

# 灰斑病对大豆类囊体膜 蛋白表达的影响<sup>\*</sup>

刘丽君<sup>1</sup> 高明杰<sup>1</sup> 吴俊江<sup>1</sup> 周海梅<sup>2</sup> 王明夫<sup>2</sup>

(1 黑龙江省农科院大豆研究所 哈尔滨 150086 2 宁安农场)

## 摘 要

本文利用 SOD 聚丙烯酰胺凝胶电泳对灰斑病 1 号、7 号小种侵染条件下,大豆类囊体膜蛋白的表达进行分析,提出了灰斑病 1 号小种主要是使感病大豆品种叶肉细胞叶绿体膜蛋白受到损伤,然后使植株发病。灰斑病 7 号小种对大豆的影响主要作用于细胞色素的表达上,使细胞色素不能合成,从而表现出感病反应。而抗病品种则无此反应。

**关键词** 大豆;类囊体膜蛋白;灰斑病

大豆灰斑病是一种真菌病害,它可侵染茎、荚和种子,降低大豆产量,影响大豆品质。近些年,许多学者开展了优质抗源的筛选、抗性鉴定、遗传、抗灰斑病育种等方面的工作<sup>[4-6]</sup>。而关于抗病机制的研究工作甚少。自 Menke(1959)创立了叶绿体类囊体膜蛋白分析技术以来,此项技术已获得了较大的进展,并已广泛应用。类囊体膜蛋白包括 4 个机能的独立多肽复合体,与光合作用、能量代谢密切相关(石田政弘,1977),这些多肽有些是叶绿体编码,有些是核编码,并发现病毒蛋白与叶绿体间质蛋白有一定关系(张环,1984)。本实验旨在通过对感染和没感染 FLS 大豆植株类囊体膜蛋白分析,从生理生化水平上探讨大豆抗病、感病的机理。

## 材料与方法

1.1 供试材料:东农 593 东农 9674 合丰 33 黑农 39 绥农 8 号、绥农 4 号。

1.2 供试菌种:大豆灰斑病生理小种 1 号、7 号,由东北农业大学大豆研究所提供。其品种的抗性反应参见表 1 所示。

1.3 接种与取样:供试材料的每个品种(系)播 24 盆,每盆 4 株,当第三复叶完全展开时,移入接菌池,用超低量喷雾器喷雾接菌。接菌后遮光保湿 24 小时。发病后,3 天内取

<sup>\*</sup> 黑龙江省自然科学基金资助项目

收稿日期 1998-10-12

Received on Oct. 12, 1998

接种和未接种的复叶进行测定,3次重复。

1.4 样品分析方法:采用 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳法,类囊体膜蛋白提取则为 0.4M 蔗糖,40mKCl 5mM Mg Cl<sub>2</sub>, 5mM 巯基乙醇,40mM Tris-HCl, pH7.6 和 25mM KCl, 2.5mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 10mM 巯基乙醇 10mM Tris-HCl pH7.6 样品溶解液: 10% 丙乙醇 2% 巯基乙醇 1.5% SDS 62.5mM Tris-HCl, pH6.8 参照 Mache. R等 (1980)和李继耕 (1982)的方法进行。

1.5 电泳样品的制备:将干燥好的沉淀样品加 2ml缓冲液 D(10% 甘油 2% 巯基乙醇、1.5% SDS 62.5mM Tris pH6.8)溶解,70℃温浴 10分钟,备用。

1.6 电泳:采用不连续双垂直板电泳,分离胶为含 0.1% SDS的 10-20% 的聚丙烯酰胺梯度凝胶 浓缩胶浓度为 4.5%。电极缓冲液:上槽液: 0.192M Glg 0.025M Tris 0.1% SDS,下槽液: 0.19M Glg 0.25M Tris 溴酚兰为指标剂。

1.7 染色、脱色和拍照

0.1考马斯亮兰 R<sub>250</sub>-10% 乙酸-40% 甲醇染色过液,再用 10% 乙醇-40% 甲醇洗脱 24小时 (中间换三次脱色液、黄色滤光片拍照 )

1.8 标准分子量计算:

