

尖孢镰刀菌异核体及其不同核型分离子的 的孢子萌发时期同工酶分析

李颖 关国华 舒石 颜耀祖
(中国农业大学生物学院)

摘要 在获得尖孢镰刀菌棉花萎蔫专化型异核体菌株及其3个稳定的不同核型分离子的基础上,选择孢子萌发时期的幼嫩菌丝制备粗酶提取液,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法进行了7种同工酶分析。结果表明,酯酶和乳酸脱氢酶电泳图谱在4个样品中完全一致;没有致病能力的菌株在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶的表达量高于致病力强的菌株;致病力强的菌株没有乙醇脱氢酶的表达。在4个样品中都没有检测到苹果酸酶和过氧化氢酶。

关键词 尖孢镰刀菌; 异核体; 同工酶

中图分类号 Q 933; Q 936

Analysis of Isozymes During Germination of Conidia in a Heterokaryon of *Fusarium oxysporum* and Its Three Nuclear Type Segregants

Li Ying Guan Guohua Shu Shi Yan Yaozu
(College of Biological Science, CAU)

Abstract Crude extract samples were prepared from the germinating conidia of a heterokaryon of the wild type strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and its three nuclear type segregants. The crude extracts were analyzed by using PAGE for the following seven isozymes. The result indicated that there were no difference in the patterns of esterase and lactate dehydrogenase of these four samples, but the expression level of malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase of the non-pathogenicity segregant was higher than the segregants with high-pathogenicity. Alcohol dehydrogenase was not found in the two segregants with high pathogenicity toward cotton seedlings. Malic enzyme and catalase were undetectable in all of the four samples.

Key words *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*; heterokaryon; isozyme

镰刀菌等多种真菌在自然界的频繁变异是由于易形成异核体,这点早已被人们认识,但形成异核体的机制至今未能找到明确答案。一般认为,环境的影响是一重要因素,菌株自身的遗传特性则是形成异核体的物质基础。揭示病原真菌的异核本质,对于植病防治具有重要意义。丝状真菌遗传背景复杂,其异核机制的研究难度较大,目前国内外可参考的文献有限。笔者对水稻恶苗

收稿日期: 2001-01-04

国家自然科学基金资助项目(39770395)

李颖,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

病菌、棉花枯萎病菌不同核型分离分子DNA 碱基组成的测定、18S rDNA 序列和 ITS 区序列分析以及菌株核DNA 的RAPD 分析结果表明,虽然来源于1个异核体菌株的3个不同核型的分离分子之间在表观性状上差异明显(如色素、菌丝质地和孢子生成量等方面很不相同),但它们的核DNA 高度同源^[1,2]。由此推测异核体的产生很可能是由原细胞核在某种特定环境下碱基突变的结果,而不是由2个遗传性状差异较大的细胞核融合后染色体交换再分离引起。

我们前期的研究发现,河南分离的棉花枯萎病菌异核体及其3个分离子在核DNA 序列上高度同源,而它们表型特征上存在明显差异,特别是致病性截然不同,其中1个分离子完全丧失了致病能力^[2]。为从菌株本身的生理代谢上证明它们之间的差异,本研究选择上述菌株(尖孢镰刀菌棉花萎蔫专化型)侵入寄主时期即孢子萌发阶段细胞内同工酶种类及活性进行分析,试图寻找不同分离子在相同发育阶段基因产物及表达水平上的具体差异,以便有针对性地探讨导致异核体菌株产生的因素及其表型性状发生改变的原因。

1 材料和方法

1.1 菌株

1)野生型棉花枯萎病菌株,由中国农科院植保所棉病组孙文姬研究员惠赠。

2)异核体菌株Ag149,由本室经切割野生型单根菌丝尖端后获得(其菌落出现3种明显突变)。

3)同核分离子菌株Ag149-I, Ag149-II和Ag149-III由本室通过挑取不同角变处分生孢子,经单孢分离、纯化并稳定7~8代后获得,经过致病性鉴定,证明异核体菌株和Ag149-I致病力最强,而Ag149-III丧失了致病能力。

