱主要离子碎片分子量 304.2626 与分子量 304.25 的二氢槲皮素高度吻合。因此初步判定,宁夏野生苦味枸杞苦味素成分为具有二氢槲皮素结构的黄酮类化合物。二氢槲皮素具有抗肿瘤、保护心功能、增加清除体内源性氧自由基的能力,还具有抗心血管系统疾病、改善脑部血液循环、抗血小板凝聚等作用。二氢槲皮素及槲皮素均具有中枢脑组织对抗 Cl^-/R 伤害之保护作用,但是二氢槲皮素的作用效果略优于槲皮素^[26-27]。到目前为止,除了本研究之外,尚未在枸杞化学成分中发现类似质荷比结构^[28-29]。本研究检测出的保留时间 65.493 min 处的一级质谱 $[M+H]^+$ 离子、分子量 585.5370 物质的化合物结构尚未确定。一般低分子量多酚类表现出苦味,如二氢槲皮素类黄酮,而高分子量多酚类表现出涩味^[24]。是否二氢槲皮素与高分子量(>500)多酚类,如植物

单宁等结合的化合物,还是其他物质,尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 王晓宇,陈鸿平. 中国枸杞属植物资源概述[J]. 中药与临床, 2011,2(5):1-3,50
- [2] 王亚军,安巍,石志刚,等. 枸杞药用价值的研究进展[J]. 安徽农业科学,2008,36(30):13213-13214,13218
- [3] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd Edition. New York: CSHL Press, Cold Spring Harbor, 2001
- [4] Bindler G, van der H R, Gunduz I, et al. A microsatellite marker based linkage map of tobacco [J]. Theor Appl Genet, 2007, 114:341-349
- [5] 李晓莺,张曦燕,焦恩宁,等. 不同枸杞品种授粉亲和性研究[J]. 宁夏农林科技,2014,55(8):12-13
- [6] 沈剑明,刘晓峰. 宁夏枸杞的花联合现象[J]. 西北植物学报, 1990(8):221-224
- [7] 王斯慧,黄琬凌,陈庆松,等. 芦丁、槲皮素对 α -淀粉酶抑制活性研究[J]. 食品与发酵科学,2012,48(3):34-37
- [8] 王斯慧,黄琬凌,陈庆松,等. 芦丁、槲皮素对 α -葡萄糖苷酶活性抑制研究[J]. 中国酿造,2012,31(1):133-135
- [9] 郭秀璞. BR 处理对小麦萌发生长及 α -淀粉酶活性的影响[J]. 麦类作物,1998,18(5):38-39
- [10] 明·李时珍. 本草纲目[M]. 王育杰,整理. 北京:人民卫生出版社,2005:1737-1738
- [11] 明·朱橚. 救荒本草校注[M]. 倪根金,校注. 北京:中国农业出版社,2008:23-24
- [12] 梁·陶弘景. 名医别录(辑校本)[M]. 集志钧,辑校. 北京:人民卫生出版社,1986:44-45
- [13] 梁·陶弘景. 本草经集注 [EB/OL]. [2016-12-01]. <http://bbs.zhong-yao.net/>
- [14] 张山雷. 藏府药式补正[M]. 上海:上海科学技术出版社出版,1958:131
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:232
- [16] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999
- [17] 徐国钧,何宏贤,徐珞珊,等. 中国药材学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1996:1157
- [18] 郝近大,黄璐琦. 中国中药材及原植(动)物彩色图谱[M]. 广州:广东科技出版社,2014:380
- [19] 卫生部药政管理局. 中药材手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1959:245
- [20] 河北省卫生厅、商业厅医药局. 河北药材[M]. 石家庄:河北人民出版社,1959
- [21] 刘晶晶. 苦味机理及苦味物质的研究概况[J]. 食品科技, 2006(8):21-24
- [22] 孙涓,余世春. 槲皮素的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2011,25(3):85-88
- [23] 郝晓霞. 苦味物质研究概况[J]. 黄冈师范学院学报,2008,28(S1):90-92
- [24] 李磊,周昇昇. 苦味植物化合物和苦味修饰剂的研究进展[J]. 食品工业,2014,35(6):213-217
- [25] 徐红艳,包怡红. 天然产物中二氢槲皮素分离纯化及发展趋势[J]. 食品与机械,2010,26(5):173-176
- [26] 张宏伟,郑伟. 二氢槲皮素的研究进展[J]. 口腔护理用品工业,2011,21(2):25-28
- [27] 王艳芳,王新华,朱宇同. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2003,15(2):171-173
- [28] 徐龙飞. 枸杞叶总黄酮的提取及其对染铅小鼠学习记忆的影响[D]. 兰州:兰州大学,2013
- [29] 钟建青,李波,贾琦,等. 天然黄酮类化合物及其衍生物的构效关系研究进展[J]. 药学报,2011,46(6):622-630