

# 晚秋桑树健株与黄化型萎缩病株的同功酶\*

丁正民 蒯元章

(上海师范学院生物系) (中国农科院蚕业研究所)

## 摘 要

对处于休眠期的八个品种桑树韧皮部的过氧化物酶和酯酶同功酶作了分析,未发现抗病性与同功酶之间有相关性。

但是,实验结果指出,“湖桑32号”健株与黄化型萎缩病株的酯酶同功酶有差异,这对诊断和检疫可能有意义。

据报导,植物体内某些可溶性蛋白质,包括过氧化物酶同功酶等,可被视为遗传学的标记,并与种或品种的抗病性有关系<sup>[1;2]</sup>。桑树方面,陈道明等曾对多个品种生长时期的侧芽作过过氧化物酶同功酶的研究<sup>[3]</sup>,但对休眠期的桑树,特别是休眠期桑树病株的同功酶的分析,则至今未见有报导。

为了探究休眠期桑树健株与黄化型萎缩病株的同功酶,我们对“剑持”、“一之漱”、“湖桑32号”、“湖桑39号”、“湖桑35号”、“湖桑199号”、“湖桑7号”和“育2号”等8个品种桑树晚秋已落叶的健株,和黄化型萎缩病株的韧皮部的过氧化物酶和酯酶同功酶作了分析,情况如下:

## 一、材料和 方法

(一) 健株过氧化物酶同功酶聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[4;5]</sup>;

1. 样品处理:十月中旬,于中国农科院蚕业研究所桑田内,取上述8个品种桑树健株(每个品种3株)的枝条,经蒸馏水洗涤后剥取其韧皮部各0.2g,加Tris-甘氨酸电极缓冲液4ml,冰水浴内充分研磨,16,000 R. P. M. 离心10分钟,上清冷冻过夜后再经一次离心,取上清备用。

2. 制凝胶板:用马铃薯淀粉胶和有机玻璃片在板电泳槽上槽两侧的玻板间构成空框,注入浓度为7.5% pH 8.9的聚丙烯酰胺分离胶,室温下聚合后再注入浓度为2.5% PH 6.7的间隔胶,日光灯下聚合。

3. 加样电泳:用滤纸片吸干加样穴内的水分后每穴加样30 $\mu$ l,再加40%的蔗糖液和

\* 上海师范学院生物系77级邓太和、茅国栋、谭慈衡和张莹同志参加部分研究工作。

本文于1983年4月9日收到。

0.1% 溴酚蓝指示剂各一滴。加样后开始电泳；凝胶板上沿为阴极端，下沿为阳极端，30 mA、200~250 V。下稳定电泳 10 分钟后加大电流至 50mA，该条件下持续电泳 4 个小时。

4. 酶带染色、自电泳槽内取出凝胶板，蒸馏水漂洗后加联苯胺——过氧化氢染色液浸泡约 2 分钟，见蓝色酶谱清晰后即倾去染色液，蒸馏水漂洗过后用玻璃纸制成凝胶干片保存。

