

3 种作物纹枯病菌可溶性蛋白和酯酶同工酶的比较

朱名海 贺晓霞 杨媚 周而勋

华南农业大学农学院/广东省微生物信号与作物病害重点实验室, 广州 510642

摘要 为明确水稻、玉米和小麦纹枯病菌之间的生化差异, 采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 对这 3 种作物纹枯病菌(*Rhizoctonia* spp.) 18 个菌株的可溶性蛋白和酯酶同工酶进行比较。结果发现, 3 种纹枯病菌的可溶性蛋白和酯酶同工酶图谱间均存在显著差异, 其中可溶性蛋白图谱比酯酶同工酶图谱更具多样性。水稻和玉米纹枯病菌可溶性蛋白谱带有 14~19 条, 而小麦纹枯病菌可溶性蛋白谱带 7~9 条; 水稻和玉米纹枯病菌酯酶同工酶谱带有 5~7 条, 而小麦纹枯病菌仅有 3 条, 表明它们之间的差异是明显的。NTSYS 聚类分析结果表明, 水稻、玉米和小麦纹枯病菌菌株可溶性蛋白和酯酶同工酶谱带均具有丰富的多样性。

关键词 纹枯病菌; 水稻; 玉米; 小麦; 可溶性蛋白; 酯酶同工酶

中图分类号 S 435.111.42 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)01-0055-05

丝核菌(*Rhizoctonia* spp.) 是一类土传性的、具有广泛寄主范围的重要植物病原真菌。这类真菌除了可引起很多单子叶和双子叶植物的幼苗猝倒病和立枯病外, 也可引起水稻(*Oryza sativa* L.)、玉米(*Zea mays* L.) 和小麦(*Triticum aestivum* L.) 等农作物的纹枯病, 给农业生产造成了严重的经济损失^[1-3]。其中, 水稻和玉米纹枯病病原为立枯丝核菌(*R. solani*), 而小麦纹枯病则是由禾谷丝核菌(*R. cerealis*) 引起的^[4]。目前, 菌丝融合群分类法是丝核菌最常用的分类方法, 但其不足之处在于不能对融合群间以及融合群内的遗传多样性和种群系统发育信息进行更多的披露, 而真菌菌体的可溶性蛋白和酯酶同工酶电泳等生化技术可弥补这些缺陷^[5-6]。通过对真菌菌体可溶性蛋白和酯酶同工酶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 分析, 可从蛋白质水平上反映出丝核菌种间和种内不同融合群或不同融合亚群间的差异^[7-9], 这些技术在食用和药用菌的分类、鉴定和遗传标记等方面应用广泛^[10-11], 但尚未应用于比较水稻、玉米和小麦纹枯病菌之间的差异。因此, 本研究采用 PAGE 技术, 对水稻、玉米和小麦纹枯病菌的可溶性蛋白和酯酶同工酶进行比较, 旨在明确不同寄主来源的纹枯病菌在生理生化上的差异, 从而为

三大作物纹枯病菌的深入研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

三大作物纹枯病菌供试菌株共 18 株, 其中水稻、玉米和小麦纹枯菌各 6 株, 菌株的详情见表 1。

1.2 可溶性蛋白比较

1) 菌丝体的培养。将保存于 PDA 试管斜面的上述 18 个菌株移接到 PDA 平板培养基上, 在 25 °C 下培养 2~3 d, 然后挑取 5 块菌落边缘处的菌丝块(5 mm) 放入装有 100 mL PDB 培养基的三角瓶中, 封好口后置于摇床中, 25 °C、130 r/min 条件下恒温振荡培养 7 d。用布氏漏斗将菌丝抽滤至干, 用去离子水冲洗 3 次, 即得到备用菌丝体。

2) 菌体可溶性蛋白的提取。2.0 g 菌丝体中加入 pH 7.0 的磷酸缓冲液 2.0 mL, 在冰浴中研磨成匀浆, 然后置于离心机, 在 4 °C、12 000 r/min 下离心 20 min, 所得上清液即为本试验所需的菌体可溶性蛋白溶液, 放置于 -20 °C 冰箱中保存备用。

3) 菌体可溶性蛋白的定量分析。绘制牛血清蛋白标准曲线, 测量粗蛋白样品的 OD₅₉₅ 值, 结合可溶性蛋白的标准曲线, 即可求出各菌株的可溶性蛋白的含量。

收稿日期: 2015-03-16

基金项目: 国家公益性行业(农业) 科研专项(nyhyzx3-16)

