

# 玉米弯孢菌叶斑病菌致病性分化的等位酶及蛋白分析

鄢洪海

(青岛农业大学 农学与植保学院, 山东 青岛 266109)

**摘要:** 利用同功酶电泳技术对采自国内的 23 个玉米弯孢叶斑病菌菌株进行可溶性蛋白以及 SOD、EST、PPO、MDH、POD 等酶系分析, 发现不同菌株间存在差异; 对菌株进行聚类分析, 结果表明, 在连锁距离 0.36 上将所有菌株聚合在一起, 大致可以分成 7 个组, 与病菌致病性分组有些一致或相近, 但也有些不同或关系不密切。

**关键词:** 玉米弯孢叶斑病菌; 生理分化; 同工酶

中图分类号: S435.131 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)增刊-0255-03

## *Curvularia lunata* in Maize Physiology the Person Who Splits up Dissolubility Protein and Researcies with Workman's Ferment

YAN Hong-hai

(College of Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

**Abstract:** The analysis of the dissolubility albumen, SOD, EST, PPO, MDH, POD for 23 corn *Curvularia lunata* plucked from domestic was obtained by the isoenzyme electrophoresis technique. The results show that there is much difference among different fungus. The findings obtained by cluster analysis on these fungus show that the fungus may generally be divided into 7 series when they get together by all stems on 0.36 to the stem in the linked together.

**Key words:** *Curvularia lunata*; Physiological differentiation; Isozyme

玉米弯孢菌叶斑病 (*Curvularia lunata* (Wakker) Boed.) 是近年来我国玉米上发生的一种新的叶部病害, 其危害性已经超过玉米大、小叶斑病, 成为玉米主要病害之一。产生这一结果的主要原因是病菌致病性变异而导致品种抗病减弱甚至抗性丧失<sup>[1]</sup>。虽然玉米弯孢叶斑病菌致病性分化已利用寄主作了初步鉴定, 对菌群类型有了一定了解<sup>[2]</sup>, 但由于环境因子的影响和鉴别寄主抗病遗传背景不清, 还难以全面反应出病菌分化实际水平<sup>[3]</sup>。

本研究采用同工酶电泳技术研究了玉米弯孢叶斑病菌致病性遗传变异与同工酶关系, 想从病菌的致病性分化基础代谢物质的生理生化方面做一个分析认识。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

用于同工酶分析的玉米弯孢叶斑病菌采自辽宁、吉林、北京、河北、山东等我国玉米主产区, 共计

23 个菌株, 菌株编号、采集地点、时间、电泳排序详见表 1。

### 1.2 同工酶电泳样品制备及电泳

用消毒打孔器在 PDA 平板上打出供试菌株的菌饼, 将其放入 PD 培养液中, 于 25℃ 80 r/min 振荡培养箱中进行培养, 7 d 后取出, 用双层纱布滤出菌丝, 剔除菌饼并用蒸馏水反复冲洗 3 次, 吸干菌体表面水分, 取 1 g 菌丝放于预冷研钵中, 加 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 2 mL 及少许石英砂, 在冰浴条件下, 充分研磨成匀浆后, 将匀浆转入离心管中, 于 12 000 r/min 4℃条件下在日立 CS150GXL 高速离心机上离心 30 min, 上清液即为样品, 转入到新的离心管存于冰箱中用作电泳。

病菌可溶性蛋白质及同工酶电泳参照胡能书的方法制胶、电泳分离、染色, 略加改进。

### 1.3 电泳图谱的聚类分析

酶谱分析时对各菌株的同工酶电泳结果采用有酶带记为 1, 无酶带记为 0 的方法, 形成数据表后,

收稿日期: 2009-01-13

基金项目: 国家“九五”科技攻关项目 (96005010303); 青岛市自然科学基金项目 (05-JC-55)

作者简介: 鄢洪海 (1964-), 男, 山东德州人, 副教授, 博士, 主要从事植物病理生理学教学和科研工作。

表 1 病菌同工酶电泳的供试菌株			
Tab. 1 Isolates of <i>C. lunata</i> for isozyme electrophoresis			
菌株代号 Code of isolate	电泳序号 Sequence in electrophoresis	采集地点和时间 Location and time for isolate collection	
98-01	1	绥中 Suizhong	1998
98-16	2	哈尔滨 Harbin	1998
98-17	3	瓦房店 Wafangdian	1998
98-15	4	承德 Chengde	1998
98-02	5	昌图 Changtu	1998
98-03	6	公主岭 Gongzhuling	1999
98-10	7	瓦房店 Wafangdian	1998
98-18	8	瓦房店 Wafangdian	1998
98-12	9	瓦房店 Wafangdian	1998
98-19	10	丹东 Dandong	1998
98-28	11	保定 Baoding	1998
98-07	12	沈阳 Shenyang	1998
96-05	13	延庆 Yanqing	1996
98-06	14	成都 Chengdu	1998
96-01	15	顺义 Shunyi	1996
98-14	16	营口 Yingkou	1998
98-41	17	莱州 Laizhou	1998
98-36	18	济南 Jinan	1998
98-11	19	瓦房店 Wafangdian	1998
98-25	20	滦县 Luaxian	1998
98-05	21	鞍山 Anshan	1998
98-30	22	新乡 Xinxiang	1998
98-04	23	左家 Zuojia	1998

