

过氧化物酶同工酶电泳技术 在冬小麦抗白粉病鉴定中的应用

王立新 苏 青

(北京市植物细胞工程实验室, 北京 100081)

摘 要 通过对 14 个抗白粉病、23 个感白粉病的冬小麦品种、品系功能叶过氧化物酶同工酶分析证明, 由于对白粉病反应不同, 在拔节至抽穗期, 抗、感品种功能叶的过氧化物酶酶谱有明显差别, 据此可以对田间大量育种材料进行早期预测, 以防使用感病材料接种花药和进行杂交。用叶片同工酶鉴定抗病性, 不影响植株生长发育, 可与育种试验同时进行, 是一种简便易行的鉴定方法。

关键词 冬小麦 过氧化物酶同工酶 白粉病鉴定

白粉病是造成小麦减产的主要病害之一, 因此在育种研究中对试验材料进行抗白粉病的鉴定是非常重要的。目前的常规鉴定要求在特定的温度湿度下接种白粉病菌种, 或在特定地区根据供试材料发病程度进行抗病性评价^[1]。这种技术并不适用处于在分离世代的育种材料。对于大量的杂交后代, 育种工作者只得根据每个材料田间自然发病的情况推断其抗病性。但是白粉病的发生程度受气候条件影响, 同一品种在不同年份所表现的抗病性差异很大, 根据自然发病程度判断抗病性缺乏可靠性。北京地区的白粉病多发生在扬花之后, 接种花药和进行杂交时还无法区别这些材料是否抗病, 难免得到许多感病的花培植株和杂交组合, 造成人力物力的浪费。

过氧化物酶被认为可以帮助植物抵抗病害的侵染。曾有报道, 棉花枯萎病、玉米茎腐病、大麦黄花叶病、小麦白粉病等病害侵染作物后, 植株的过氧化物酶活性或同工酶数量会发生明显的变化^[2~5]。本文旨在探讨抗病、感病的冬小麦感病前过氧化物酶同工酶的酶谱差别, 建立一项早期鉴定抗病性的生物化学技术。

1 材料和方法

1.1 试验材料

37 个小麦品种、品系由本室第一课题组、北京市农科院作物所、中国农科院作物所、北京农业大学提供, 其中 33 个品种经中国农科院植保所抗病性鉴定(表 1)。

1.2 取样方法

样品取自于各生育期功能叶,擦净叶片放入 -20°C 以下保存。

1.3 均匀胶电泳方法

加入三倍于样重的 Tris-甘氨酸电极缓冲液(pH8.7)研磨,匀浆在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 离心机中以 10000r/min 离心 20min ,采用聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳,分离胶和浓缩胶浓度分别为 7% 和 3% 。点样量 $30\mu\text{l}$,以 250V 恒压在 4°C 条件下电泳 5h 左右(北京市六一仪器厂DYY-Ⅲ4型电泳仪)。

1.4 均匀胶染色液

称 0.8g 联苯胺用 6ml 冰醋酸加热溶解后马上加 34ml 蒸馏水、 40ml $4\%\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 40ml $5\%\text{EDTA}$ 、 40ml $0.3\%\text{H}_2\text{O}_2$,最后加入 300ml 蒸馏水。

1.5 等电聚焦(IEF)电泳方法

将样品置于离心管中,用搅棒挤压出汁液。吸一定量汁液放入另一离心管,再加入三倍于汁液体积的纯水或蒸馏水,摇匀,离心方法同均匀胶。采用 IEF pH5~8 的聚丙烯酰胺凝胶,分离时电泳条件为 200V 、 5mA 、 3.5W 、 600vh 、 15°C 。

1.6 IEF 凝胶染色液

称 0.1g 联苯胺用 0.25ml 冰醋酸加热溶解后马上加入 4.3ml 蒸馏水、 5ml $5\%\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 5ml $5\%\text{EDTA}$ 、 5ml $0.3\%\text{H}_2\text{O}_2$,最后加入 40ml 蒸馏水(Pharmacia 公司的 Phastsystem 电泳仪)。

2 结果与分析

1992年至1994年采用两种电泳方法比较了14个抗病品种和23个感病品种的叶片过氧化物酶同工酶谱。冬前没有明显差别(图1),拔节以后抗病、感病品种的酶谱表现出明显差异。均匀胶上的差异位于酶谱中部的B区(图3),抗病材料B区的酶带多达3~6条,感病材料仅1~2条酶带;IEF上的差异表现为PI5.9和PI6.1两条酶带的强度不同。抗病品种中有三种情况:①两条强带;②一条强带一条弱带;③一条强带。感病品种为另外三种酶谱:①两条弱带;②一条弱带;③PI5.9和PI6.1均无酶带。我们将有1~2条强带的酶谱称作抗病酶谱;有1~2条弱带或没有酶带的酶谱称作感病酶谱,分别以R和S表示(图2)。扬花期以后,感病品种陆续感病,病叶的PI5.9和PI6.1酶活性再次加强(图4)。纵观全生育期,抗病品种的PI5.9

