

罗汉果雌雄株同工酶性别鉴定研究

李惠敏¹, 黄夕洋^{1,2}, 高成伟¹, 秦新民^{1*}

(1. 广西师范大学 生命科学学院, 广西 桂林 541004; 2. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006)
中国科学院

摘要: 采用电泳技术结合同工酶染色, 分析了罗汉果雌雄株叶片的过氧化物酶同工酶、酯酶同工酶、超氧化物歧化酶同工酶、多酚氧化酶同工酶和过氧化氢酶同工酶。结果表明: 罗汉果雌雄叶片在同工酶谱上, 存在着与性别性状相关的酶带; 雌雄间的差异酶带在每一种同工酶中均有一条以上, 可作为罗汉果雌雄株间的性别鉴定。此外, 还比较高产、低产、不结果雌株之间同工酶的酶带和活性差别。

关键词: 罗汉果; 性别性状; 同工酶; 雌雄株

中图分类号: Q946.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)05-0792-04

Sex identification of *Siraidia grosvenorii* by isozyme analysis

LI Hui-Min¹, HUANG Xi-Yang^{1,2}, GAO Cheng-Wei¹, QIN Xin-Min^{1*}

(1. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China; 2. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

Abstract: The peroxidase, esterase, superoxide dismutase, polyphenol oxidase and catalase isozyme of *Siraidia grosvenorii* were analyzed with vertical slab PAGE and specific cytochemical staining. The results showed that isozyme bands have apparent difference between the male and female plant. The number of different band of sex character was above one in each isozyme. It is concluded that the difference on isozyme bands can be used for sex identification of *Siraidia grosvenorii*. In addition, the isozyme bands and enzyme activity of high yield female plant, low yield female plant and acarpous female plant were compared.

Key words: *Siraidia grosvenorii*; sex character; isozyme; male and female plant

罗汉果(*Siraidia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey)雌雄异株, 为广西的特有植物, 也是一种具有很高经济价值和良好发展前景的经济作物。但是罗汉果雌、雄株从生长到开花期需要一定的时间, 植株在开花前没有明显的差异, 对于罗汉果等以果实为收获对象的作物, 较多的雌花是获得高产的基础。因此罗汉果植株性别的早期鉴定在理论和生产实践上都具有重要的意义。

同工酶的概念早在 1895 年就由 Fischer 提出, 但是直到 20 世纪 50 年代后, Hunter 及 Markert 发

明了酶谱技术, 才促进了世界各国学者对同工酶的广泛研究。在利用同工酶进行植物雌雄株的鉴定方面, Penel 等(1972)和 Petig 等(1972)分别报道了与菠菜和黄瓜性别有关的同工酶研究结果, 其后, 国内在猕猴桃、葡萄、黄瓜、石刁柏和华中五味子等植物雌雄性的同工酶鉴定也有报道(陈晓玲等, 2004; 张立平等, 1998; 艾辛等, 2000; 范双喜等, 1995; 袁仕禄等, 1999)。本研究以罗汉果雌、雄植株的叶片为实验材料, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳结合同工酶染色分析其在过氧化物酶同工酶(POD)、酯

收稿日期: 2006-04-10 修回日期: 2006-10-15

基金项目: 广西科技攻关项目(0228019-2); 广西师范大学科研基金[Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangxi (0228019-2); Scientific Research Foundation of Guangxi Normal University]

作者简介: 李惠敏(1978-), 女, 广西北流人, 硕士, 讲师, 主要从事分子生物学研究。

* 通讯作者(Author for correspondence)

酶同工酶(EST)、超氧化物歧化酶同工酶(SOD)、多酚氧化酶同工酶(PPO)和过氧化氢酶同工酶(CAT)之间的差异,旨在找出与罗汉果雌、雄株性别相关的特异性同工酶谱带,为罗汉果性别的早期鉴定及野外标本的雌、雄株鉴别提供依据。同时,也希望找出与雌株结果数量相关的同工酶标记,为罗汉果高产单株的鉴别提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