输入 SATISTIC 统计软件, 按公式  $S = (N_X + N_Y) / \text{TOTAL}$  计算相似系数 ( $N_X$  代表两者都是 1 的数据数,  $N_Y$  代表两者都是 0 的数据数, TOTAL 为数据总数), 采用 UPGMA 法进行聚类分析, 绘出聚类分析图。

2 结果与分析

2.1 病菌可溶性蛋白质和同工酶电泳图谱分析

2.1.1 可溶性蛋白质 (Soluble protein) 供试的 23 个菌株可溶性蛋白质电泳图谱标记比较丰富, 一共有 14 条谱带, 每个菌株都有 4 条以上谱带, 共同谱带 3 条:  $Rf_1=0.05$ 、 $Rf_2=0.06$ 、 $Rf_3=0.08$ , 其余 11 条全部为多态性标记, 占 78.6%。由此可见, 在可溶性蛋白质上供试的 23 个菌株间差异较大, 但不同菌株之间谱带差异程度各有不同。

2.1.2 酯酶 (EST) 酯酶同工酶电泳图谱共计有谱带 16 条, 其中共同谱带只有 2 条, 即  $Rf_{11}=0.59$  和  $Rf_{12}=0.63$  处, 其余均为多态性谱带, 是标记最丰富的同工酶图谱。在供试菌株中 98-03 和 98-10 两菌株电泳图谱最接近, 其余菌株之间谱带差异较大 (图 1-A)。

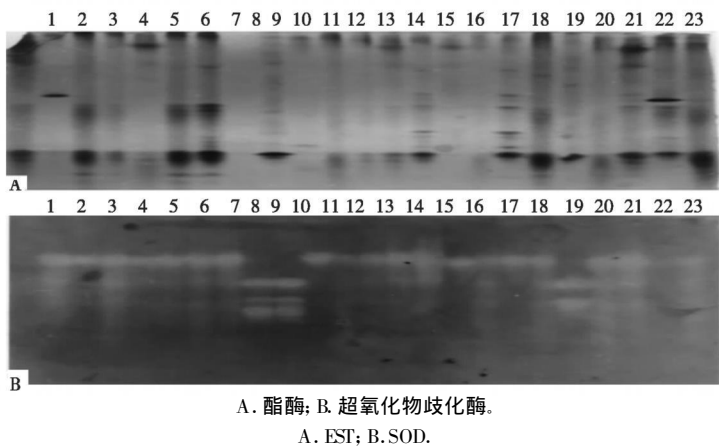


图 1 玉米弯孢叶斑病菌同工酶电泳图谱 (菌株序号: 自左向右, 1~23)

Fig. 1 Isoenzyme patterns of *Cuvularia lunata* in maize leaf spot (Isolate sequence: from left to right, 1-23)

2.1.3 淀粉酶 (Amylase) 病菌淀粉同工酶具有丰富的多态性, 在总共 12 条淀粉酶电泳谱带中, 有 11 条是多态性谱带, 共同谱带只有 1 条  $Rf_8=0.39$ 。谱带相同最多的菌株是 98-01、98-16、96-05、96-01 和 98-05, 有 5 条相同, 其中 1 条是  $\alpha$ -淀粉酶谱带, 4 条  $\beta$ -淀粉酶谱带, 这些菌株的另外一个特点是  $\beta$ -淀粉酶活性很强。

2.1.4 多酚氧化酶 (PO) 供试菌株共有 3 条电泳谱带, 除 98-18、98-12、98-16、98-07 和 98-11 菌株活性很低, 谱带不清外, 其他菌株谱带都有较高相似性。

2.1.5 超氧化物歧化酶 (SOD) 供试病菌菌株共计有 SOD 同工酶电泳谱带 4 条, 有 2 条是共同谱带, 2 条多态性谱带, 在供试的 23 个菌株中除 98-18、98-12 和 98-11 外, 其他菌株 SOD 同工酶电泳谱带相近或相同 (图 1-B)。

2.1.6 苹果酸脱氢酶 (MDH) 供试病菌各菌株总共产生 6~7 条谱带, 其中有 2 条为共同谱带, 清晰明显, 其余谱带较宽但不清晰。菌株 98-01、98-17、98-15、98-28、98-07、98-14、98-11、98-25 和 98-04 图谱相同或相近, 相似性很高, 多数都有  $Rf_2$ 、 $Rf_3$ 、 $Rf_4$  和  $Rf_5$  这 4 条谱带。

2.1.7 过氧化物酶 (POD) 供试 23 个菌株总共产生 PO 谱带 2 条, 其中有一条是共同带, 另外菌株 98-02、98-06、96-01 和 98-14 在  $Rf_2=0.24$  处有一条多态性谱带。

