

大豆疫霉菌与其它几种疫霉菌同工酶电泳比较研究^{*}

陈宏宇 文景芝 于 鑫

(东北农业大学植物保护系, 150030)

摘要 本文对大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae*) 的 15 个菌株及其它 7 种疫霉菌的 8 个菌株进行了 4 种同工酶电泳比较研究。结果表明, 大豆疫霉菌种内菌株间 4 种同工酶基本一致。疫霉菌种间酯酶 (EST) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 酶谱存在明显差异, 表现为酶带的多少和 Rf 值的不同; 淀粉酶 (DIA) 和过氧化氢酶 (CAT) 同工酶酶谱差异不很明显, 与某些疫霉菌种酶谱相似, 只表现为酶带强度上的差异。本文首次报道了大豆疫霉菌的 SOD、CAT 和 DIA 同工酶, 并指出 EST 和 SOD 同工酶在 *P. sojae* 种的鉴定上具有重要意义, 为 *P. sojae* 种的鉴定提供一个辅助性手段。

关键词 大豆疫霉菌; 酯酶; 超氧化物歧化酶; 淀粉酶; 过氧化氢酶; 同工酶

中图分类号 S435.651.1[†] 6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2001)01-0001-04

大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann) 所致的大豆疫霉根腐病 (*Phytophthora* root rot of soybean) 是危害极其严重的土传性病害。鉴于大豆疫霉菌的破坏性和毁灭性, 1986 年开始一直被我国列为对外检疫重要性植物病原菌。*P. sojae* 属于 Newhook 等^[1] (1978) 检索表中孢子囊无乳突的第五组类群, 缺乏种的鉴别特征, 只有通过比较各性状的一些不明显差异才能鉴定, 同时, 许多因素如培养条件 (培养温度、光照等) 对疫霉菌的形态也有一定影响, 而且有些鉴定性状经常观察不到, 因此进行种的鉴定比较困难^[2], 迫切需要一种简便可靠的方法来辅助形态学鉴定。

针对这一问题, 本实验运用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对大豆疫霉菌 15 个菌株的酯酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、淀粉酶同工酶进行了比较研究, 并以其它 7 种疫霉菌 (*P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. parasitica*, *P. palmivora*, *P. capsici*, *P. infestans*) 为对照, 试图探索一种能够简便准确地鉴定大豆疫霉菌的辅助方法。

1 材料和方法

1.1 菌株

供试菌株共 23 株, 采自中国黑龙江及内蒙的十五个大豆疫霉菌菌株 (*P. sojae*)、2 株辣椒疫霉菌 (*P. capsici*)、1 株致病疫霉菌 (*P. infestans*) 和由南京农业大学提供的 5 种疫霉菌 (*P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. parasitica*, *P. palmivora*) 见表 1。

1.2 样品制备

将供试菌在胡萝卜液体培养基中 25℃ 培养 6 天, 将菌丝滤出, 挤干, 用 pH7.0 磷酸缓冲液冲洗数次后, 加入适量的缓冲液, 放入 -20℃ 冰箱冷冻过夜, 取出后加少许石英砂于冰浴上研磨, 将充分研磨的菌丝匀浆 4℃ 12000rpm 离心 40 分钟, 上清液即为酶提取液, 测定蛋白质含量后直接加样电泳或 -20℃ 保存备用。

1.3 电泳分离

采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶系统, 分离胶浓度为 7.5%, 浓缩胶浓度为 3%。采用北京产 DYY-III2 型稳压稳流电泳仪, 每孔上样量 100 μ g 蛋白。电泳槽置 4℃ 冰箱, 控制电流强度在浓缩胶内为 10mA/板, 进入分离胶后增加到 20mA/板。

1.4 染色

1.4.1 酯酶 超氧化物歧化酶 过氧化氢酶

* 收稿日期: 2000-07-18

项目来源: 省科委重点攻关项目

作者简介: 陈宏宇 (1976-), 女, 东北农业大学植物病理专业在读研究生。

参照刘伟成 (1995)的方法显色^[3]。1. 4. 2 淀粉酶 染色方法参见文献。^[4,5]

表 1 供试菌株
Table 1 23 strains of tested

样品号 Codes	菌株 Strains	寄主 Hosts	采集地 Location	样品号 Codes	菌株 Strains	寄主 Hosts	采集地 Location
1	<i>P. sojae</i> Y ₁	大豆	东农院内	2	<i>P. sojae</i> Y ₂	大豆	东农院内
3	<i>P. sojae</i> JK	大豆	佳木斯农垦总局	4	<i>P. sojae</i> Li	大豆	五九七农场
5	<i>P. sojae</i> 597- 3	大豆	五九七农场	6	<i>P. sojae</i> w ₁	大豆	五九七农场
7	<i>P. sojae</i> LI	大豆	梨丰乡	8	<i>P. sojae</i> Ja	大豆	佳南
9	<i>P. sojae</i> Za	大豆	扎兰屯	10	<i>P. sojae</i> Aa	大豆	阿荣旗
11	<i>P. sojae</i> CH	大豆	创业农场	12	<i>P. sojae</i> H ₂	大豆	红河农场
13	<i>P. sojae</i> F ₈	大豆	密山	14	<i>P. sojae</i> 855 ₁	大豆	八五五农场
15	<i>P. sojae</i> 855 ₂	大豆	八五五农场	16	<i>P. cactorum</i>	大豆	
17	<i>P. citrophthora</i>			18	<i>P. capsici</i>	南瓜	桦南
19	<i>P. capsici</i>	辣椒	东农院内	20	<i>P. palmivora</i>		
21	<i>P. parasitica</i>			22	<i>P. infestans</i>	番茄	东农院内
23	<i>P. cinnamomi</i>						