雌雄株同工酶的比较为罗汉果(青皮果品种)幼苗的雌、雄株成熟叶片。高产、低产和不结果雌株之间的分析以结果后期植株的成熟叶片为材料(青皮果品种)。

1.2 酶液的制备

分别称取 1 g 叶片样品,置于预冷的研钵中,过氧化物酶同工酶提取按质量体积比 1 : 10,其余 4 种同工酶提取按质量体积比 1 : 3 加入 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0),并加入少许石英砂,冰浴研磨成匀浆,4℃静置 5~10 min,然后于 4℃,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液即为酶液。所有取样重复 3 次。

1.3 凝胶电泳

采用垂直板状不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶及浓缩胶的浓度分别为 7.5%(pH8.9)和 4%(pH6.8),电极缓冲液为 Tris-甘氨酸(pH8.3),凝胶大小为 13 cm×11 cm×0.1 cm。过氧化物酶上样量为 15 μL,酯酶、超氧化物歧化酶、多酚氧化酶、过氧化氢酶上样量均为 60 μL,4℃条件下电泳,浓缩胶电压为 80 V,分离胶电压为 200 V,电泳时间约 3 h。

1.4 同工酶染色

过氧化物酶同工酶染色采用醋酸-联苯胺法,酯酶同工酶采用 α-醋酸萘酯、β-醋酸萘酯和固蓝盐

B 染色(李惠敏等,2004;刘东旭等,1995);超氧化物歧化酶同工酶染色参照 Beauchamp 等(1971)的负染法;多酚氧化酶同工酶采用邻苯二酚-对苯二胺染色(高丽锋等,1997);过氧化氢酶同工酶染色采用铁染色法(董泗建等,1996)。

凝胶进行染色后,用 7%醋酸保存并拍照,所有样品重复实验 3 次,根据 Rf 值(同工酶带迁移距离/溴酚蓝指示剂迁移距离)绘出各酶谱图并记录各酶带的活性度。活性度按酶带显示程度分为 5 个等级:最强带>次强带>中强带>较强带>强带>弱带;用符号依次表示为+++++,++++,++++,+++,,+,-。

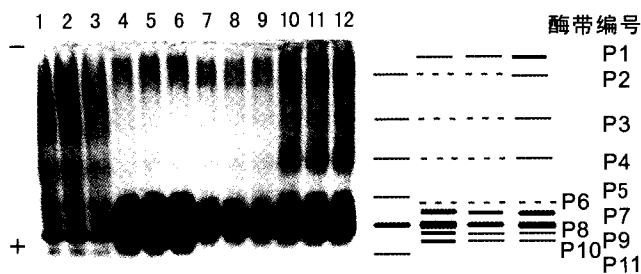


图 1 罗汉果过氧化物酶同工酶图谱
Fig.1 Peroxidase isozyme pattern of *S. grosvenorii* in PAGE

最强带>次强带>中强带>较强带>强带>弱带。1,2,3 为雄株;4,5,6 为高产雌株;7,8,9 为低产雌株;10,11,12 为不结果雌株。下同。
1,2,3: ♂; 4,5,6: high yield ♀; 7,8,9: low yield ♀; 10,11,12: acarpous ♀. The same as follows.

2 结果分析

2.1 过氧化物酶同工酶分析

在罗汉果叶中,POD 同工酶含量最高,活力也很强,雌、雄株间及不同种类雌株间的活力显示出较

表 1 罗汉果雌雄株 POD 同工酶的迁移率
Table 1 Rf of POD isozyme of male and female plant

酶带编号 No.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
Rf♂		0.107	0.256	0.395	0.537			0.611			0.693
Rf♀	0.056	0.107	0.256	0.395		0.548	0.571	0.611	0.637	0.661	

为明显的差异。其同工酶图谱、各酶带的迁移率 Rf 值和 3 种类型雌株的酶带活性度分别见图 1、表 1 和表 2。

从图 1 可以看到,罗汉果雄性植株只有第 2、3、

4、5、8、11 条酶带,其中雄株的特异酶带是 P5 和 P11;而雌性植株的酶带为 P1、P2、P3、P4、P6、P7、P8、P9、P10,其中 P1、P6、P7、P9、P10 这 5 条带是雌株的特异酶带。雌、雄株的共有酶带是第 2、3、4、8