取 6ml标准蛋白原液 (包涵的蛋白及分子量是:兔肌肉磷酸 b 97,400;牛清白蛋白 (BSA): 66,200;鸡卵清蛋白: 42,699;牛碳酸酐脱水酶: 31,000;大豆胰蛋白酶抑制剂: 21,000;鸡卵白溶菌酶 14,400)放到 Ependorf管内,加 120μl缓冲液 D,70℃水浴 10分钟,点样。分子量的计算:按 Weber. K的方法进行。所采用公式: Log MW= Log k- b Rm 计算分子量 式中: Log k为载距, b为斜率, Rm 为电泳带的迁移率。

结果与分析

1 大豆感染灰斑病 1号小种后,叶片叶绿体类囊体膜蛋白分析  
灰斑病 1号小种侵染不同抗性品种后,感病品种类囊体膜蛋白中 25KD 23KD的蛋白亚基没有表达 而抗病品种这两条多肽仍然存在 (参见图 1)从感病品种的表达来看:黑农 39失去了 25KD 东农 593失去了 29KD这条谱带,而绥农 4号则同时失去了 25KD 23KD这两条谱带。类囊体膜蛋白中 25KD 23KD是属膜的多肽蛋白,含有大致等

表 1 参试大豆品种接种灰斑病 1 7号小种后的抗性表现

Table 1 Resistant reaction of different soybean cultivars inoculated with different physiological races of frogeye leaf spot (FLS)

品种	灰斑病 1号小种	灰斑病 7号小种	品种	灰斑病 1号小种	灰斑病 7号小种
Cultivars	FLS No. 1	FLS NO. 7	Cultivars	FLS No. 1	FLS NO. 7
东农 539 Dongnong 539	抗病	感病	黑农 39 Heinong 39	感病	感病
东农 9674 Dongnong 9674	抗病	抗病	绥农 8 Suinong 8	抗病	抗病
合丰 33 Hefeng 33	抗病	抗病	绥农 4号 Suinong 4	重感	感病

量的叶绿体 a 与 b 的蛋白复合体,相当于 C<sub>PII</sub>,它占膜去垢剂提取物中全部蛋白质的 50%。由此,可以看出:感灰斑病 1 号小种的品种表现叶绿体 a 与 b 的蛋白复合体缺少,导致光合作用减弱

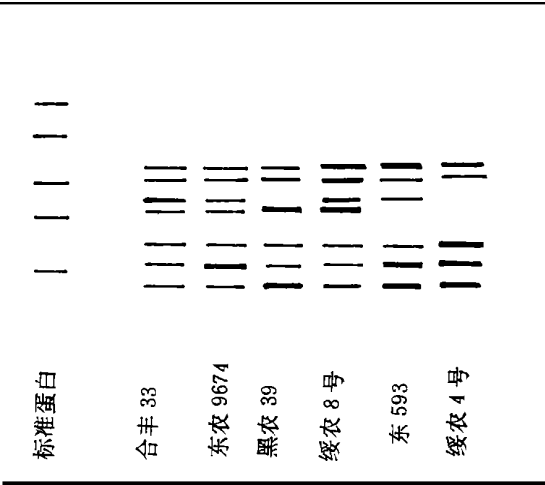


图 1 灰斑病 1 号小种侵染后大豆叶肉细胞类囊体膜蛋白的表达

Fig. 1 Performance of thloroplaat thylakoid membrane protein of soybean cultivars inoculated with FLS No. 1

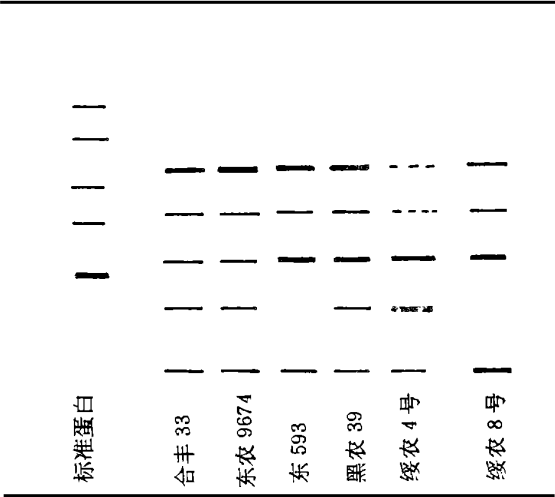


图 2 灰斑病 7 号小种侵染后大豆叶肉细胞类囊体膜蛋白的表达

Fig. 2 Performance of thloroplaat thylakoid membrane protein of soybean cultivars inoculated with FLS No. 7