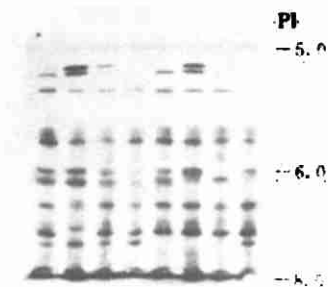


图1 8个冬小麦品种苗期叶片过氧化物酶同工酶 (IEF, pH5~8)

1~4 感病品种:京花1号,京花3号,京花5号,京双16

5~8 抗病品种:Armada, Maris Huntsman, CI12632×CC8, Caralus

表 1 过氧化物酶同工酶分析结果与常规鉴定结果

品 种 名 称	拔 节 至 抽 穗 期 酶 谱 类 型			常规鉴定结果	
	4 月初	4 月中	4 月底		
Norman	R	R	R	高	抗
CI12632×CC8	R	R	R	高	抗
Armada	R	R	R	高	抗
Yuma×CC8	R	R	R	高	抗
Khapli×CC8	R	R	R	高	抗
Maris Huntsman	R	R	R	高	抗
Bert	R	R	R	高	抗
GWT ₃	R	R	R	高	抗
PI381432	R	R	R	高	抗
LT1033-79	R	R	R	高	抗
小白冬麦	R	R	R	高	抗
农林 73	R	R		高	抗
B-17-5-8	R	R	R	高	抗
红螳芒	R	R	R	高	抗
京花 1 号	S	S	S	高	感
京花 3 号	S	S	S	高	感
京花 5 号	S	S	S	高	感
京双 16	S	S	S	高	感
京冬 1 号	S	S	S	中	感
清农 1 号	S	S	S	中	感
临 7410	S	S	S	中	感
东 87	S	S	S	高	感
东 31	S	S	S	高	感
3043-1	S	S	S	高	感
85-6301	S	S	S	高	感
农大 015	S	S	S	高	感
农大 91	S	S	S	中	感
农大 92	S	S	S	高	感
农大 93	S	S	S	中	感
京冬 6 号	S	S	S	中	感
京农 8866	S	S	S	高	感
北农 2 号	S	S	S	高	感
偃师 9 号	S	S	S	高	感

~6.1 处始终保持 1~2 条强带;而感病品种的酶带为苗期强,拔节至抽穗期弱,感病后再加强。因此选择拔节至抽穗期的叶片进行分析,可准确地判断供试材料的抗病性(表 1)。由于同工酶的表现受基因控制,尽管不同年份采用不同电泳方法,都能获得相同结果(表 2)。同一品种的不同功能叶具有相同酶谱(图 5)。而老叶和新叶的部分酶带很弱(图 6),不适于作为样品。

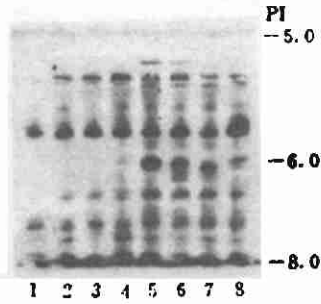


图 2 8 个冬小麦品种旗叶过氧化物酶同工酶 (IEF,pH5~8)
1~4 感病品种、品系:山东 311303;丰抗 5 号;
77209/77164;京双 16
5~8 抗病品种:Norman;Armada;
Khapli×CC8;Maris Huntsman

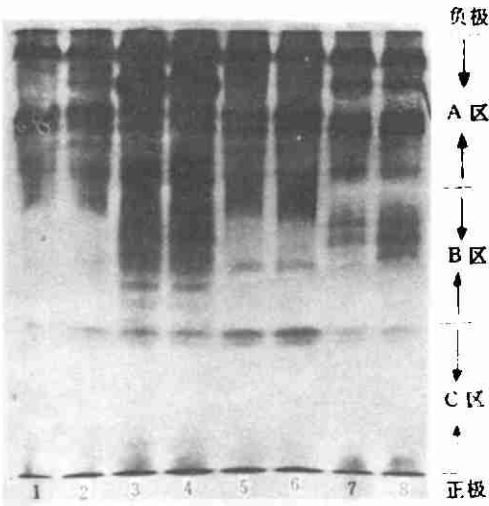


图 3 4 个冬小麦品种旗叶过氧化物酶同工酶(均匀胶)
1、2. 感病品系:85-6301;3、4. 抗病种质:H-17-5-8;
5、6. 感病品种:京双 16; 7、8. 抗病种质:PI381432

表 2 不同年份不同电泳方法所得的酶谱类型

品 种 名 称	过氧化物酶同工酶谱类型		
	1992(均匀胶)	1993(IEF)	1994(IEF)
CH12632×CC8	R	R	R
Norman	R	R	R
Yuma×CC8	R	R	R
Khapli×CC8	R	R	R
Maris Huntsman	R	R	R
Armada	R	R	R
GWT ₃	R	R	R
PI381432	R	R	R
LT1033-79	R	R	R
小白冬麦	R	R	R
农林 73	R	R	R
京花 1 号	S	S	S
京花 3 号	S	S	S
京双 16	S	S	S
京冬 1 号	S	S	S
山东 311303	S	S	S
77209/77164	S	S	S
CA837	S	S	S