5. 酶谱扫描、藉日立 (Hitachi) 扫描仪，透光度 0.8，滤色片 540 nm。

(二) 健株与病株的过氧化物酶同工酶比较：

1. “湖桑 32 号”健株样品取自中国农科院蚕业研究所桑田内，“湖桑 32 号”黄化型萎缩病株样品取自江苏省丹阳县横塘公社的重病田。

2. 过氧化物酶同工酶的抽提和聚丙烯酰胺凝胶电泳方法同上。

(三) 健株酯酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳：

1. 样品处理：取上述 8 个品种的健株韧皮部各 0.2 g，加 1.5 ml 电极缓冲液后研成匀浆，其余操作过程与上述过氧化物酶同工酶的抽提方法同。

2. 凝胶电泳方法同上，但酶带染色时改用醋酸- $\alpha$ -萘酯染色液和醋酸- $\beta$ -萘酯染色液。该两染色液的配方：

① 醋酸- $\alpha$ -萘酯 20 mg 溶于 2 ml 丙酮中，加入 0.1 MPH 6.4 的磷酸缓冲液 20 ml，再加坚牢蓝 20 mg。

② 醋酸- $\beta$ -萘酯 20 mg 溶于 2 ml 丙酮中，加入 0.1 MPH 6.4 的磷酸缓冲液 20 ml，再加坚牢蓝 20 mg。

(四) 健株与病株的酯酶同工酶比较：“湖桑 32 号”健株与黄化型萎缩病株的取样和酯酶同工酶的分析方法同上。

## 二、结 果

(一) 8 个品种桑树健株韧皮部的过氧化物酶有差异 (图 1)。“一之濑”和“湖桑 39”的肉眼可见的酶带数多达 11 条，而“剑持”的仅 6 条，其余 5 个品种都见到有 9 条 (图 2)。这 5 个品种肉眼可见的酶带数虽相等，相应酶带的泳动率却有异 (表 1)。

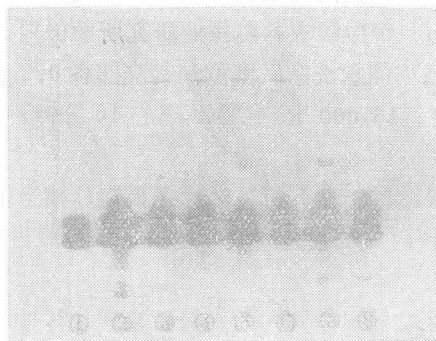


图 1 8 个品种桑树韧皮部的过氧化物酶同工酶 (垂直平板式聚丙烯酰胺凝胶电泳)。

①—剑持；②—一之濑；③—湖桑 32；④—湖桑 39；⑤—湖桑 35；  
⑥—湖桑 199；⑦—湖桑 7 号；⑧—育 2 号。

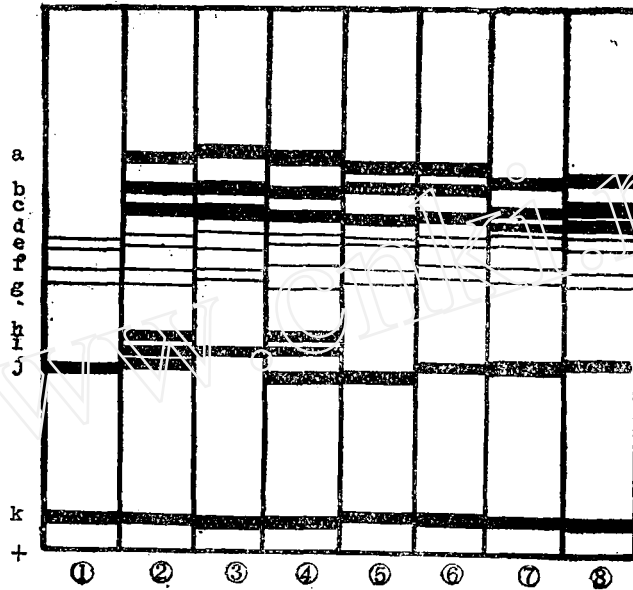


图 2 8 个品种桑树韧皮部的过氧化物酶同工酶谱。图中字母 a、b、…… 分别代表凝胶板阴极端与阳极端之间的酶带；数字代表的品种名称同图 1。

8 个品种桑树韧皮部的过氧化物酶同工酶谱带的相对泳动率 ( $R_m$ ) 表 1

品 种	谱 带											
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	
	$R_m$											
剑 持				0.39	0.41	0.45	0.49				0.67	0.90
一之濑	0.24	0.29	0.33	0.40	0.41	0.46	0.49	0.60	0.62	0.66	0.90	
湖桑 32	0.22	0.30	0.34	0.39	0.41	0.46	0.48		0.63		0.90	
湖桑 39	0.23	0.29	0.34	0.39	0.41	0.45	0.49	0.60	0.63	0.68	0.90	
湖桑 35	0.25	0.28	0.35	0.39	0.41	0.46	0.49			0.68	0.90	
湖桑 199	0.25	0.29	0.34	0.38	0.41	0.45	0.48			0.67	0.90	
湖桑 7	0.28	0.33	0.37	0.39	0.41	0.46	0.49			0.66	0.90	
育 2 号	0.26	0.33	0.36	0.39	0.41	0.47	0.49			0.65	0.90	

