

大豆灰斑病菌生理小种的同工酶鉴定^{*}

袁凤杰 徐金星 杨庆凯

(东北农业大学 哈尔滨 150030)

摘 要

本文分析了黑龙江省大豆灰斑病菌 10 个生理小种的 5 种同工酶图谱。结果表明,不同小种同工酶酶谱间存在明显的差异,具表型异质性。将同工酶谱进行编码分析,表明在 5 种同工酶酶谱中 4 5 8 号生理小种各具有独特的谱带编码,可将其作为该小种的特征谱带,其中 4 号小种表现尤为特别,说明其具有独特的遗传背景,建议建立大豆灰斑病菌生理小种同工酶酶谱标准码,为大豆灰斑病菌生理小种的鉴定工作提供一辅助性手段。

关键词 大豆灰斑病菌;同工酶;生理小种

大豆灰斑病主要发生流行于黑龙江省,它的发生给大豆生产带来严重的危害。目前对该病菌生理小种分化、生物学特性、流行规律、侵染机制等^[7 8 9 10]前人已作了大量研究。现将大豆灰斑病菌共 10 个生理小种,具有分化快、变异程度高的特点。大豆灰斑病菌新的小种的出现将导致生产上抗性品种抗性的丧失,进而导致灰斑病的大流行,因此灰斑病菌生理小种的鉴定、预测栽培品种抗性的变化是合理利用抗病品种,控制病害危害的前提^[11]。

目前对大豆灰斑病生理小种的鉴定仍采用鉴别寄主的方法进行毒力鉴定。由于该方法操作繁琐,工作量大,周期长以及接种条件和调查标准不易掌握等缺陷,不能满足生产上通过品种布局控制病害危害的需要。因此探索生理小种鉴定的新方法是大豆灰斑病菌生理分化研究的新课题。本文针对以上问题,运用简单、易行、廉价的同工酶技术对大豆灰斑病菌的酯酶等 5 种同工酶进行了研究,比较了大豆灰斑病菌生理小种间的生理生化差异,为大豆灰斑病菌生理小种的鉴定探索一辅助性手段。

材料和方法

1 菌种:黑龙江省农科院合江农科所提供大豆灰斑病菌 1-10 号生理小种,保存于 PDA 培养基中。

^{*} 袁凤杰现在浙江省农业科学院大豆组工作。

2 样品制备:将冰箱内保存的菌种,于 PDA斜面上,25–28℃黑暗条件下培养 10 天。取菌丝体,蒸馏水冲洗,吸水纸吸干。取 1g 菌丝体放入研钵中,按 1:2(g/ml)加入 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH=7.0) 及少许石英砂。放冰箱过夜。第二天冰浴研磨成匀浆,8000–10000rpm 离心 30 分钟,取上清液放冰箱备用,并调节浓度一致。

3 电泳:采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳。分离胶浓度为 7.5% pH8.9,浓缩胶为 3% pH6.7, Tris-甘氨酸缓冲系统电极缓冲液为 pH8.3。胶板规格为 170×170×1.5mm³,每样品点样量为 50ul,重复两次,电泳在 4℃ 冰箱内进行。浓缩胶内电流 20mA,分离胶内电流为 35mA。

4 凝胶染色:电泳完毕后,将凝胶剥离胶板,洗去杂质,在染色液中,进行特异性染色。待到酶带清晰后,放入固定液,照相后制成干板保存。

4.1 酯酶 称取 α-醋酸萘酯及 β-醋酸萘酯各 33.33mg, 坚固兰盐 66.66mg,溶于少许丙酮中,加入 pH6 的磷酸缓冲液 100ml,充分混匀。胶板经蒸馏水冲洗后加入上述染色液,37℃ 染色 30 分钟,至出现棕红色酶带后水洗,照相后制成干板永久保存。

4.2 过氧化氢酶 其染色液配方参见植物遗传育种与同工酶^[1]。

4.3 酸性磷酸酯酶 其染色方法参见同工酶技术及应用^[2]。

4.4 多酚氧化酶 称取 2.022g 邻苯二酚和 0.1g 对苯二胺,溶于 100ml 水中。胶板用蒸馏水漂洗后加入染色液,待出现黑色酶带后,用醋酸脱去胶板杂色,照相后制成干板保存。

