

软枣猕猴桃植株的过氧化物酶同工酶酶谱差异研究

王 宁¹, 杨玉红¹, 康宗利¹, 张春红², 刘长江²

(1. 沈阳农业大学 生物科学与技术学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:对软枣猕猴桃 7 个样品的过氧化物酶同工酶酶谱的差异进行了分析。结果表明:同工酶标记对软枣猕猴桃幼苗性别鉴定是有帮助的,但还需要继续加深此类研究才能更精确地进行幼苗性别鉴定,并对今后的研究重点和解决办法提出了建议。

关键词:软枣猕猴桃;过氧化物酶同工酶;聚丙烯酰胺凝胶电泳;酶谱;幼苗性别鉴定

中图分类号:S 663.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)04-0120-03

我国是猕猴桃的主要优势资源国和原产地,野生种群资源丰富^[1]。猕猴桃维生素 C 含量很高,具有极高的营养价值和药用价值,被称为“水果之王”;需求量正日益增大,具有极高的经济价值。其中,软枣猕猴桃是猕猴桃属中具有重要价值的种类之一,分布于东北、华北、西北及长江流域^[2],含有大量的维生素 C、维生素 B 族、氨基酸、类胡萝卜素等^[3],它抗虫、抗病害能力强,耐寒能力强,可在-8℃下安全越冬,软枣猕猴桃是猕猴桃品种改良的重要种质资源^[4]。猕猴桃以产果实为主,雌株经济价值明显要高于雄株,在栽培中合理选择雌雄个

体有助提高经济效益;猕猴桃成熟需要 3~5 a,童期漫长,雌雄异株和幼苗期雌雄无法辨别给猕猴桃的改良和育种带来巨大的困难。因此猕猴桃性别鉴定的研究在生产和遗传育种方面都有重要的意义。

同工酶标记是 20 世纪 60 年代出现的分子标记,其本质是具有同一底物专一性的不同分子形式,同工酶有组织、发育及物种的特异性,反映了编码这些酶的等位基因间的差异^[5],由于同工酶是分子水平的指标,是基因差异在表达水平的体现,在一定程度上可以反映出雌雄株间的本质差异,是植物性别鉴定的有效途径之一^[6],在猕猴桃性别鉴定中起着重要作用。例如,Hirsch 等^[7]较早发现中华猕猴桃花芽过氧化物酶同工酶谱带的雄性特有带;晁无疾^[8]在猕猴桃叶片中过氧化物酶同工酶酶谱上观察到了雄性植株特有的“性酶带”;王姝清等^[9]对猕猴桃雌雄植株叶片中过氧化物同工酶的电泳分析测定表明,雌雄植株间同工酶酶谱存在明显的差

第一作者简介:王宁(1985-),男,在读硕士,现主要从事生物化学与分子生物学研究工作。E-mail:wn101@sina.com。

责任作者:康宗利(1973-),男,博士,副教授,现主要从事植物生理与分子生物学研究工作。E-mail:kzlyangyuhong@163.com。

基金项目:农业部公益性行业科研专项资助项目(200903013)。

收稿日期:2011-10-28

Genetic Diversity Analysis on Second-generation Seed Orchard of *Pinus tabulaeformis* Carr. by RAPD Markers

WANG HU, FAN Jun-feng, YANG Pei-hua, LIU Yong-hong, LI Hui

(College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Genetic diversity and genetic differentiation of Second-generation Seed Orchard of *Pinus tabulaeformis* Carr. were analyzed by using random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker. To better understand their genetic diversity and further utilize them for breeding 120 samples were collected and analyzed using 15 screened RAPD primers. The results showed that the genetic diversity at species level was relatively high. The results showed that a total of 201 markers from 200 to 1 000 bp were generated and 152 of them(75.62%)were polymorphic markers. Shannon information index (I) was 0.4352 and Nei's gene diversity (H) was 0.3821. Using unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) were classified into 3 groups at level 0.15, result revealed an abundant genetic diversity of Second-generation Seed Orchard of *Pinus tabulaeformis* Carr.