朱名海, 硕士研究生。研究方向: 植物病原真菌及真菌病害。E-mail: 1083353468@qq.com

通信作者: 周而勋, 博士, 教授。研究方向: 植物病原真菌及真菌病害。E-mail: exzhou@scau.edu.cn

表 1 三大作物纹枯病菌供试菌株

Table 1 Details of the *Rhizoctonia* spp. from three major crops

菌株编号 Strain No.	分类属性 Classification	寄主 Host	来源 Origin
B226	<i>Rhizoctonia solani</i>	水稻 <i>Oryza sativa</i>	广东茂名 Maoming, Guangdong
B306	<i>R. solani</i>	水稻 <i>O. sativa</i>	广东潮州 Chaozhou, Guangdong
B324	<i>R. solani</i>	水稻 <i>O. sativa</i>	广东连州 Lianzhou, Guangdong
D80	<i>R. solani</i>	水稻 <i>O. sativa</i>	广西玉林 Yulin, Guangxi
D141	<i>R. solani</i>	水稻 <i>O. sativa</i>	广西桂林 Guilin, Guangxi
D180	<i>R. solani</i>	水稻 <i>O. sativa</i>	广西百色 Baise, Guangxi
M1	<i>R. solani</i>	玉米 <i>Zea mays</i>	山东枣庄 Zaozhuang, Shandong
M6	<i>R. solani</i>	玉米 <i>Z. mays</i>	山东泰安 Tai'an, Shandong
M16	<i>R. solani</i>	玉米 <i>Z. mays</i>	山东济宁 Jining, Shandong
M21	<i>R. solani</i>	玉米 <i>Z. mays</i>	四川雅安 Ya'an, Sichuan
M26	<i>R. solani</i>	玉米 <i>Z. mays</i>	四川雅安 Ya'an, Sichuan
M30	<i>R. solani</i>	玉米 <i>Z. mays</i>	四川雅安 Ya'an, Sichuan
W4	<i>R. cerealis</i>	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	江苏淮安 Huai'an, Jiangsu
W8	<i>R. cerealis</i>	小麦 <i>T. aestivum</i>	江苏徐州 Xuzhou, Jiangsu
W10	<i>R. cerealis</i>	小麦 <i>T. aestivum</i>	江苏镇江 Zhenjiang, Jiangsu
W22	<i>R. cerealis</i>	小麦 <i>T. aestivum</i>	河南许昌 Xuchang, Henan
W24	<i>R. cerealis</i>	小麦 <i>T. aestivum</i>	河南驻马店 Zhumadian, Henan
W28	<i>R. cerealis</i>	小麦 <i>T. aestivum</i>	河南鹤壁 Hebi, Henan

4) 菌体可溶性蛋白的电泳分析。采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳。分离胶和浓缩胶的质量/体积(m/V)分别为 12% 和 4%, pH 分别为 8.8 和 6.8。所用的电极缓冲液为 Tris-Glycine 缓冲液(pH 8.3), 每个点样孔的上样量为 100 μg , 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行电泳。电泳开始时, 样品在浓缩胶中的电压为 70 V, 当样品进入分离胶后, 电压提高到 100 V, 电泳时间为 4~5 h。以溴酚蓝作为电泳指示剂。当

前沿指示剂距胶板底边 1.5 cm 时停止电泳。

取出胶板后, 弃掉浓缩胶, 分离胶在清水中漂洗数次后, 以考马斯亮蓝 R250 染色过夜, 再用 7% 冰醋酸脱色(至蛋白条带清晰), 最后观察并拍照。同时测量分离胶前端到指示剂前端的距离(L)和各谱带到分离胶前端的距离(l), 计算迁移率 $Rf = l/L$ 。试验数据的分析采用 NTSYS 软件进行。

1.3 酯酶同工酶比较

1) 菌丝体的培养。菌丝体的培养方法同本文“材料与方法 1.2”中 1)。

2) 酯酶同工酶的提取。基本方法同上, 提取缓冲液为 pH 6.8, 0.05 mmol Tris-HCl 溶液。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min。