4.5 淀粉酶 其染色方法参见同工酶技术及应用^[2]。

结果与分析

对黑龙江省 10 个灰斑病菌生理小种进行同工酶分析,多次实验结果具有主酶带稳定,不同生理小种同工酶谱差异明显的特点。说明鉴别寄主鉴定出的生理小种在遗传背景上是不同的,其中 4 号小种表现尤为突出。

1 同工酶图谱分析

1.1 酯酶 (EST) 大豆灰斑病菌酯酶谱带数为 6–9 条。所有生理小种均具有 Rf 值分别为 0.1 0.19 0.28 0.45 0.48 0.50 0.71 的基本酶带。若将酯酶图谱划分为 A B C 3 个区域,可看到生理小种间的差异主要集中在 B 区内。其中 4 号小种独具 Rf 为 0.32 0.53 的谱带,7 号小种缺失 Rf 为 0.48 的谱带,同时 B C 区内存在有弱酶带的不同,表现为多样性。

1.2 过氧化氢酶 (CAT) 灰斑病菌生理小种具有 1–2 条酶带。除 4 号小种外其它均具有 Rf 值为 0.30 的主特征谱带。此外,5 6 7 8 9 号小种另具 Rf 为 0.33 的特征带,而 4 号小种不具备以上两种谱带。从电泳结果看,它仅在 Rf 为 0.47 处具有一条明显清晰的谱带。

1.3 淀粉酶 灰斑菌各生理小种均具有 1–3 条酶谱。1–10 号在 Rf 0.58 处共具一条特征谱带。8 9 号小种在 Rf 0.66 处各具一条酶带,而 8 号小种在 Rf 0.63 处还隐约可见一条酶带,这有别于其它生理小种。5 8 号小种缺失 Rf 为 0.13 的谱带,此外 1 2 6 7 号

小种具有 Rf 为 0.26 的谱带。

1.4 多酚氧化酶 (ppo) 所有灰斑菌生理小种均具有 2 条酶谱。除 4 号生理小种外, 其余小种均具有 2 条 Rf 值为 0.40 和 0.33 的酶带。在 Rf 值为 0.33 处 7 8 9 号小种较其它小种色浅带窄, 说明其活性较弱。同样 Rf 0.40 处 5 6 7 号小种表现出酶活性强, 而其它小种较之则表现为弱酶带。4 号小种在 Rf 0.43 0.33 处具有两条酶带。