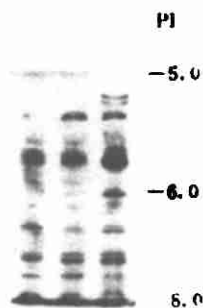


图4 “京花5号”感病前后
旗叶过氧化物酶同工酶
(IEF, pH5~8)

1. 感病前(5月5日)
2. 感病前(5月20日)
3. 感病后(5月31日)

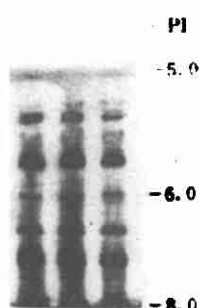


图5 “Bert”不同功能
叶过氧化物酶同工酶
(IEF, pH5~8)

1. 旗叶
2. 倒二叶
3. 倒三叶

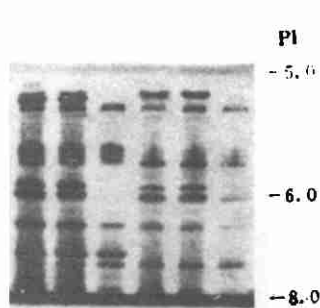


图6 两个小麦品种苗期
不同叶片过氧化物酶同工酶
(IEF, pH5~8)

- 1~3: 京花1号第一叶(功能叶),
第二叶(功能叶), 第三叶(新叶),
- 4~5: GWT₃ 第一叶(功能叶),
第二叶(功能叶), 第三叶(新叶)

3 讨论

采用叶片进行同工酶分析不影响植株生长发育,可用于小麦品种、品系的抗病性鉴定,也适于对各分离世代的育种材料进行株间鉴定。1993和1994年因气候不适于白粉病发生,田间发病较轻,我们采用此项技术对田间所有杂交后代进行了抗性鉴定。同工酶电泳技术容易掌握,出结果快,在短期内能够鉴定大量材料,便于在田间发病前预先识别感病材料,减少以后工作中的盲目性。

IEF电泳的结果证明,小麦功能叶过氧化物酶的PI5.9和PI6.1酶带(特征酶带)与小麦对白粉病的抗性有关。抗病品种的特征酶带始终保持着较强的活性;而感病品种表现为苗期活性强,拔节后活性下降,感病后活性再次加强。特征酶带由强变弱,很可能是由于控制这些酶带的基因受到某种抑制而不能表达或表达不完全,使特征酶带活性下降。当植株感病后,这些基因又被激活,酶活性则由弱变强。抗病品种没有这种变化是因为其控制基因始终正常表达。

小麦叶片过氧化物酶少数酶带的控制基因已被定位。Ainsworth等采用pH3.5~9.5的IEF凝胶证明,pH5~8内有8条酶带,其中第5条酶带的控制基因位于1BS染色体上,第6、7条酶带的基因位点在1DS上^[6]。Angeles Bosch等采用淀粉胶证明,幼苗叶片共有9条酶带,其中5条酶带的基因分别位于2AS、2BS和2DS上^[7]。我们所述的特征酶带的基因位点在哪条染色体上,是否与抗白粉病基因有关将是下一步研究内容。

参 考 文 献

- 1 盛宝钦. 小麦成株白粉病田间鉴定技术. 北京农业科学, 1992, 10(4): 16~17
- 2 沈其益等. 棉花感染枯萎病后过氧化物酶的变化. 植物学报, 1978, 20(2): 108~113
- 3 吴纯仁等. 玉米抗茎腐病与过氧化物酶活性及同工酶的关系. 湖北农业科学, 1989(6): 14~16

- 4 朱睦元等. 大麦品种对黄花叶病毒的抗性与过氧化物酶、酯酶的关系研究. 植物保护学报, 1989, 16(1): 43~47
- 5 杨家书等. 小麦品种对白粉病抗病性与过氧化物酶的关系. 植物病理学报, 1984, 14(4): 235~240
- 6 Ainsworth CC et al. The chromosomal locations of leaf peroxidase genes in hexaploid wheat, rye and barley. TAG, 1984, 69: 205-210
- 7 Angeles Bosch et al. Leaf peroxidase—A biochemical marker for the group 2 chromosomes in the Triticinae. Genet Res Camb, 1986, 47: 103-107

Application of Peroxidase Isozymes Analysis in Identification of Winter Wheat Resistance to Powdery Mildew

Wang Lixin Su Qing

(Beijing Plant Cell Bioengineering Laboratory, Beijing 100081)

Abstract The functional leaves from winter wheat varieties, 14 resistant and 23 susceptible to powdery mildew, were analysed by the electrophoresis technique of peroxidase isozymes. It was found that there were clear differences between their zymograms of peroxidase isozymes from the jointing stage to the earing stage. According to the result presented here, the resistance or the susceptibility to powdery mildew of winter wheat can be easily evaluated with a small amount of leaves before crossing and anther cultivation. Without damaging the growth of the plant, we can identify the resistance of varieties germplasms and breeding materials while conducting the breeding research. So it is a fast way to identify the resistance to the powdery mildew in winter wheat.

Key words: Winter wheat; Peroxidase isozymese; Powdery milldew