表 2 三种类型雌株的 POD 同工酶酶带的活性度
Table 2 Activity of POD isozyme of three kinds of female plant

酶带编号 No.	P1	P2	P3	P4	P6	P7	P8	P9	P10
A _H ¹	+	-	-	-	-	++++	+++++	++	++
A _L	+	-	-	-	-	++	+++	+	+
A _N	++	+	+	+	-	+++	++++	+	+

注: A 为活性度,下同。 Note: A represent activity

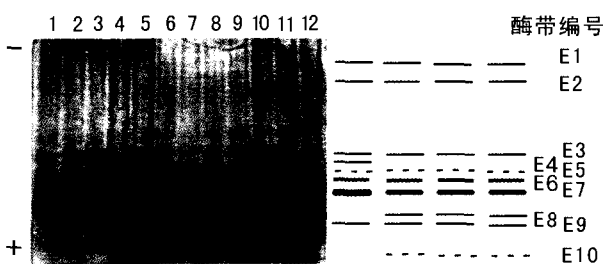


图 2 罗汉果酯酶同工酶图谱
Fig. 2 Esterase isozyme pattern of *S. grosvenorii* in PAGE

条,共有带的迁移率见表 1。

从酶带的活性度上看,雌株的整体活力较雄株强。在三种不同类型的雌株中,高产雌株、低产雌株

表 3 罗汉果雌雄株 EST 同工酶的迁移率
Table 3 Rf of EST isozyme of male and female plant

酶带编号 No.	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
Rf _♂	0.127	0.181	0.495	0.524	0.566	0.605	0.633		0.764	
Rf _♀	0.127	0.181	0.495		0.566	0.605	0.633	0.719	0.764	0.934

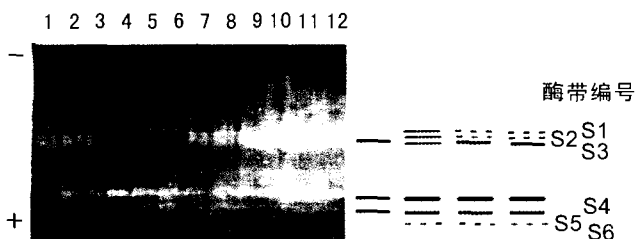


图 3 罗汉果超氧化物歧化酶同工酶图谱
Fig. 3 Superoxide dismutase isozyme pattern of *S. grosvenorii* in PAGE

应酶带的迁移率和活性度分别见表 4 和表 5。从图 3 中可看出,雄株仅有 S3、S4、S5 三条带,而雌株除了具有与雄株相同的 S3、S4、S5 三条带外,还有 S1、S2、S6 特有带。高产雌株与低产雌株、不结果雌株的酶带活力主要差异在第 1、2 条上,高产雌株的

和不结果雌株在酶的活性上有较大的差异(图 1,表 2)。P1、P2、P3、P4 条,高产雌株和低产雌株的活力一样,而不结果雌株的活力均比它们强;高产雌株则在 P7~P10 酶带是最强的。

2.2 酯酶同工酶分析

从 EST 酶谱(图 2)可以看出,3 种雌性材料具有完全相同的酶带: E1、E2、E3、E5、E6、E7、E8、E9 和 E10(迁移率见表 3)。而雌、雄植株酶谱之间存在明显差别。E4 为雄性株的特异带, Rf 值为 0.524; E8 和 E10 是雌性植株的特异带, Rf 值分别为 0.719 和 0.934。

2.3 超氧化物歧化酶同工酶分析

罗汉果 SOD 同工酶分析结果表明,叶片的 SOD 同工酶在雌、雄株之间也存在着明显差别(图 3)。相

S1、S2 酶带活性程度强,而低产雌株和不结果雌株的活性则弱。

表 4 罗汉果雌雄株 SOD 同工酶的迁移率
Table 4 Rf of SOD isozyme of male and female plant

酶带编号 No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Rf _♂			0.416	0.666	0.716	
Rf _♀	0.375	0.390	0.416	0.666	0.716	0.781