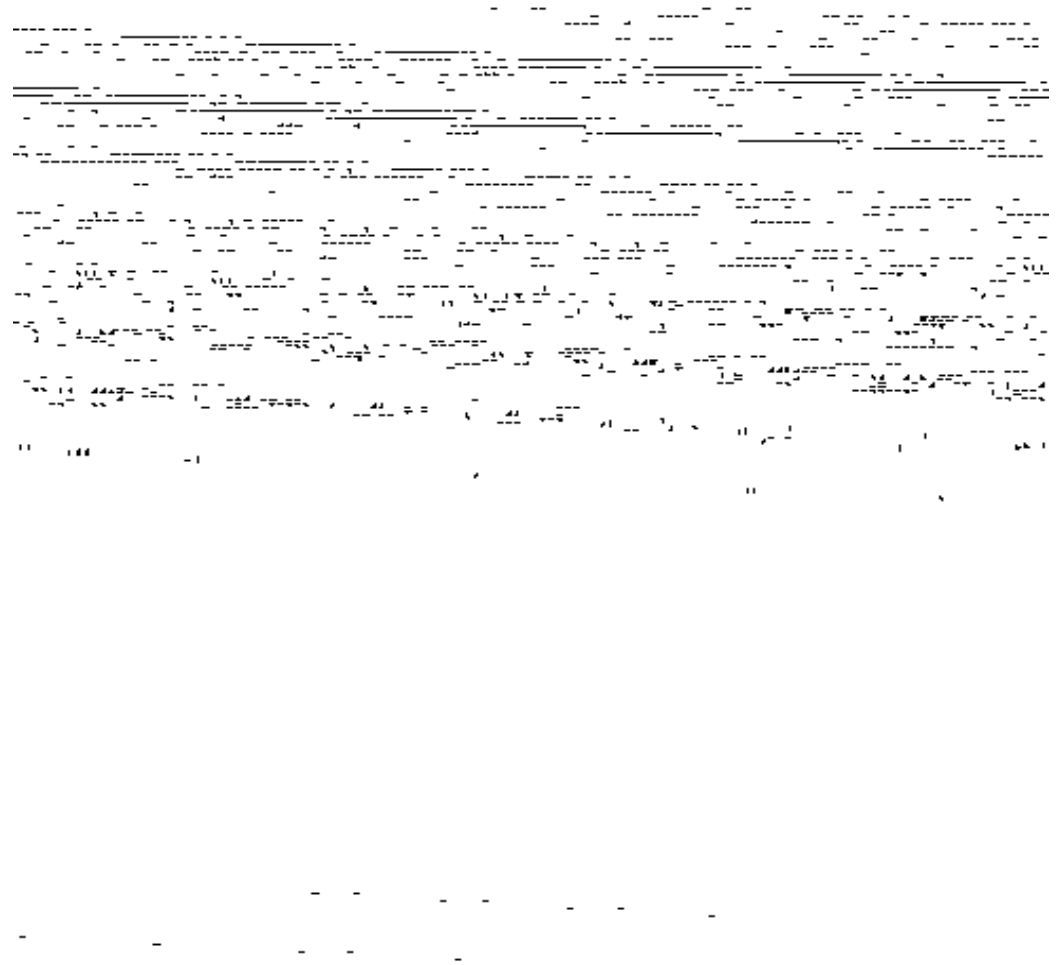


图 1 A 大豆灰斑病菌酯酶图谱 (右起 1- 10 号) B 大豆灰斑病菌多酚氧化酶图谱 (左起 1- 10 号)
C 大豆灰斑病菌酸性磷酸酯酶图谱 (左起 1- 10 号; 2 条酶带为 1 个小种)

Fig. 1 A Esterase bands of *Cercospora sojina* Hara B Polyphenol oxidase bands of *Cercospora sojina* Hara C Acid phosphatase bands of *Cercospora sojina* Hara

1.5 (ACP) 酸性磷酸酯酶各小种谱带比较一致, 2 号小种颜色深酶活性较强, 4 号小种颜色最浅, 所有小种均具有 3 条颜色深浅不同的谱带。

在本文中, 由于淀粉酶和多酚氧化酶染色后在空气中极易褪色, 照相过程中颜色变化很快, 因此照片效果不好, 仅将其绘成图谱。

2 大豆灰斑病菌凝胶谱带编码与小种的鉴定

大豆灰斑病菌的 5种同工酶谱带采用四位体编码,酶谱编码从正极到负极排列。酶谱中各酶带的 Rf值区别于小数点后的两位数,因此取这两位数作为酶带编码的前两位数,第三位表示酶带的颜色,第四位表示酶带的宽度,其中缺失的谱带用零来补齐。

表 1 大豆灰斑病菌同工酶酶谱编码表

Table 1 Code of isozyme band of *Cercospora Sojina* Hara

小种	淀粉酶	多酚氧化酶	酸性磷酸酯酶	过氧化氢酶
1	58422611343	000040423343	7242424338220000	00003032
2	584226111343	000040423343	7242424338430000	00003032
3	584200001323	000040433343	7243424338430000	00003042
4	584200001343	000043323311	7233422238220000	47420000
5	584200000000	000040433343	7232422238320000	33323042
6	584226111343	000040433343	7222422238220000	33323032
7	584226111343	000040433342	7222423238330000	33423042
8	664263425842	000040423342	7222423238220000	33423042
9	664258421343	000040423342	7222422238220000	33423042
10	584200001343	000040233343	7222422238330000	00003032
酯酶				
1	714300005032482245320000284219111043			
2	714300005032482245320000284219111043			
3	714300005043483245430000284219111043			
4	714351325043483245323232284219111033			
5	714300005032482245330000284219111043			
6	714300005043484245430000284219111043			
7	714300005032000045320000284219111033			
8	714300005043483245330000284219111043			
9	714300005033482245220000284219111043			
10	714300005043483245430000284219111043			

在上表中每一个四位数即表示一条谱带,第三位数表示谱带颜色,其中 4表示色深,3表示较深,2表示浅色,1表示细浅。第四位数表示谱带的宽窄,其中 3表示宽,2表示较宽,1表示窄。

从上表结果看出 5号、8号生理小种在淀粉酶谱中的编码分别为 584200000000和 664263425842,5号小种仅具有一条代号为 5842的谱带,而 8号小种编码远远大于其它小种,说明其谱带具有独特的迁移率。因此淀粉酶谱可作为鉴别 5 8号小种的特征酶谱。

4号小种在酯酶中的编码为 714351325043483245323232284219111043,在所有的同工酶酶谱中具有最多的数字码,也说明其具有最多的谱带数。其中两条谱带为自身所特有,因此酯酶酶谱可作为鉴定 4号小种的特征酶谱。4号小种在过氧化氢酶谱中的编码