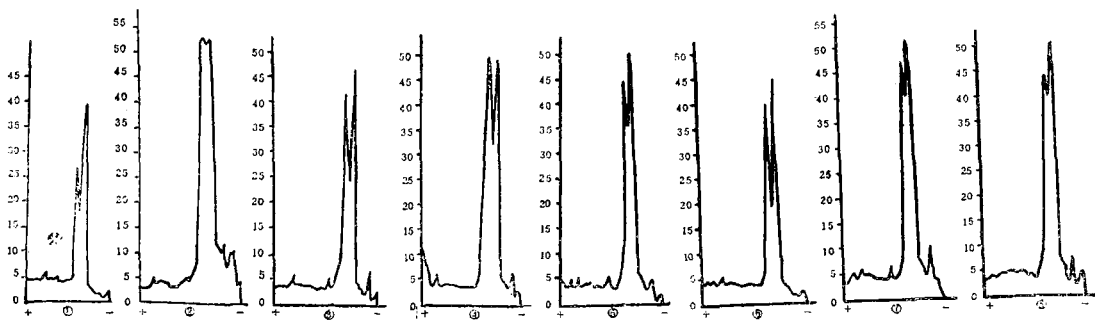


图 3 8 个品种桑树韧皮部的过氧化物酶同工酶谱带扫描图。数字所代表的品种同图 1。

(二) 8个品种过氧化物酶同工酶谱的扫描图象显示, 扫描曲线上所出现的波峰与肉眼所见聚丙烯酰胺凝胶板上的谱带基本上相吻合。每个品种都有2个主要波峰; 除“一之濑”外, 其余7个品种的最大峰值都很接近(图3)。

(三) “湖桑32”健株与病株韧皮部的过氧化物酶同工酶谱带未发现有差异。

(四) 8个品种桑树健株韧皮部的酯酶同工酶谱带未发现有差异。但“湖桑32”健株和病株韧皮部的酯酶同工酶谱有差异。健株的 $\alpha$ -酯酶和 $\beta$ -酯酶同工酶谱均包括5条明显的酶带, 而病株则少1条( $e$ 带), 且其 $d$ 带比健株的淡得多(图4, 5)。