表 5 三种类型雌株的 SOD 同工酶酶带的活性度
Table 5 Activity of SOD isozyme of three kinds of female plant

酶带编号 No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6
A _H ¹	+	+	+	+++	++	-
A _L	-	-	++	+++	++	-
A _N	-	-	++	+++	++	-

2.4 多酚氧化酶同工酶分析

在 PPO 同工酶图谱(图 4)中,雄性植株的 PPO 图谱较为简单,仅有 2 条酶带(O3、O4),而雌性植株

具有 7 条酶带(O1~O7, 迁移率见表 6), 其中 O3 和 O4 带与雄性植株共有。

2.5 过氧化氢酶同工酶分析

CAT 同工酶酶谱(图 5)表明, 雌株和雄株之间存在明显差别, 雄株仅有 C3 和 C4 二条带, 其中 C3 为雄株特有, 而雌株的特异带为 C1 和 C2。在酶的活性上, 三种雌性材料的 CAT 活性在酶带图谱上没有明显差别。

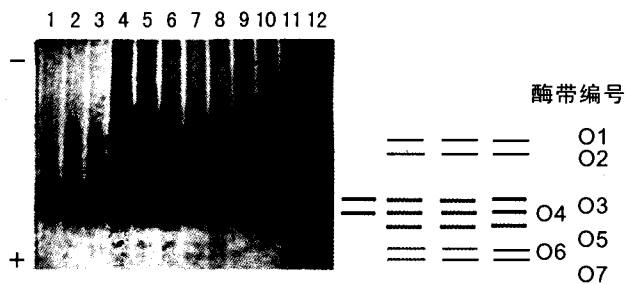


图 4 罗汉果多酚氧化酶同工酶图谱

Fig. 4 Polyphenol oxidase isozyme pattern of *S. grosvenorii* in PAGE

表 6 罗汉果雌雄株 PPO 同工酶的迁移率

Table 6 Rf of PPO isozyme of male and female plant

酶带编号 No.	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7
Rf♂			0.566	0.626			
Rf♀	0.399	0.434	0.566	0.626	0.667	0.761	0.799

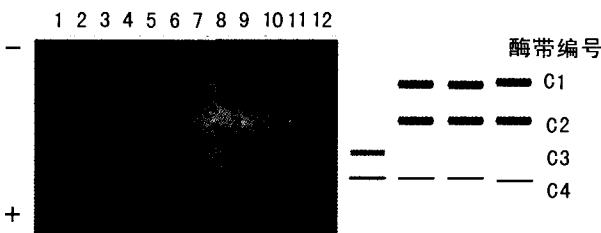


图 5 罗汉果过氧化氢酶同工酶图谱

Fig. 5 Catalase isozyme pattern of *S. grosvenorii* in PAGE

3 讨论

在植物雌、雄性别的鉴定和分化机理的研究中, 同工酶标记是常用的一种研究手段。由于酶是基因表达的直接产物, 不同组织器官的同工酶谱特异性也反映了基因表达的特异性, 所以同工酶技术是一

种有效的手段, 可用于鉴别许多在开花前从外部形态上难以鉴别雌雄的植物(董莉娜等, 2006; 李瑞丽等, 2006)。

表 7 罗汉果雌雄株 CAT 同工酶的迁移率

Table 7 Rf of CAT isozyme of male and female plant

酶带编号 No.	C1	C2	C3	C4
Rf♂		0.316		
Rf♀	0.135	0.244		0.408

本研究对罗汉果雌、雄植株之间的 POD、EST、CAT、SOD 和 PPO 同工酶谱进行了比较, 雌、雄株在上述 5 种同工酶的酶谱上都有明显的区别。特别是 CAT、SOD 和 PPO 同工酶酶谱较为简单, 容易辨认, 可作为罗汉果雌、雄株鉴别的指标。罗汉果雌株的特异带比较多, 在 POD 有 P1、P6、P7、P9、P10, EST 中为 E8、E10, SOD 中是 S1、S2、S6, PPO 中有 O1、O2、O5、O6、O7, CAT 中有 C1、C2。这些差异带也可作为罗汉果雌、雄植株的鉴定依据。

