

玉米大斑病菌生理小种同工酶的 薄层扫描图谱^[1]

董金皋^[2] 贾建航^[3] 李正平^[4] 刘国振^[3] 王江柱^[2]

(河北农业大学, 保定 071001)

Patterns of thin layer scanning on isoenzymes of *Helminthosporium turcicum* race 1 and 2

Dong Jingao Jia Jianhang Li Zhengping Liu Guozhen Wang Jiangzhu

(Dept. of plant protec., Univ. of Hebei Agric., Baoding 071001)

Abstract: The peroxidase isoenzyme and esterase isoenzyme of four isolates which belong to physiological race 1 and 2 of *Helminthosporium turcicum* have been studied by PAGE and IEF analysis. The thin layer (TL) scanning atlases of the peroxidase isoenzymes indicated that two isolates which belong to race 1 had an obvious absorption of gel plate 80mm (like streamed bread, named summit G), but race 2 had two weak absorption summits on the same area (named summit M and N). The experimental results also indicated that the TL scanning atlases of esterase isoenzyme from two isolates of race 1 had an obvious summit G on gel plate 130mm, but race 2 had not when pH value of amphiprotic electrolyte (ampholine) was 4-6. On the contrary, race 2 had summit C on gel plate 70mm, but race 1 had not when ampholine pH value was 3.5-10. It was concluded that there was significant differences of the peroxidase isoenzyme and esterase isoenzyme between different phyiological races. This will lay a foundation on researching the relation between genetics of toxin production and toxic composition of different races of *H. turcicum*.

Key words: *Helminthosporium turcicum*; Physiological races; Peroxidase isoenzyme; Eraserase isoenzyme; TL scanning

摘要 对属于玉米大斑病菌 1、2 号生理小种的四个标准菌株的过氧化物同工酶和酯酶同工酶进行 PAGE 和 IEF 分析研究, 过氧化物同工酶扫描图谱发现 1 号生理小种在薄板 80mm 处有明显的馒头状吸收峰(G 峰), 而 2 号小种在薄板 80mm 处有一微弱吸收(M 峰), 紧随其后又在 85mm 处出现另一微小吸收峰(N 峰), 可见玉米大斑病菌 1、2 号在生理小种的过氧化物同工酶图谱有一定的差异。酯酶同工酶扫描图谱发现, 1 号生理小种在薄板 130mm 处有一明显的窄长吸收峰(G 峰), 而 2 号小种在此区域则无明显吸收。如果两性电解质由 pH4~6 换成 pH3.5~10 时, 2 号小种在薄板 70mm 处有一 C 峰出现, 但 1 号小种没有出现该峰, 可见玉米大斑病菌 1、2 号生理小种的酯酶同工酶也存在着差异, 这将为探讨玉米大斑病菌毒素产生的遗传学和不同小种毒素的毒性成分间的关系奠定基础。

关键词 玉米大斑病菌 生理小种 过氧化物同工酶 酯酶同工酶 薄层扫描

近年来, 同工酶分析技术广泛地应用于植物病原真菌生理小种的分类鉴定(刘曙照等 1992, Welz 等 1994), 表明该项技术在生

[1] 河北省自然科学基金资助项目

[2] 河北农业大学植保系植物免疫研究室 [3] 河北农业大学实验中心 [4] 河北农业大学基础部化学教研室

收稿日期 1995-04-28

理小种鉴定方面有一定辅助作用,玉米大斑病一直是我国玉米生产上的主要病害,而且逐年加重,在玉米大斑菌群体中根据对 Ht 基因玉米致病力的不同分为 1、2 号生理小种。新的研究表明,玉米大斑病菌 1、2 号小种均可产生致病毒素,但毒性成分存在着差异(董金皋 1995,待发表)。为探讨小种产毒的遗传机理和产毒成分间的关系,我们对分属于玉米大斑病菌 1、2 号生理小种的 4 个标准菌株的过氧化物同工酶和酯酶同工酶进行了薄层扫描分析。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

供试标准玉米大斑病菌 1 号小种(101 和 248 菌株),2 号小种(93-1 和 381 菌株)均由河北农业大学植物免疫学研究室提供。

1.2 菌体培养和同工酶提取

将玉米大斑菌接种在 50ml 盛有 20ml 的改良 Fries 培养液(成分:蔗糖 30g、酒石酸铵 5g、 NH_4NO_3 1g、 KH_2PO_4 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、酵母浸出汁 0.5g、 NaCl 0.01g、蒸馏水 1000ml,调 pH4.0)的锥形瓶中,25℃ 黑暗静止培养 14 天,经过滤、重蒸馏水冲洗,加入适量的样品提取液 TBE(Tris-HCl : H_3BO_3 : EDTA = 1:1:1,浓度均为 0.1M),冰冻 24 小时,然后冰浴研磨再以 10000r/min 离心 8~10 分钟,取上清液作为酶样测定。