3) 酯酶同工酶定量分析。试验方法同本文“材料与方法 1.2”中 3)。

4) 酯酶同工酶电泳分析。在 3% 浓缩胶内, 用 75 V 电泳 30 min; 在 8% 分离胶内, 用 110 V 电泳 4~5 h, 整个电泳过程在 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中进行。电泳样品点样量为 60 μg 或 100 μg , 以溴酚蓝作为电泳前沿指示剂。电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-Glycine 缓冲系统。

电泳结束后, 取下胶板, 放入酯酶染色液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 15 min 左右至酶带清晰, 用清水漂洗数次, 然后观察电泳结果并拍照, 最后采用 NTSYS 软件进行酶谱分析。

2 结果与分析

2.1 可溶性蛋白电泳

1) 可溶性蛋白电泳结果。水稻、玉米和小麦纹枯病菌可溶性蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析结果如表 2 所示, 3 种作物纹枯病菌菌株的可溶性蛋白谱带存在显著差异。其中, 水稻和玉米纹枯病菌菌株的可溶性蛋白谱带数目较丰富, 为 14~19 条, 而小麦纹枯病菌菌株可溶性蛋白谱带数目为 7~9 条。所有供试菌株共有迁移率(Rf 值)分别为 0.35、0.36、0.41、0.50、0.76、0.81 和 0.89 的 7 条谱带。水稻纹枯病菌菌株共有迁移率分别为 0.25、0.31、0.32 和 0.44 的蛋白条带, 玉米纹枯病菌菌株仅有 1 条迁移率为 0.52 的共同谱带, 而小麦纹枯病菌菌株没有共有的谱带。

表 2 水稻、玉米和小麦纹枯病菌可溶性蛋白电泳结果

Table 2 The electrophoretic results of soluble proteins of *Rhizoctonia* spp. from rice, corn and wheat

Rf	菌株编号 Strain number																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
0.14	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
0.25	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
0.31	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.32	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
0.35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.44	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
0.47	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.52	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
-0.55	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
0.62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
0.64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
0.67	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
0.71	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.76	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.81	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.85	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
0.89	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.91	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

注:表中的+、-分别代表不同迁移率电泳谱带的有无;1~18 菌株编号依次是 B226、B306、B324、D80、D141、D180、M1、M6、M16、M21、M26、M30、W4、W8、W10、W22、W24 和 W28,其中 1~6 为水稻纹枯病菌菌株,7~12 为玉米纹枯病菌菌株,13~18 为小麦纹枯病菌菌株。下表同。Note:“+”和“-” in the table represent the presence and absence of electrophoretic bands with different mobility rates; 1-18 are the strain numbers in order: B226, B306, B324, D80, D141, D180, M1, M6, M16, M21, M26, M30, W4, W8, W10, W22, W24 and W28, among them, 1-6 are rice strains, 7-12 are corn strains, and 13-18 are wheat strains. The same as below.

2)可溶性蛋白聚类分析。运用 NTSYS 软件得出相似系数和聚类树(图 1),供试菌株相似系数在 0.52~1.00 之间,说明水稻、玉米和小麦纹枯病菌菌株可溶性蛋白谱带具有丰富的多样性。

在相似系数为 0.52 时,18 个纹枯病菌菌株分为 2 类:水稻和玉米纹枯病菌菌株为一类,小麦纹枯病菌菌株属另一类。当相似系数为 0.74 时,供试菌株又分为 3 类:水稻纹枯病菌菌株、玉米纹枯病菌菌株和小麦纹枯病菌菌株各自为一类。

2.2 酯酶同工酶电泳

1)酯酶同工酶电泳结果。从电泳结果(表 3)来看,3 种作物纹枯病菌酯酶同工酶谱带差异显著。水稻和玉米纹枯病菌菌株的酶带较多,可辨别的酶带有 5~7 条;小麦纹枯病菌菌株的酶带只有 3 条。水稻、玉米和小麦纹枯病菌菌株共有 1 条迁移率(Rf 值)为 0.58 的谱带。水稻和玉米纹枯病菌菌株共有迁移率分别为 0.18、0.22 和 0.58 的酯酶同工酶谱带,而小麦纹枯病菌菌株共有迁移率分别为 0.11、0.58 和 0.60 的条带。