* 由南京农业大学提供 ,寄主和采集地不详

2 结果与分析

2. 1 酯酶同工酶谱 (EST)(见图 1)

大豆疫霉菌酯酶谱带为 1~ 2条 ,供试所有大豆疫霉菌株均具有 Rf 值为 0. 52的一条主带 ,另外有

10个大豆疫霉菌株具有一条 Rf 值为 0. 13的弱带。而作为对照的其它 7种疫霉菌谱带明显多于大豆疫霉菌 ,为 3~ 8条 ,16 17和 20号虽具有 Rf 值为 0. 52的谱带 ,但 16号主带 Rf 值为 0. 37, 17号还有 2条主带 Rf 值为 0. 44和 0. 48, 20号还有一条弱带 Rf 值为 0. 81



图 1 酯酶电泳图谱
Fig. 1 EST isozyme zymogram

电泳结果表明 ,大豆疫霉菌的 EST谱带种内菌株间基本一致 ,均具有 Rf 值为 0. 52的主带。疫霉属种间差异明显 ,表现为大豆疫霉菌的酶带明显少于其它 7种疫霉 ,同时 ,与大豆疫霉菌具有相同 Rf 值酶带的 16 17和 20号疫霉菌还有大豆疫霉菌不具有的酶带。因此得出大豆疫霉菌的 EST酶谱具有种的特异性

2. 2 超氧化物歧化酶同工酶谱 (SOD) (见图 2)
供试所有大豆疫霉菌株均只具有两条谱带 ,Rf 值分别为 0. 66和 0. 72,但不同菌株间谱带强度稍有差异。而其它 7种疫霉菌的谱带数为 2~ 4条 ,其中 20和 21号完全相同 ,具有 Rf 值为 0. 62和 0. 76的 2条谱带 ;16和 23号具有一条共同带 ,Rf 值为 0. 69, 17~ 22号具有一条 Rf 值为 0. 76的共同谱带。



图 2 超氧化物歧化酶电泳图谱

Fig. 2 SOD isozyme zymogram

结果表明,大豆疫霉菌的 SOD谱带种内菌株间基本一致,均具有 Rf 值为 0.66和 0.72的两条谱带。疫霉属种间差异明显,大豆疫霉菌的酶谱明显不同于其它 7种疫霉,亦具有种的特异性

2.3 淀粉酶同工酶酶谱 (DIA) (见图 3)

供试所有大豆疫霉菌株均具有一条 Rf 值为

0.31的主带,14和 15号另外还有两条弱带, Rf 值分别为 0.11和 0.17;而 17 19和 23号均具有一条 Rf 值为 0.28的谱带;16和 20号分别在 Rf 值为 0.17 ~ 0.32和 0.14~ 0.33处有一宽带;22号有两条分界不太明显的带, Rf 值为 0.09和 0.30;经反复多次电泳,18和 21号无带。

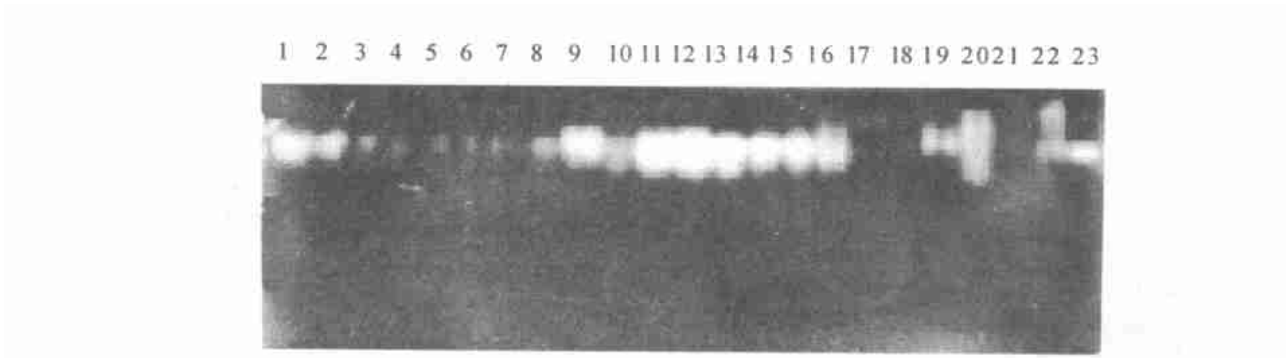


图 3 淀粉酶电泳图谱

Fig. 3 DIA isozyme zymogram



图 4 过氧化氢酶电泳图谱

Fig. 4 CAT isozyme zymogram

结果表明,大豆疫霉菌种内菌株间酶谱基本一致。供试菌株淀粉酶酶带数均较少,多为一条,而且

酶带 Rf 值较接近,因此不宜用来鉴定大豆疫霉菌。

2.4 过氧化氢酶同工酶酶谱 (CAT) (见图 4)