Key words: *Pinus tabulaeformis* Carr.; second-generation seed orchard; RAPD; genetic diversities

异。但是,李存珍等^[10]运用同工酶分析法对中华猕猴桃性别进行早期鉴定,可惜未达到目的,结果无规律可循;丁士林等^[11]用美味猕猴桃幼叶为材料未发现其过氧化物酶同工酶谱带的差异,也未发现性别酶带;陈晓玲等^[12]分析了猕猴桃 6 个品种雌雄株的过氧化物酶及酯酶同工酶,没有发现性别特征带。由此可见,同工酶标记方法鉴定猕猴桃性别虽有成果但并不完善,尤其是猕猴桃幼苗性别鉴定尚处在起步阶段,还需要更多的试验来完善和支持,所以该试验通过对成年软枣猕猴桃雌雄株叶片和幼苗叶片的过氧化物酶同工酶电泳酶谱的分析,以期探求软枣猕猴桃幼苗性别早期鉴定的生化指标。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 名称为“1 号”的已结过果实的成年软枣猕猴桃雌株功能叶片;名称为“2 叶”的成年软枣猕猴桃雄株功能叶片;5 种软枣猕猴桃幼苗:“二叶”、“H1”、“F003”、“F6”、“F007”的功能叶片,其中已知“二叶”为雄性,其余 4 种性别未知。所有材料都采自沈阳农业大学软枣猕猴桃基地,材料做好标记后放入-80℃的超低温冰箱中备用。

1.1.2 主要仪器 电泳仪、凝胶成像系统为美国 Bio-Rad 公司生产;-80℃超低温冰箱为日本 Hitachi 公司生产;其余仪器有离心机、制冰机、冰箱等。

1.1.3 药品 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、四甲基乙二胺(TMED)、浓 HCl、联苯胺、甘氨酸、溴酚蓝、过硫酸胺(AP)、蔗糖、琼脂糖、冰醋酸、丙酮、H₂O₂等均来自于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 酶液提取 取 1 g 待测样品叶在冰浴的研钵中,加入 3 mL pH 6.7 Tris-HCl 缓冲液研磨匀浆转入离心管,5 000 r/min 离心 20 min,取上清溶液,于冰箱中保存备用供电泳分析。

1.2.2 点样 从提取的酶液中取 2 mL 与等量 40% 的蔗糖溶液混匀,再加 2 滴 0.1% 的溴酚蓝溶液,从此混合溶液中取 100 μL 加入点样槽中,点样顺序为“1 号”成叶、“2 叶”成叶、“二叶”幼叶、“H1”幼叶、“F003”幼叶、“F6”幼叶、“F007”幼叶。

1.2.3 电泳 采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶浓度为 7.5%,浓缩胶浓度为 3.75%,电极缓冲液为 pH 8.3 Tris-甘氨酸缓冲液,采用稳流电泳,先调电流至 30 mA,待样品由浓缩胶进入分离胶后,再调电流至 50 mA,当溴酚蓝距分离胶底 1 cm 时结束电泳。

1.2.4 染色 5 mL 联苯胺母液(联苯胺 1 g+冰醋酸 18 mL+蒸馏水 2 mL)、93 mL 蒸馏水、2 mL 5% H₂O₂,混匀后倒入盛有分离胶胶片的染色缸中^[13],见到的蓝色带就是过氧化物酶同工酶带,用蒸馏水冲洗胶片并照

相,可用 5% 的醋酸溶液保存胶片。

2 结果与分析

2.1 软枣猕猴桃雌雄株与幼苗的过氧化物酶同工酶酶谱差异

在该试验中,“1 号”成叶(雌)、“2 叶”成叶(雄)、“二叶”幼叶(雄)、“H1”幼叶、“F003”幼叶、“F6”幼叶、“F007”幼叶分别点样 2 次,为更明显地比较酶谱差异,从图 1 酶谱中可以发现所有样品均在最下面存在第 1 条或明或暗的共显性过氧化物酶同工酶带,在第 1 条共显性酶带的上方“2 叶”成叶、“F6”幼叶、“F007”幼叶 3 种样品存在第 2 条亮度不同的显性酶带,除此没有发现其它酶带的存在。