1.3 过氧化物同工酶电泳分析

采用李清铨等(1985)介绍的聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳法进行。分离胶(30% Acr-0.8% Bis 6.75ml, 1M Tris-HCl pH8.8 22.5ml, 1% 过硫酸铵 0.75ml, TEMED 20 μ l); 浓缩胶(30% Acr-0.8% Bis 13ml; 1M Tris-HCl pH6.8 1.3ml, 重蒸馏水 7.1ml, 1% 过硫酸铵 0.3ml, TEMED 15 μ l)电泳条件:往槽中加入一滴 0.01% 溴酚兰作前沿指示剂,先 1mA/cm, 20 分钟后为 2mA/cm,电泳时间 3~4

小时。

1.4 酯酶同工酶电泳分析

采用等电聚焦法,分离胶(30% Acr-0.8% Bis 2ml, Ampholine pH4~6 或 pH3.5~10 0.6ml, 重蒸馏水 5.4ml, TEMED 10 μ l, 8% 过硫酸铵 50 μ l),电泳条件:稳压 60V (15min)→稳流 7~9mA(至电压升到 500V)→稳压 580V,电泳时间 3~4 小时。

1.5 薄层紫外扫描

凝胶板置日本岛津 CS-930 薄层扫描仪上,以波长 280nm,反射吸收的方式进行紫外扫描。

2 结果与分析

2.1 玉米大斑病菌 1、2 号生理小种的过氧化物同工酶

图 1 为玉米大斑病菌 1、2 号生理小种的过氧化物同工酶谱,可见在凝胶板的 80mm 处,属于 1 号小种的 101 菌株和 248 菌株均有一明显的馒头状吸收峰(G 峰),而 2 号小种在此区域却出现两个小吸收峰(M 和 N 峰);AB 区域(40~55mm)中两个小种均有 A、B 二峰出现,不过 1 号小种菌株二峰大小相近,而 2 号小种菌株却明显表明 A 峰高于 B 峰;CDE 区域(60~75mm)中,1 号小种菌株无明显吸收,曲线变化不大,但 2 号小种菌株在此区却变化幅度较大,可见玉米大斑菌过氧化物同工酶的扫描图谱在 1 号和 2 号生理小种中是有区别的。

2.2 玉米大斑病菌 1、2 号生理小种的酯酶同工酶

采用等电聚焦法(两性电解质 Ampholine pH3.5~10)对分属于大斑菌 1、2 号小种的 4 个菌株进行酯酶同工酶电泳分析,扫描后发现 2 号小种菌株在薄板的 70mm 处有一明显 C 峰,1 号小种菌株在整个 A-G 区域内变化不大,无明显吸收;1 号小种和 2 号小种菌株在 I、J 区均有二峰出现,此区无明显差异(图 2)。

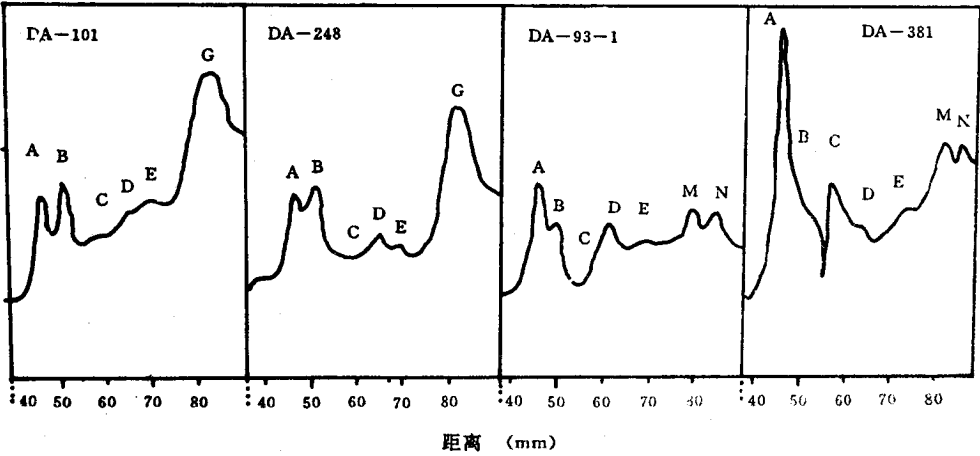


图1 玉米大斑病菌不同生理小种菌株过氧化物同工酶的紫外扫描图谱

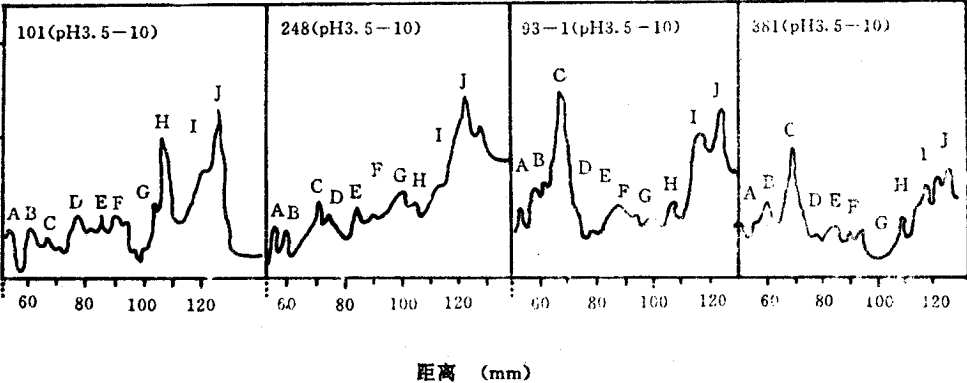


图2 玉米大斑病菌不同生理小种菌株酯酶同工酶的紫外扫描图谱(一)
(两性电解质 Ampholine pH3.5~10)