供试所有大豆疫霉菌株均只具有一条谱带, Rf 值为 0.04~0.20 和 21 号也有一条 Rf 值为 0.04 的谱带, 只是宽度要大于大豆疫霉菌; 18、19 和 22 号有一条 Rf 值为 0.69 的谱带; 16 和 17 号在 Rf 值为 0.04~0.14 间有一宽带; 23 号在 Rf 值为 0.33~0.42 间有一宽带。

结果表明, 大豆疫霉菌种内菌株间酶谱一致; 但大豆疫霉菌与 20、21 号具有相同 Rf 值的 CAT 酶带, 因此 CAT 酶谱也不宜用来鉴定大豆疫霉菌。

3 结论与讨论

在应用同工酶分类鉴定真菌方面, 国内外已作了大量研究报道^[6-9]。六十年代以来, 许多研究表明, 菌体可溶性蛋白凝胶电泳是疫霉鉴定和分类的一种重要辅助手段^[10]。另外, 国外有些学者也在探讨酯酶酶谱在疫霉菌研究中的应用, 但结论不一^[11]。本研究结果表明大豆疫霉菌菌体 EST 酶谱具有种的特异性, 即种内基本一致, 这一结果与周肇蕙等 (1995)^[12]对 1992 年分离的 11 个大豆疫霉菌株酯酶同工酶电泳研究结论一致。

对于 SOD 酶谱, 大豆疫霉菌种内菌株间具有极大的相似性, 主要谱带有着相同的迁移率, 只是谱带的强度略有差异。疫霉属种间存在明显差异, 大豆疫霉菌菌体 SOD 酶谱具有种的特异性。

对于 DIA 和 CAT 酶谱, 大豆疫霉菌与其它 7 种疫霉菌某些菌株相似, 差异不明显, 因此不宜用来鉴定大豆疫霉菌。

综上所述, 大豆疫霉菌菌体酯酶、超氧化物歧化酶同工酶酶谱对于大豆疫霉菌种的鉴定是一种简便可靠的辅助手段。

参 考 文 献

- 1 Newhook, F. J., Waterhouse, G. M., Stamps, D. J., Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. [J] *Mycological Paper*, 1978, 143: 1-20
- 2 郑小波. 疫霉菌及其研究技术, [M] 中国农业出版社, 1995
- 3 刘伟成. 球壳孢目真菌系统分类研究, [D] 沈阳农业大学博士论文, 1995
- 4 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用, [M] 湖南科学技术出版社, 1985
- 5 高继国. 植物生化实验技术指导, [M] 东北农业大学编, 1990
- 6 袁凤杰, 徐金星, 杨庆凯. 大豆灰斑病菌生理小种的同工酶鉴定, [J] *大豆科学*, 1998, 17(3): 219-223
- 7 刘曙照, 李清跳. 稻瘟病生理小种酯酶同工酶特性的研究, [J] *植物病理学报*, 1992, 22(2): 179-183
- 8 王凤乐, 商鸿生, 李振歧. 中国小麦条锈菌生理小种同工酶分析, [J] *植物病理学报*, 1995, 25(2): 101-105
- 9 陈伟群, 张天宇. 十字花科上的链格孢属真菌同工酶凝胶电泳分析, [J] *真菌学报*, 1994, 13(4): 295-302
- 10 徐敬友, 陆家云, 方中达. 六种疫霉菌体可溶性蛋白质和酯酶的聚丙烯酰胺凝胶平板电泳研究, [J] *真菌学报*, 1993, 12(1): 54-64
- 11 Nygaard, S. L., Elliott, C. K., Cannon, S. J. et al. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora megasperma*. [J] *Phytopathology*, 1989, 79: 773-780
- 12 周肇蕙, 严进, 苏彦纯等. 大豆疫病的检疫研究-病原菌的分离鉴定, [J] *植物检疫*, 1995, 9(5): 257-261

STUDIES ON ISOZYME ELECTROPHORESIS OF *Phytophthora sojae* AND OTHER *Phytophthora* SPECIES

Chen Hongyu Wen Jingzhi Yu Xin

(Department of Plant Protection, Northeast Agriculture University, Harbin, 150030)

Abstract Polyacrylamide gel electrophoretic analysis of isozymes of 15 strains of *P. sojae* and 8 strains of seven other *Phytophthora* species was studied. The results show higher similarities between 15 strains from *P. sojae* in four isozyme zymograms. There are no marked differences of DIA and CAT zymograms between *P. sojae* and seven other *Phytophthora* species. Marked differences of EST and SOD zymograms among *P. sojae* and seven other *Phytophthora* species indicate that EST and SOD isozyme are useful and reliable supplementary tools for identification of *P. sojae*.

Key words *Phytophthora sojae*; Esterase; Superoxide dismutase; Diastase; Catalase; Isozyme