1.2 样品制备

经活化的异核体菌株和3个不同核型分离子菌株分别接种于马铃薯蔗糖培养液中,26振荡培养60h,离心收集孢子,用无菌水洗涤并调整孢子悬液浓度为 10^8 个 \cdot mL⁻¹,各取0.5mL孢子悬液分别接种于100mL完全培养液中,26振荡培养12h,过滤收集幼嫩菌丝,无菌水洗涤多次,菌丝体经冷冻干燥后,加液氮研磨,加入Tris-HCl 0.1mol \cdot L⁻¹(pH7.0)提取缓冲液,离心收集上清,得到粗酶提取液。采用Lowry法测定样品蛋白含量,并调整4个样品蛋白含量基本一致。将待测样品分装于0.5mL离心管中,-70℃保存备用。

1.3 电泳

实验采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳,工作配方参考何忠效等^[3]和Rosendahl等^[4]介绍的方法,用Bio-Rad电泳系统在4℃恒温条件下进行。除酯酶采用10%凝胶外,其他酶均采用7.5%的凝胶。每种酶重复电泳3次以上确保结果的稳定。

1.4 凝胶染色

电泳完毕后,对凝胶进行特异性酶活染色,显现酶带后经扫描或拍照,并固定保存凝胶片。

酯酶(Esterase, E. C. 3.1.1.1)参考Rosendahl等^[4]的方法;乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase, E. C. 1.1.1.1)采用Micalca等^[5]的方法;苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase, E. C. 1.1.1.37),乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase E. C. 1.1.1.27),葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-phosphate dehydrogenase, E. C. 1.1.1.49),苹果酸酶(Malic enzyme, E. C. 1.1.1.40)和过氧化氢酶(Catalase, E. C. 1.11.1.6)参考张维强等^[6]方法。

2 结果

7 种同工酶的染色结果除了过氧化氢酶和苹果酸酶没有发现表达产物外, 其他 5 种酶染色结果均显现了明显的酶带(图 1)。酯酶一般为单体或二聚体, 分子量较小, 采用浓度为 10% 的凝胶比较适宜, 4 个菌株酯酶泳动的距离一致, 分别出现 3 条酶带, R_f 值为 0.73, 0.69 和 0.55; 其他酶类采用浓度为 7.5% 的凝胶进行分析。乳酸脱氢酶通常为四聚体, 分子量较大, 4 个样品乳酸脱氢酶分子量一致且表达量相同, R_f 值均为 0.34; 苹果酸脱氢酶是三羧酸循环中的酶类, 虽然 4 个样品此酶泳动的 R_f 值均为 0.51, 但在上样量一致的情况下, Ag149- I 型菌株表达量明显低于其他样品。由于没有纯化步骤, 从图谱上显示的扩散带型来看, 此酶很可能是一种糖蛋白。在 4 次重复实验中, 只有 Ag149- II 和 Ag149- III 显现乙醇脱氢酶酶带, 其 R_f 值为 0.35, 尽管加大点样量, Ag149 和 Ag149- I 终未发现其表达产物。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶是 HMP 途径中关键酶之一, 4 个样品中其泳动 R_f 值为 0.47, 但 Ag149- I 菌株表达量明显低于其他菌株, 图 1 还显示 Ag149- I 上样量大于其他样品 3 倍时的电泳结果。

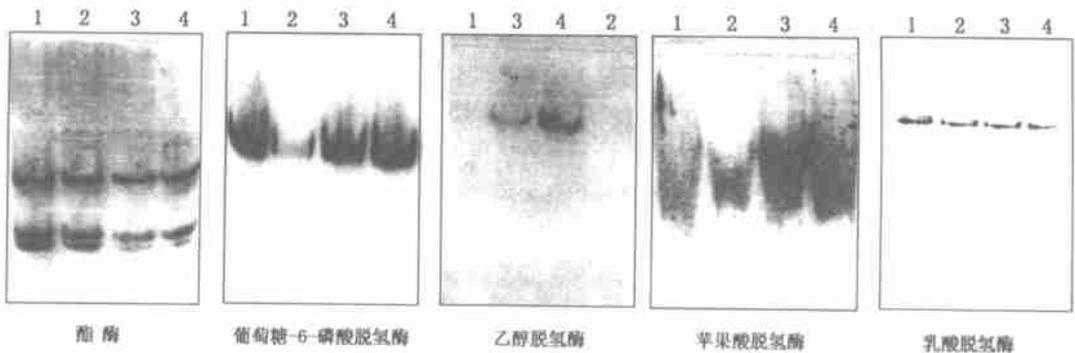


图 1 棉花枯萎病菌异核体及其同核分离菌株孢子萌发时期 5 种同工酶电泳图谱
菌株编号 1—Ag149; 2—Ag149- I; 3—Ag149- II; 4—Ag149- III