除了在雌、雄性别鉴定研究外, 本研究还发现高产雌株、低产雌株、不结果雌株在所研究的 5 种同工酶中, 其酶谱相同, 仅在活力上有所差别。如 POD 酶谱中, 高产雌株的 P7~P10 带最强, SOD 酶谱中, 高产雌株的 S1、S2 酶带活性程度强, 而低产雌株和不结果雌株的活性则弱。但这些酶谱活性程度的不同还难以作为罗汉果产量的明显标记, 故罗汉果高产植株的的鉴定还需利用其他分子标记进行分析。

参考文献:

Ai X(艾辛), Zhu LL(祝莉莉), Shu LH(舒理惠), et al. 2000. Correlation of sex expression and three oxidase isozyme in cucumber plant(*Cucumis sativus*) (黄瓜植株性别表现与 3 种氧化酶同工酶的关系)[J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 18(3):187-188

Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. *Ann Biochem*, 44:276-287

Chen XL(陈晓玲), Liang H(梁红), Zhu DH(朱东华). 2004. Analysis of Est and Pox isozyme in the sex of *Actinidia* (猕猴桃不同性别过氧化物酶及酯酶同工酶分析)[J]. *Agric Tech* (农业与技术), 24(1):40-43

Dong LN(董莉娜), Su X(苏雪), Zhang K(张昆), et al. 2006. Application of DNA molecular markers on sex identification of dioecious plants(DNA 分子标记在雌雄异株植物性别鉴定中的应用)[J]. *Guihaia* (广西植物), 26(1):63-68

Dong SJ(董泗建), Liu CL(刘昌玲). 1996. An iron staining method for determination of catalase activity(一种鉴定过氧化氢酶同工酶活性的铁染色法)[J]. *Progress in Biochemistry* (下转第 672 页 Continue on page 672)

伏雄等(1997)报道的结果不尽一致,其观察材料采自广东连州。两者的主要区别在于:前者花粉具3拟孔沟,具沟膜,膜上有数量较多的、粗的颗粒;后者花粉具3拟孔沟,具沟膜,膜上有稀疏的、细的颗粒。结果表明不同居群的报春苣苔在花粉形态上存在着一些差异和分化。笔者在对采自湖南江华、广东连州的报春苣苔花部结构进行的初步研究中也发现一些差异:湖南居群的叶较厚;花较大,花冠呈较深紫红色;花药位置较低,距离花冠筒基部约1 mm;花盘由几枚连成环状的腺体组成。而广东居群则叶较薄;花较小,花冠呈浅紫红色,花药位置较高,距离花冠筒基部约2 mm;花盘明显为2近方形腺体组成。这些报春苣苔不同居群的分布区彼此相距上百千米,初步推测可能是由于地理隔离的原因而引起上述差异和分化。

中国科学院昆明植物研究所韦仲新研究员的热情帮助和悉心指导,广西植物研究所韦毅刚先生提供部分实验材料,中国科学院植物研究所肖荫厚工程师在技术上给予许多有益的帮助,在此谨致谢意!