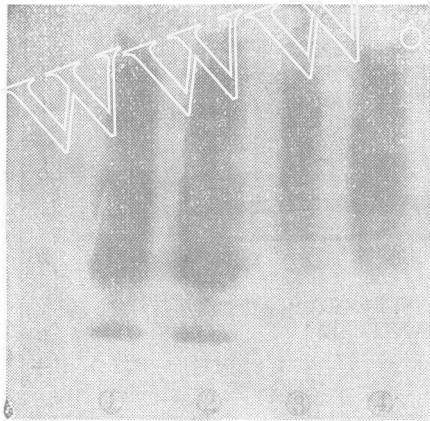


图4 “湖桑32”健株与黄化型萎缩病株韧皮部的 $\alpha$ -酯酶同工酶(垂直平板式聚丙烯酰胺凝胶电泳)。①、②—健株; ③、④—病株。

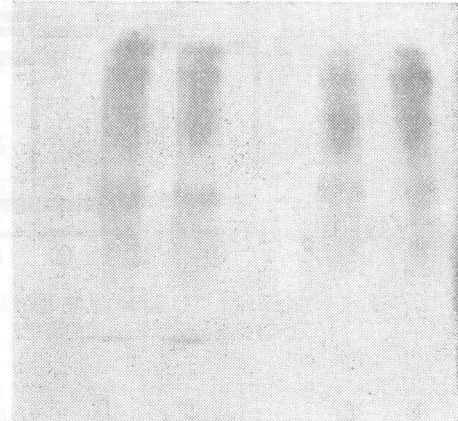


图5 “湖桑32”健株与黄化型萎缩病株韧皮部的 $\beta$ -酯酶同工酶(垂直平板式聚丙烯酰胺凝胶电泳)。①、②—健株; ③、④—病株。

### 三、讨 论

(一) 屡有报导, 处于不同生育期的植物体或同一植物体的不同组织器官内, 同工酶的数量和活性可能有较大的差异。即使是同种植物的幼芽, 萌发程度不同同工酶也会有较大的不同<sup>[6,7,8]</sup>。前已述及, 我们所用的实验材料全部取自晚秋已落叶的桑枝, 当时整个桑株已经逐渐趋于休眠。实验结果表明, 同一品种不同桑株韧皮部的过氧化物酶同工酶谱比较一致, 不同品种之间酶谱的差异比较明显; 从几个桑树品种的酶谱看, 韧皮部的同工酶与侧芽的确实有明显的不同<sup>[3]</sup>。

(二) 桑树萎缩病是我国桑树的流行病。该病大致可分三种类型, 即黄化型、萎缩型和花叶型。上述8个品种的桑树对该三种类型萎缩病的抗性有差异<sup>[9]</sup>(表2); 但从休眠期健株韧皮部的过氧化物酶同工酶谱来看(图1、2、3, 表1), 并没有发现抗性与酶带的数量或位置之间有相关性。

(三) 桑树黄化型萎缩病由类菌原体(MLOs)所引起<sup>[10,11]</sup>。类菌原体能影响寄主体内的过氧化物酶同工酶; 例如夏季月季绿瓣病株过氧化物酶同工酶的活性比健株的低得多, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳后肉眼几乎不能察见酶带<sup>[12,13,14]</sup>。上述“湖桑32”健株与病株的酶谱未发现明显的差异, 可能是由于晚秋桑株内的类菌原体已逐渐丧失其活性<sup>[15]</sup>, 病原对桑株顶端韧皮部过氧化物酶同工酶的影响也逐渐减退了。

8 个桑树品种对萎缩病的抗性\* 表 2

品 种	抗 性		
	黄 化	萎 缩	花 叶
剑 持	-	-	-
一 之 濼	-	-	+
湖 桑 32 号	-	++	++
湖 桑 39 号	+	-	+
湖 桑 35 号	+	++	-
湖 桑 199 号	+	+	+
湖 桑 7 号	+	+	+
育 2 号	++	+	未发现

\* 表中-: 易感; +: 抗; ++: 高抗。

(四) 在过氧化物酶同功酶谱中, *d*、*e*、*f*、*g* 等酶带特别浓, 并有明显的“拖尾”现象。据报导, 聚乙烯吡咯烷 (Polyvinylpyrrolidone) 能消除多酚类等对这类实验的干扰<sup>[16]</sup>, 但试用后效果不理想; 因为这几条酶带的显色虽得到了改善, 但其它酶带的显现却困难了。

(五) 在过氧化物酶同功酶谱中, *d*、*e*、*f*、*g* 和 *k* 带的存在反映了 8 个桑树品种的同源性(图 2)。湖桑 32、湖桑 35、湖桑 199、湖桑 7 号和育 2 号这 5 个品种过氧化物酶同功酶谱的相似, 反映了同属于鲁桑系统的品种遗传学相似性。湖桑 39 与一之濼的酶谱很相似, 也和一之濼属于白鲁桑系统相吻合<sup>[3]</sup>。但是必须指出, 育 2 号(湖桑 7 号×广东荆桑)的酶谱却又未能反映出广东荆桑的特异性。可见, 同功酶谱虽有助于鉴别桑树的品系和了解品种之间的亲缘, 但它毕竟不能作为唯一的指标用。

(六) 上述 8 个品种桑树韧皮部的酯酶同功酶未发现差异, 这可能是由于样品内酯酶的活性均偏低, 某些特异性的酶带没有能够得到显示; 也可能是由于, 酯酶系直接的基因产物而并非生理性的修饰酶带, 因而是动植物体的比较稳定的一类同功酶<sup>[17,18]</sup>, 在某些情况下酯酶不易反映出品种之间的差异。