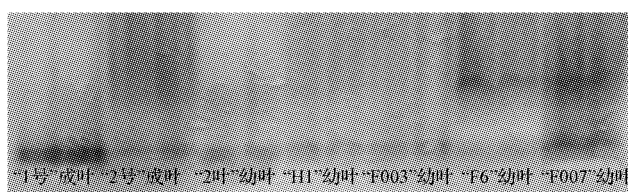


图 1 过氧化物酶同工酶电泳图谱

Fig. 1 Peroxidase isozyme electrophoretogram

2.1.1 从软枣猕猴桃性别角度来分析 “1 号”成叶第 1 条共显性酶带颜色最深,表明此酶在“1 号”雌性叶中表达量较“2 叶”雄性叶多,说明雌雄性软枣猕猴桃叶片在过氧化物酶同工酶第 1 条带表达的量是不同的;“2 叶”成叶表现出不明显的第 2 条显性酶带,而在“1 号”成叶中完全没有发现,说明此生长时间里雌雄叶片在第 2 条带的表达上是特异的。

2.1.2 从软枣猕猴桃生长时期角度来分析 第 1 条酶带同时出现在成叶和幼苗叶片中但颜色深浅不同,说明过氧化物酶同工酶第 1 条带在成株叶片和幼苗叶中都有表达;“2 叶”成株叶片表现出的第 2 条带没有在其幼苗叶片中出现,可能第 2 条带与生长发育时期和同工酶组织特异性有关。

2.1.3 从软枣猕猴桃不同品种角度来分析 所有幼苗叶片品种均有第 1 条共显性酶带,酶谱上酶带数量都不超过 2 条带,并且这些酶带迁移位置相同,原因可能是它们的亲缘关系非常近;“F6”幼叶和“F007”幼叶有第 2 条显性酶带而其它幼叶没有,“F6”幼叶第 1 条共显性酶带颜色最浅,说明不同品种软枣猕猴桃过氧化物酶同工酶的表达存在差异。

2.2 软枣猕猴桃幼苗的性别鉴定分析

在过氧化物酶同工酶酶谱上,性别未知的“H1”幼叶、“F003”幼叶与雌性“1 号”成叶酶带最为接近,性别未知的“F6”幼叶、“F007”幼叶与雄性“2 叶”成叶酶带最为接近,但是这些幼苗还需 3 a 后到达成年结果期才能确定其性别。

3 结论与讨论

该研究结果说明,同工酶标记对软枣猕猴桃幼苗性别鉴定是有帮助的,但还需要继续加深此类研究才能更精确地进行幼苗性别鉴定,软枣猕猴桃的雌雄株叶片及幼苗叶片的过氧化物酶同工酶酶谱存在差异,对幼苗性别鉴定可以起到帮助作用,但雌性分化时过氧化物酶同工酶检测和观察的最佳时期还没有确定,要进一步加强研究。所以提出今后的试验方向为:利用同工酶标记加深纵向和横向的研究,考虑到同工酶的表达与植物生长周期和组织特异性密切相关,为寻找到软枣猕猴桃幼苗雌性分化时同工酶变化最佳的检测和观察时期,要经常检测同工酶的变化,建立生长周期同工酶变化酶谱库。

具体是把多种确定性别的软枣猕猴桃组培苗按各自品种分成雌性组和雄性组,以生长时间为记录点,进行不同组织(根、茎和叶)的同工酶电泳检测与酶谱记录(如果试验的条件和幼苗的数量允许,那么检测的时间间隔越短越好),待幼苗成年后停止检测,这样就可以绘制出这些品种软枣猕猴桃雌雄株标准的不同组织生长周期同工酶变化酶谱,将这些酶谱组建成生长周期同工酶变化酶谱库。