2.2 病菌同工酶水平上的相似性和聚类分析

经数据转换聚类分析,玉米弯孢叶斑病菌在可溶性蛋白和同工酶系水平上菌株间相似系数最高的是98-10和98-03为0.95,最低的是96-01和98-12菌株为0.52,其余菌株介于0.95~0.52之间。各菌株在大约连锁距离0.36水平上聚合在一起,形成树状图,从图上看23个菌株大致可分为7个组(图2)。

3 结论与讨论

病菌在同工酶水平上的生理分化与致病性分化具有一定的相关性。

表2将同功酶测定结果与陈捷等<sup>[2]</sup>致病性测定结果比较发现:致病测定类型A组和同工酶测定类型a组关系密切,两种鉴定结果菌株98-17、98-25、98-28都在其中;98-19菌株是一个特殊的致病类型,98-11和98-18是白化菌株,在同工酶分组也分别单独分开,和致病性测定结果一致,说明利用同工酶电泳技术鉴别玉米弯孢菌叶斑病菌强致病类型菌株及

表2 供试玉米弯孢菌叶斑病菌株致病性分组与同工酶分组比较

Tal. 2 Comparison of grouping by pathogenicity and isozyme zymogram *Curvularia lunata* isolates

致病性组别 Pathogenicity groups	菌株 Isolates	同工酶组别 Isozyme groups	菌株 Isolates
A	98-28 98-17 98-01 98-25 98-07	a	98-17 98-25 98-28 98-14
B	98-36 98-41 98-06 96-05 98-07 98-10	b	98-41 98-06 98-10 98-03
C	98-02 98-30 98-15 97-03 98-05	c	98-30 98-05 96-05 96-01
D	98-04 98-16	d	98-16 98-01 98-02
E	98-19	e	98-19
F	98-11 98-18	f	98-11 98-12 98-18
		g	98-15 98-04 98-36

注:菌株下带“-”为在两种方法分组中对应组相同菌株。  
Note: - Means the common isolate in two groups divided by grouping methods.

病菌致病性分化可能还与其他生理生化因素有关。特别对那些致病性分化不明显的致病类型,同一致病类型的菌株间相似性不很高,差异较明显。表2中如致病类型C中菌株、D组与C组及其他组菌株相关性都不是特别密切。一方面说明病菌发生的致病性分化不仅涉及同工酶还可能涉及其他生理生化因子,另一方面说明有些同工酶分化与致病性可能相关,有些可能不相关<sup>[3,4]</sup>。

病菌同工酶分化与致病类型地理分布无明显相关性。致病类型A组98-25、98-28、98-17、98-07菌株来自不同玉米产区,但同工酶水平亲缘关系较近;而其他分组的菌株也看不出与地理位置的相关性,这与致病性测定的结果反映的基本一致,所以地域差异可能不是造成玉米弯孢叶斑病菌生理分化的主要原因。另一方面也反映出各地玉米品种资源

遗传背景比较特别的菌株方面是一种较好的辅助手段。

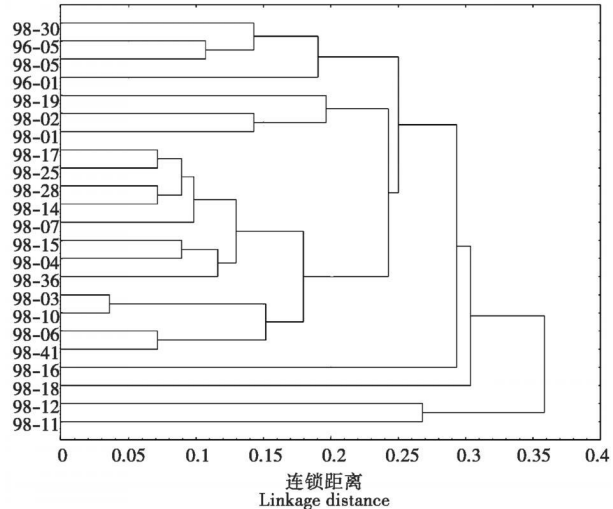


图2 玉米弯孢叶斑病菌在同工酶水平上的聚类分析图  
Fig. 2 Cluster analysis of *Curvularia lunata* in isozyme

遗传背景和病菌致病性分化特点在与地域方面有相似性。

致谢:本研究是在沈阳农业大学农业部北方农作物病害免疫重点开放实验室完成的,中国农科院作物品种资源研究所戴法超和王晓明研究员提供了部分菌株,对他们为试验提供的帮助表示衷心感谢。

参考文献:

[1] 戴法超,王晓明.玉米弯孢菌叶斑病研究[J].植物病理学报,1998,28(2):123-129.  
[2] 陈捷,鄢洪海,高增贵,等.玉米弯孢叶斑病菌生理分化及鉴定技术[J].植物病理学报,2003,33(2):121-125.  
[3] 袁凤杰.大豆灰斑病菌生理小种同工酶分析[J].大豆科学,1998,28(1):39-42.  
[4] 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.