参考文献:

- 王文采. 1990. 中国植物志(69)——苦苣苔科[M]. 北京:科学出版社:125—581
- 王文采. 1983. 苦苣苔科三新属[C]. 植物学集刊,1(1):15—24
- 王伏雄,钱南芬,张玉龙,等. 1997. 中国植物花粉形态[M]. 第2版. 北京:科学出版社:5—10,204—206
- 韦仲新. 2003. 种子植物花粉电镜图志[M]. 昆明:云南科技出版社:1—5
- 李振宇,王印政. 2004. 中国苦苣苔科植物[M]. 郑州:河南科学技术出版社:475—476
- Cao M(曹明),Lin CR(林春蕊),Tang SC(唐赛春),et al. 2003. Pollen morphology of some species of Gesneriaceae from Guangxi (广西苦苣苔科植物花粉形态)[J]. *Guihaia*(广西植物),23(2):139—142
- Erdtman G. 1952. Pollen morphology and plant taxonomy; angiosperms[M]. Stockholm:Almqvist & Wiksell
- Erdtman G. 1969. Handbook of palynology—an introduction to the study of pollen grains and spore[M]. Copenhagen:Munksgaard
- Luegmayer E. 1993. Pollen characters of Old World Gesneriaceae (Cytandroideae), with special reference to SE Asian taxa[J]. *Grana*,32:221—232
- Wang WT(王文采). 1984. Duo Genera Nova Gesneriacearum E Sina Australi(华南苦苣苔科二新属)[J]. *Acta Phytotaxon Sin*(植物分类报),22(3):185—190

(上接第795页 Continue from page 795)

- and *Biophysics*(生物化学与生物物理进展),23(1):86—88
- Fan SX(范双喜),Song XF(宋学锋). 1995. Relationship between sex and isozymes of peroxidase in *Asparagus* plants(石刁柏性别表现与同工酶的关系)[J]. *Acta Agric Boreall-Sin*(华北农学报),10(2):67—71
- Gao LF(高丽锋),Li CX(李彩霞),Mao X(毛雪),et al. 1997. An analysis of polyphenol oxidase isozymes between resistant and susceptible cotton varieties to Cotton Aphid(棉花不同抗、感蚜虫品种的多酚氧化酶同工酶分析)[J]. *J Shanxi Agric Univ*(山西农业大学学报),17(3):229—231
- Li RL(李瑞丽),Lu LD(卢龙斗),Gao WJ(高武军),et al. 2006. Advances in sex identification of dioecious plant(雌雄异株植物性别鉴定的研究进展)[J]. *Guihaia*(广西植物),26(4):387—391
- Li HM(李惠敏),Qin XM(秦新民). 2004. The analysis on pollen isozymes of *Citrus grandis* var. *shatinyu*(沙田柚花粉萌发前后同工酶分析)[J]. *J Guangxi Normal Univ(Nat Sci)*(广西师范大学学报自然科学版),22(3):85—90
- Liu DX(刘东旭),Li ZX(李子先). 1995. Studies on the characteristic bands of esterase in the leaf blades of rice and the possibility of identifying interspecific hybrids using them as biochemical markers(水稻叶片酯酶同工酶特征酶带鉴定远缘杂种的研
- 究)[J]. *J Southwest Agric Univ*(西南农业大学学报),17(5):386—390
- Lou QF(娄群峰),Yu JZ(余纪柱),Chen JF(陈劲枫),et al. 2002. Studies on genetic bases and markers of sex differentiation in plants(植物性别分化的遗传基础与标记物研究)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报),19(6):684—691
- Penel Ci, Greppin H. 1972. Evolution of the auxin-oxidase and peroxidase activity during the spinach's photoperiodic induction and sexualisation[J]. *Plant Cell Physiol*,13(1):151—156
- Petig N, Rudich J. 1972. Peroxidase and IAA oxidase activity and isoenzyme patterns in cucumber plants as affected by sex expression and ethephon[J]. *Physiol Plant*,27:156—160
- Yuan SL(袁仕禄),Jia WG(贾卫国),Zhan JR(战景仁),et al. 1999. Sexing of *Schisandra sphenanthera* Rehd & Wils by isozyme preoxidase(华中五味子雌雄株过氧化物酶同工酶性别鉴定研究)[J]. *J Northeast Agric Univ*(东北农业大学学报),30(2):195—198
- Zhang LP(张立平),Lin BN(林伯年),Shen DX(沈德绪). 1998. The study on sexual distinction of dioecism in *Vitis*(雌雄异株葡萄的性别鉴定研究)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报),15(4):63—67