2 大豆感染 FLS7号小种后,叶绿体类囊体膜蛋白的表达

灰斑病 7 号小种侵染不同抗性品种后,感染品种表现为 19KD 的多肽没有表达。如东农 593 绥农 8 号,19KD 是细胞色素 b<sub>f</sub>复合物中的四个亚基之一,Rieske 缺硫蛋白、细胞色素 b<sub>f</sub>复合物,在 ps- II 与 ps- 1 之间的外环性电子传递的主要途径中作为质体羧

氧化还原酶未起作用。Rieske缺硫蛋白,具有高的电势,可能是核编码。由此看出:灰斑病7号小种对大豆的影响主要作用于细胞色素的表达上,使细胞色素不能合成,从而表现出感病反应。

目前,人们对灰斑病侵染大豆后的感病机理尚无明确的报道,灰斑病侵染大豆后类囊体膜蛋白电泳产生的特异带的进一步研究,有助于阐明大豆感染灰斑病的机理是很有意义的。

## 参 考 文 献

- [1] 李继耕, 1984, 大麦叶绿体突变系的类囊体膜蛋白及叶绿体超微结构的研究《作物学报》
- [2] 李继耕, 1987, 高等植物叶绿体分子遗传学, 北京农业大学出版社
- [3] 石田政弘, 1997, (黄宗瓶译, 1986)光合作用器官的细胞生物学 P4- 5, 科学出版社
- [4] 刘忠堂, 1983, 大豆灰斑病抗病性的遗传分析《大豆科学》(4)
- [5] 张广骅, 1994, 大豆灰斑病粒率的遗传表现《黑龙江八一农垦大学学报》(3)
- [6] 杨庆凯, 1993, 大豆灰斑病菌生理小种的抗性研究《第五届全国大豆学术讨论会交换材料》
- [7] 马淑梅, 1992, 黑龙江省大豆灰斑病研究现状《植物保护》18(4)
- [8] Menke Z., 1958, Naturforsch., 14b 234- 240
- [9] Kutik, J., 1982 Chloroplast development, In chloroplast biogenesis. 51- 54
- [10] Herrmann R. G. et al., 1985, Thylakoid membrane proteins and their genes. In "Molecular form and Function of the plant genome, 233- 255 Louis Von Vloten- Doting G. S. P. Groot & T. C. Holl. NATO AST Series
- [11] Machold O., Simpson. D., Lindberg M. B., 1979, Chlorophyll- proteins of thylakoids from wild- type and mutants of barley (*Hordeum Vulgare* L.) Carlsberg Res. Commun (44): 235- 254

## EFFECT OF PERFORMANCE OF SOJIN A HARA (FROGEYE LEAF SPOT) ON THLOROPLAAT THYLAKOID MEMBRANE PROTEIN IN SOYBEAN

Liu Lijun<sup>1</sup> Gao Mingjie<sup>1</sup> Wu Junjiang<sup>1</sup> Zou Haimei<sup>2</sup> Wang Mingfu<sup>2</sup>

(1 *Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Science*  
2 *Ningan Farm of Heilongjiang*)

### Abstract

Analysis of thloroplaat thylakoid membrane protein of soybean cultivars inoculated with FLS No1, 7 were studied by means of electromorphosis techonology of SDS-PAGE. The results showed that With the inoculation of FLS No. 1, the thloroplaat thylakoid memberane protein of infected- soybean is injured and causes the plant to be diseased. Effect of the FLS No. 7 on soybean leaf is the appearance of cell pigment, so that Hara appear the infected leaf in unable to produce cell pigment. Infected diaease re- action, but the resistant soybean cultivar do not perform such reaction.

**Key words** Soybean; Thloroplaat thylakoid member protein; Frogeye leaf spot (FLS)