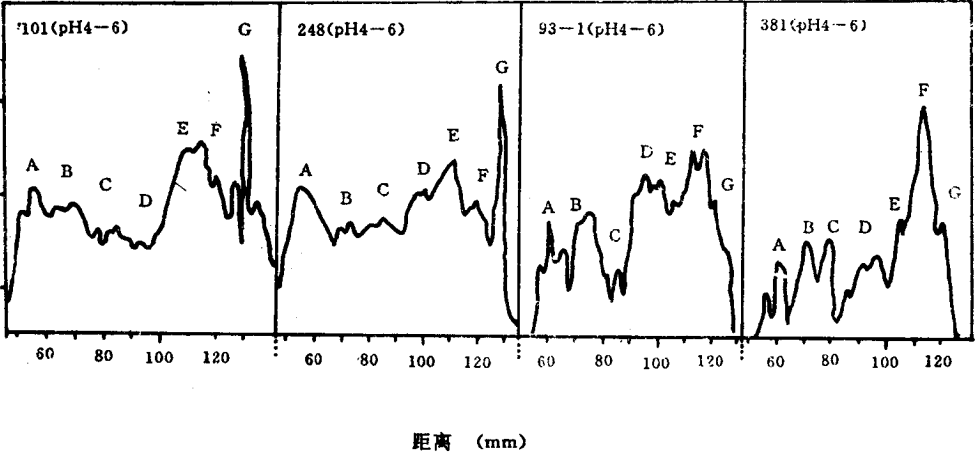


图3 玉米大斑病菌不同生理小种菌株酯酶同工酶紫外扫描图谱(二)
(两性电解质 Ampholine pH4~6)

将两性电解质 Ampholine 由 pH3.5~10 换为 pH4~6,电泳扫描发现,1号小种菌株在薄板的 130mm 处有一极明显的窄长吸收峰(G 峰),2号小种菌株却无此峰出现;其他区域二个种无明显差异(图 3),可见玉米大斑菌酯酶同工酶的扫描图谱在 1 号和 2 号生理小种中也是有区别的。

3 讨论

近年来,华北地区玉米大斑病发生日趋严重,已引起广大植病工作者和育种学家的重视,通过研究发现,导致玉米大斑病严重发生的原因一方面是大面积种植了感病品种,另一方面是由于 2 号小种已由东北玉米产区向华北玉米产区蔓延,而且出现频率逐年上升(戴漫晖等,1993)。目前,我们研究发现,玉米大斑菌诱致玉米发病的机制是它在寄主体内产生了致病毒素,而且属于不同小种的毒素毒性成分存在着一定的差异。本研

究表明,属于 1 号和 2 号小种的过氧化物同工酶和酯酶同工酶的扫描图谱也不相同,进而说明同工酶扫描技术可用于病原真菌生理小种的分类鉴定,而且对探讨产毒菌株的遗传学和毒素化学成分间联系的深入研究以及为玉米大斑菌产毒的分子遗传机理研究奠定基础。

参考文献

- [1]刘曙照等,稻瘟病菌生理小种酯酶同工酶特性的研究,《植物病理学报》,1992,22(2):170-183
- [2]Welz, H. G., Kohler, W., and Leonard, K. J., 1994. Isozyme Variation within and among pathogenic races of *Cochliobolus carbonum* on corn in North Carolina. *Phytopathology* 84:31-38
- [3]董金皋等,1995,玉米大斑菌 Ht-毒素的毒性成分分析,《植物病理学报》,(待发表)
- [4]李清锐等,江苏麦类禾谷镰刀菌酯酶同工酶的测定,《植物病理学报》,1985,15(4):217-223
- [5]戴漫晖,玉米大斑菌生理分化研究,《全国高等农业院校优秀毕业论文集锦》,辽宁教育出版社,1993

欢迎订阅 1996 年《内蒙古农业科技》

《内蒙古农业科技》是内蒙古农业科学院和内蒙古农学会合办的综合性农业期刊。本刊立足内蒙,面向全国,突出自治区农业特色,主要报道农业科技成果、学术论文、研究报告、丰产经验、先进技术、现代农业科技知识和国内外科技新动态等。适合农业科技工作者、农业院校师生、农业管理人员、农村科技骨干阅读。本刊为双月刊,16 开本 40 页,每期定价 1.50 元,全年 9.0 元。邮发代号 16-70,请到当地邮局订阅。