酶谱库建立完成后,将所测品种的软枣猕猴桃按组织(根、茎和叶)分成雌性组群和雄性组群生长周期同工酶图谱,通过对比2个组群的酶谱确定出软枣猕猴桃幼苗不同组织的“性别酶带”和最佳性别检测时间。当遇到需检测性别的软枣猕猴桃幼苗时,待幼苗生长到最佳性别检测时期,检测其同工酶并观察“性别酶带”就可鉴定性别。

如果在酶谱库中没有找到软枣猕猴桃幼苗共同的

“性别酶带”,生长周期同工酶变化酶谱库仍然可以辨别那些在酶谱库中存在但性别不详的品种幼苗,并且还可根据酶谱来推测幼苗的生长时期。所以建立生长周期同工酶变化酶谱库对软枣猕猴桃和猕猴桃属植物的性别鉴定有指导意义。

参考文献

- [1] 黄宏文,龚俊杰,王圣梅,等. 猕猴桃属(*Actinidia*)植物的遗传多样性[J]. 生物多样性,2000,8(1):11-12.
- [2] 田新华,卢慧颖,吴捷. 软枣猕猴桃组织培养的研究[J]. 林业科学,2008,33(6):56-58.
- [3] 栾云峰,王菲,刘长江,等. 软枣猕猴桃总黄酮含量测定的方法研究[J]. 食品科学,2011,32(4):155-158.
- [4] 朱道坪,米银法,陈延惠,等. GFP基因在软枣猕猴桃愈伤组织原生质体中瞬间表达的初步研究[J]. 河南农业大学学报,2003,37(2):145-148.
- [5] 陈万秋,李思光,罗玉萍. 分子标记技术在猕猴桃属植物中的研究进展[J]. 江西科学,2001,19(3):162-165.
- [6] 邹春静,盛晓峰,韩文卿,等. 同工酶分析技术及其在植物研究中的应用[J]. 生态学杂志,2003,22(6):63-69.
- [7] Hirsch A M, Bligny D, Tripathi B K. Biochemical properties of tissue cultures from different organs of *Actinidia chinensis*[J]. Acta Hort, 1977, 78:75-82.
- [8] 晁无疾. 猕猴桃雌雄株间同工酶差异研究[J]. 中国果树,1987(2):42-45.
- [9] 王妹清,赵英琪,刘建朝,等. 猕猴桃雌雄植株过氧化物酶同工酶的研究[J]. 经济林研究,1989,7(2):30-33.
- [10] 李存珍,华鸿莺,徐敏珍. 同工酶鉴定中华猕猴桃性别的负结果报告[J]. 植物生理学通讯,1986(2):12-13.
- [11] 丁士林,朱秀珍,洪泽. 猕猴桃过氧化物同工酶研究[J]. 安徽农业大学学报,1997,24(4):395-397.
- [12] 陈晓玲,梁红,朱东华. 猕猴桃不同性别过氧化物酶及酯酶同工酶分析[J]. 农业与技术,2004,24(1):40-43.
- [13] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000.

Study on the Differences of Peroxidase Isozyme Electrophoretogram in Plants of *Actinidia arguta*

WANG Ning¹, YANG Yu-hong¹, KANG Zong-li¹, ZHANG Chun-hong², LIU Chang-jiang²

(1. College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: The electrophoretic analysis of peroxidase isozyme in seven samples of *Actinidia arguta* were studied in detail. The results showed that method of isozyme was helpful for sex identification of seedlings of *Actinidia arguta*, and more experiments should be run to identify gender accurately and precisely. Therefore, research priorities and a solution were proposed.

Key words: *Actinidia arguta*; peroxidase isozyme; olyacrylamide gel electrophoresis; lectrophoretogram; sex identification of seedlings