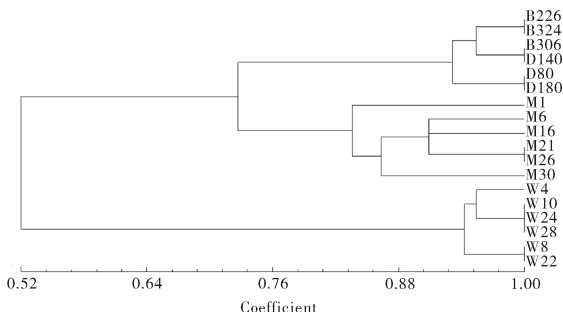


图 1 水稻、玉米和小麦纹枯病菌可溶性蛋白聚类分析
Fig.1 The soluble protein dendrogram of *Rhizoctonia* spp. from rice, corn and wheat

表 3 水稻、玉米和小麦纹枯菌酯酶同工酶电泳结果

Table 3 The electrophoretic results of esterase isozymes of *Rhizoctonia* spp. from rice, corn and wheat

Rf	菌株编号 Strain number																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
0.11	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
0.22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
0.29	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.33	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
0.44	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
0.58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.60	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
0.71	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2) 酯酶同工酶聚类分析。运用 NTSYS 软件得出相似系数和聚类树(图 2), 供试菌株相似系数在 0.39~1.00 之间, 说明水稻、玉米和小麦纹枯病菌菌株酯酶同工酶谱带具有丰富的多样性。

在相似系数为 0.39 时, 18 个纹枯病菌菌株分为 2 类: 水稻和玉米纹枯病菌菌株为一类, 小麦纹枯病菌菌株属另一类。当相似系数为 0.60 时, 供试菌株亦分为 3 类: 水稻、玉米和小麦纹枯病菌菌株各自为一类。

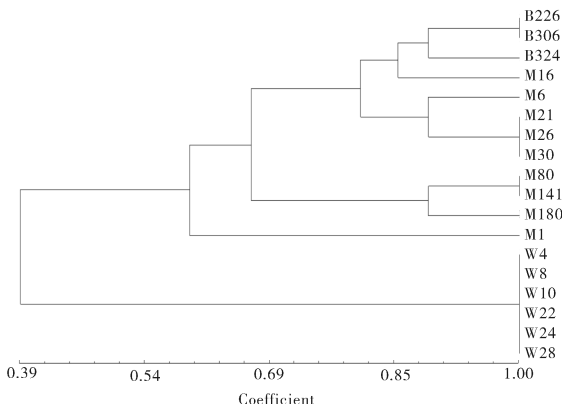


图 2 水稻、玉米和小麦纹枯病菌酯酶同工酶聚类分析
Fig.2 The esterase isozyme dendrogram of *Rhizoctonia* spp. from rice, corn and wheat

3 讨论

Reynolds 等^[12]对立枯丝核菌 (*R. solani*) AG-1~AG-5 菌株的可溶性蛋白进行了电泳分析, 结果表明: 同一融合群内菌株之间的蛋白质图谱存在着较大的相似性, 但融合群间差异显著; 同时还发现 AG-1 融合群内不同菌株间也存在不同的电泳图谱。李华荣等^[13]和张敦华等^[14]分别对双核丝核菌 (binucleate *Rhizoctonia*) 多个融合群的可溶性蛋白和同工酶进行电泳分析, 也发现了同一融合群菌株

之间的可溶性蛋白和同工酶图谱具有相似性, 而不同融合群菌株之间的差异明显。赵桂东等^[8]比较了立枯丝核菌 (*R. solani*) 和禾谷丝核菌 (*R. cerealis*) 多个融合群及亚群的同工酶电泳图谱, 结果表明立枯丝核菌和禾谷丝核菌之间以及菌丝融合群或亚群之间的电泳图谱均差异明显, 而与各自对应的融合群或亚群的标准菌株则极为相似。

本研究通过对水稻、玉米和小麦纹枯病菌菌株的可溶性蛋白和酯酶同工酶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 明确了 3 种作物纹枯病菌在可溶性蛋白和酯酶同工酶酶谱上的差异。水稻和玉米纹枯病菌菌株同属于立枯丝核菌的 AG-1 IA 亚群, 但两者在可溶性蛋白和酯酶同工酶酶谱上也存在一定差异。另外, 同一种纹枯病菌的不同菌株, 其可溶性蛋白和酯酶同工酶酶谱也具有明显差异。这些研究结果与前人^[7-8]的报道一致, 具有可靠性。