3 讨论

人们通常针对病原菌侵入寄主时期寄主体内的应答所产生的变化来分离克隆与抗病有关的基因。由于在研究镰刀菌异核机制过程中发现组成异核体的 3 个同核分离子在表型特性上差异很大, 这种表型特征成为我们分析菌株基因组差异的依据。因此, 本实验提取菌株生长过程中 DNA 复制最活跃时期的胞内酶进行同工酶分析, 而所分析的同工酶种类, 是参考前人在镰刀菌分类过程中经常选用的^[7]。在保证供试菌株生长条件和样品制备条件一致的情况下, 发现异核体菌株与不同核型分离之间在酯酶和乳酸脱氢酶分子量和表达量上没有差异; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(图 1)和苹果酸脱氢酶虽然在分子量上一致, 但表达量差异明显, 特别是这 2 种同工酶在 Ag149- I 的表达量均低于其他菌株; 乙醇脱氢酶在致病力较强的野生型菌株 Ag149 及分离 Ag149- I 孢子萌发阶段也没有表达产物检出, 相反, 在上样量相同的情况下, 丧失致病能力的菌株 Ag149- III 乙醇脱氢酶的活性明显高于致病力较弱的菌株 Ag149- II。

棉花枯萎病菌是在孢子萌发阶段侵入寄主细胞的,并在寄主细胞内生存,导致棉花发病萎蔫。本实验3个分离菌株在致病性上差异明显,特别是A g149- I,几乎与野生型菌株的致病力相同,致病性鉴定实验是在相同条件下实施完成的,并没有发现因菌株生长缓慢而导致棉苗的发病时间滞后,但在离体培养条件下,却出现了菌株在其芽管萌发时期乙醇脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶的表达有差异。现有的结果证明,4个样品之间在自身代谢上存在着一定差异,特别是乙醇脱氢酶的表达与否很有可能成为分析致病菌株与非致病菌株之间差异的具体目标,值得进一步探讨。作者前期的实验发现,A g149-III在泗棉二号寄主上不能存活,看来可能是由于寄主对它的侵染和代谢产生免疫;或是由于菌株本身基因突变而不再适应此种寄主的环境。从5种同工酶的检测结果来看,非致病菌株无论在酶的表达量与酶的活性水平上均高于致病菌株。

本实验证实了不同核型分离子之间在同工酶的种类和表达水平上存在着不同,这为我们深入分析尖孢镰刀菌异核体之间的差异进而采用的mRNA 差异显示方法提供了依据。

参 考 文 献

- 1 陈希,李秀玉,颜耀祖 稻恶苗菌异核体3种核型核DNA的RAPD分析 微生物学报,1996,36(5):385~388
- 2 关国华,李颖,林秀萍,等 棉花枯萎病菌异核体不同核型分离子表观特性及其核DNA的RAPD分析 菌物系统,2000,19(4):504~508
- 3 何忠效,张树政 电泳(第2版).北京:科学出版社,1999
- 4 Rosendahl S, Sen R. Isozyme analysis of mycorrhizal fungi and their mycorrhiza Methods in Microbiology, 1992, 24: 178~181
- 5 Micales J A, Bonde M R, Peterson G L. The use of isozyme analysis in fungi taxonomy and genetics Mycotaxon, 1986, 27: 405~449
- 6 张维强,唐秀芝 同工酶与植物遗传育种 北京:北京农业大学出版社,1993
- 7 Mattila T Y, Paavanen S, Hannukkala A, et al Isozyme and RAPD-PCR analyses of *Fusarium avenaceum* strains from Finland Plant Pathology, 1996, 45: 126~134