47420000也明显有别于其它小种,但鉴于过氧化氢在染色后酶谱在空气中极易退色不宜保存等缺点,建议将其作为辅助和参考酶谱。

在5种同工酶谱中,除458三个小种具有独特而明显的同工酶酶带外,其它小种之间在谱带宽度、颜色深浅以及谱带有无上也各具其自身特点。7号小种在酯酶中缺失一条谱带,12310号小种在过氧化氢酶中缺失一条谱带,9号小种在淀粉酶中同8号小种一样具有一条区别于其它小种的谱带。

讨 论

大豆灰斑病菌具有明显的生理分化现象。开展对大豆灰斑病菌生理小种的研究,对大豆品种在生产上的应用具有实际意义^[9]。目前我国科研和生产上采用的大豆灰斑病菌生理小种划分系统仍为霍红、黄桂潮等1988年所建立,所采用的鉴别品种均非当前栽培品种,已不能满足生产上抗病育种的需要。另外鉴别寄主鉴定生理小种的方法受外界环境因素、人为因素影响大。据此我们将易行、简单的同工酶技术应用到灰斑病菌生理小种的鉴定中来。在应用同工酶鉴别真菌方面,国内外已作了大量研究报道,结果一致认为同工酶在真菌种间分类上差异稳定区别明显,而在种内分类鉴定上存在分歧,不同材料具有不同的结果^[11]。就本文研究的结果看,灰斑病菌生理小种在同工酶表现型上存在差异,这种差异在某种程度上可作为小种划分与鉴定的参考,控制这些酶谱的基因是否与控制毒性的基因相连锁尚有待进一步研究。

此外,同工酶技术鉴定生理小种,在实验操作条件、染色方法及菌体培养时间上必须完全一致,保证同工酶谱带的差异准确、真实地反应不同材料间的差异。同工酶谱带在理论上应为某一分子量的酶,但由于电泳精确度的影响以及染色中底物专一性的影响,一条酶带可能是几种酶的混合产物,这就给谱带分析带来了困难^[1]。因此准确精密地反映不同生理小种间基因的差异,还需进一步作分子标记。但在生产上鉴定生理小种的差异同工酶技术不失为一种快速、易行的方法。

参 考 文 献

- [1] 张维强,1993,《同工酶与植物遗传育种》北京农业大学出版社
- [2] 胡能书,1985,《同工酶技术及其应用》湖南科学技术出版社
- [3] 高继国,1990,《植物生化实验技术指导》东北农业大学编
- [4] 吕金殿等,1982,我国棉花枯萎病酯酶同工酶测定初报,植物病理学报,12(2): 41-44
- [5] 吴献忠等,1996,棉花黄萎病菌系及鉴定技术,植物病理学报,26(3): 20-24
- [6] 刘曙照等,1992,稻瘟病菌生理小种酯酶同工酶特性的研究,植物病理学报,22(2): 179-183
- [7] 黄桂潮等,1984,大豆灰斑病生理小种鉴定结果初报,大豆科学,3(3): 231-234
- [8] 杨庆凯等,1988,大豆灰斑病生理小种抗性鉴定研究,中国农学通报,(5): 27-29
- [9] 霍红等,1988,黑龙江省大豆灰斑病菌生理小种的研究,大豆科学,7(4): 315-320
- [10] 马淑梅等,1994,绥化地区大豆灰斑病菌生理小种消长变化的研究,大豆科学,13(4): 282-285
- [11] 刘学敏,1996,大豆灰斑病菌遗传标记的建立,博士论文
- [12] 张建华等,1996,玉米过氧化氢酶酶谱编码与品种鉴别,作物学报,22(2): 215-216

ISOZYME ANALYSIS OF *CERCOSPORA SOJINA* HARA

Yuan Fengjie Xu Jinxing Yang Qingkai

(*Soybean Institute of Northeast Agricultural University, Harbin, 150030*)

Abstract

Five isozyme band of *Cercospora soja* Hara was analyzed. The results indicated that there was significant difference among the isozyme bands of *Cercospora soja* Hara. Bands of ten races were coded. the results showed that races 4, 5, 8 had special code. On the basis of such experiment standard isozyme code might be set, it could be used as a supplementary method to analyze the races of *Cercospora soja* Hara.

Key words *Cercospora soja* Hara; Isozyme; Physiological races