真菌体内的可溶性蛋白和同工酶都是基因表达后的最终产物, 均能在一定程度上反映出不同菌株间的遗传差异。但由于蛋白质和同工酶的提取过程受环境、人为操作等因素的影响较大, 故为了确保试验结果的稳定性和可靠性, 必须在条件一致的情况下进行试验。

参 考 文 献

- [1] CIAMPI M B, MEYER M C, COSTA M J, et al. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA from soybean in Brazil [J]. *Phytopathology*, 2008, 98(8): 932-941.
- [2] DAS S, SHAH F A, BUTLER R C, et al. Genetic variability and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* associated with black scurf of potato in New Zealand [J]. *Plant Pathology*, 2014, 63(3): 651-666.
- [3] SHU C W, ZOU C J, TANG F, et al. Genetic diversity and

- population genetic structure of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, the causal agent of rice sheath blight, in south China [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2014, 36(2): 179-186.
- [4] 贺晓霞, 曹琦琦, 彭正凯, 等. 3种作物纹枯病菌生物学特性差异的比较[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(1): 55-61.
- [5] 刘力, 葛起新. 立枯丝核菌蛋白质电泳图谱研究 I. 融合群与图谱的相关性[J]. 真菌学报, 1988, 7(3): 175-182.
- [6] 陈集双, 葛起新, 张炳新. 立枯丝核菌可溶性蛋白图谱研究 II. 用等电聚焦电泳比较各融合群及亚群[J]. 真菌学报, 1991, 10(3): 238-245.
- [7] MOHAMMADI M, BANIHASHEMI M, HEDJAROUDE G, et al. Genetic diversity among Iranian isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn anastomosis group 1 subgroups based on isozyme analysis and total soluble protein pattern [J]. Journal of Phytopathology, 2003, 151(3): 162-170.
- [8] 赵桂东, 李清铎. 江苏大麦纹枯病菌酯酶同工酶的测定[J]. 真菌学报, 1993, 12(2): 163-170.
- [9] DAMAJI M, JABAJI-HARE S H, CHAREST P M. Isozyme variation and genetic relatedness in binucleate *Rhizoctonia* species [J]. Phytopathology, 1993, 83(8): 864-871.
- [10] 隋玉龙, 宋慧, 杜金, 等. 灵芝栽培菌株酯酶同工酶的酶谱多样性[J]. 菌物研究, 2013, 11(2): 136-140.
- [11] 方白玉. 粤北野生灵芝与栽培灵芝同工酶及可溶性蛋白的研究[J]. 食用菌, 2013(1): 9-11.
- [12] REYNOLDS M, WEINHOLD A R, MORRIS T J. Comparison of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins [J]. Phytopathology, 1983, 73(6): 903-906.
- [13] 李华荣, 颜思齐. 四川省东、南部稻区纹枯病菌系研究[J]. 真菌学报, 1990, 9(1): 41-49.
- [14] 张敦华, 陈延熙. 双核丝核菌的菌丝融合分类[J]. 植物病理学报, 1986, 16(3): 139-144.

Comparisons of total soluble proteins and esterase isozymes of *Rhizoctonia* spp. from three kinds of crops

ZHU Minghai HE Xiaoxia YANG Mei ZHOU Erxun

Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control /
College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract In order to elucidate the biochemical differences of the sheath blight pathogens among rice (*Oryza sativa* L.), corn (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.), the total soluble proteins and esterase isozymes from 18 strains of *Rhizoctonia* spp. collected from these three crops were analyzed using vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that the patterns of total soluble proteins and esterase isozymes of *Rhizoctonia* strains from three crops were significantly different, of which total soluble protein were more diverse. The band numbers of total soluble proteins from rice and corn strains were 14 to 19, and those from wheat strains were 7 to 9. The band numbers of esterase isozymes from rice and corn strains were 5 to 7, and those from wheat strains were only 3, indicating obvious differences among them. The results of cluster analysis based on NTSYS software showed that the profiles of total soluble proteins and esterase isozymes of *Rhizoctonia* spp. from rice, corn and wheat had a rich diversity. These findings will lay a foundation for the biochemical identification of the crop sheath blight pathogens.

Keywords *Rhizoctonia* spp.; rice; corn; wheat; total soluble protein; esterase isozyme

(责任编辑:边书京)