(七) 湖桑 32 号黄化型萎缩病株的  $\alpha$ -酯酶和  $\beta$ -酯酶同功酶谱均不同于健株的, 明显地缺少健株酶谱中的 *e* 带, 且 *d* 带比健株的淡得多(图 4, 5)。这点是值得注意的。如上所述, 酯酶是较为稳定的一类同功酶, 常被人们藉以推断种或品种间的亲缘关系<sup>[19]</sup>; 地域生态条件似不会对酯酶同功酶产生这样大的影响。当然, 这一差异在诊断学和检疫方面的意义还有待于进一步证实, 因为我们所取用的病株样品毕竟是不同地区田间的自然发病株, 对于桑株病理生理状况也缺乏比较全面的分析。

### 参 考 文 献

- [1] Ahl, P., A. Cornu, and S. Gianinazzi: *Phytopathology*, 72(1): 80~85; 1982.
- [2] 沈其益等: *植物学报*, 20(2): 108~113; 1978.
- [3] 陈道明、黄敏仁、孙晓霞、潘一乐、吴朝吉: *蚕业科学*, 6(2): 129~131; 1980.
- [4] 吴少伯: *植物生理学通讯*, 79(1): 29~33; 1979.
- [5] Cooper, T. G.: *The Tools of Biochemistry*. John Wiley & Sons, 194~233;

1977.

- [6] 黄寿松、翁坚: 遗传, 2(3): 7~10; 1980.
- [7] 童哲、崔郁英、汪健菊、宋艳茹、李宪章: 植物学报, 22(2): 146~150; 1980.
- [8] 沈乃茹、方永鑫、夏晓敏: 上海师范学院学报(自然科学版), 81(2): 63~68; 1981.
- [9] 蒯元章等: 江苏省 1979 年蚕桑学会论文集; 1979.
- [10] Doi, Y., M. Teranaka, k. Yera, and H. Asayama: Ann. Phytopathol. Soc. Jap., 33: 259~266; 1967.
- [11] 中国科学院上海生物化学研究所、江苏省蚕业研究所桑树保护组: 中国科学, 74(3): 233; 1974.
- [12] 丁正民: 上海师范学院学报(自然科学版), 83(1): 90~97; 1983.
- [13] Whittcomb, R. F. and J. G. Tully(Vol. Ed.): Mycoplasmas III. Plant and Insect Mycoplasmas, Academic Press; 1979.
- [14] 朱本明: 植物类菌质体病害, 上海科学技术出版社, 1981.
- [15] 川北弘: 日本蚕丝学杂志, 46(5); 1971.
- [17] Wittenbach, V. A. and M. J. Bukovac: J. Amer. Soc. Hort. Sci., 100(4): 387~391; 1975.
- [17] 周光宇、龚葵葵、王自芬: 遗传学报, 6(4): 405~413; 1979.
- [18] Agatsuma, T. and N. Suzuki: JPN. J. Med. Sci. Biol., 33(5): 249~254; 1980.
- [19] Nakai, Y.: Proceedings of the 5th International Wheat Genetics Symposium, Vol. I, Indian Society of Genetics & Plant Breeding, p. p. 108~119; 1979.

## The Isoenzymes of the Late Autumn Mulberry Healthy Plants and Plants Infected with Yellow Dwarf

*Ding Zhengmin*

*(Shanghai Teachers College)*

*Kuai Yuanzhang*

*(Institute of Silk Worms, Chinese Academy of Agricultural Sciences,  
Zhenjiang, Jiangsu Province)*

### Abstract

After the assay of the peroxidase and esterase isoenzymes in the phloem of eight mulberry varieties in rest stage, no relativity is found between the resistance and isoenzymes.

However, the experimental result of "Husang 32" shows the distinction between the esterase isoenzymes of the healthy plants and plants infected with yellow dwarf. This might be significant in diagnosis and quarantine.