

玉米弯孢叶斑病菌多聚半乳糖醛酸酶 *Clpg1* 基因功能验证

崔佳¹, 赵丰舟¹, 刘震², 曲建楠¹, 刘铜^{2*}, 左豫虎^{1*}

(1. 黑龙江八一农垦大学农学院, 大庆 163319; 2. 海南大学热带农林科学院, 海口 570228)

摘要 为明确玉米弯孢叶斑病菌的多聚半乳糖醛酸酶基因 *Clpg1* 在其致病过程中的作用, 采用 Double-joint PCR 技术构建融合片段, 利用 PEG 介导的原生质体转化技术获得 18 株抗潮霉素突变体, 经检测得到 1 株 *Clpg1* 基因敲除突变体 $\Delta Clpg1$ 。通过与野生型菌株比较, 发现 $\Delta Clpg1$ 产孢量和孢子萌发率下降, 多聚半乳糖醛酸酶活性降低, 致病力减弱。这些结果表明 *Clpg1* 基因影响多聚半乳糖醛酸酶活性, 调控了玉米弯孢叶斑病菌的致病性。

关键词 玉米弯孢叶斑病菌; *Clpg1*; 基因敲除; 生物学特性; 致病性

中图分类号: S 432.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018485

Functional verification of polygalacturonase *Clpg 1* gene in *Curvularia lunata* causing maize Curvularia leaf spot

CUI Jia¹, ZHAO Fengzhou¹, LIU Zhen², QU Jiannan¹, LIU Tong², ZUO Yuhu¹

(1. College of Agronomy, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract In order to clarify the role of polygalacturonase *Clpg1* gene in the pathogenicity of *Curvularia lunata*, the fusion fragment was constructed using double-joint PCR, and 18 hygromycin-resistant mutants were obtained by using PEG-mediated protoplast transformation technique. A knock-out mutant $\Delta Clpg1$ which contained no *Clpg1* gene was found. Compared with the wild-type strain, the sporulation yield and germination rate of $\Delta Clpg1$ decreased; the polygalacturonase activity was reduced, and the pathogenicity was weakened. These results indicate that the *Clpg1* gene affects the polygalacturonase activity and regulates the pathogenicity of *Curvularia lunata*.

Key words *Curvularia lunata*; *Clpg1*; gene knockout; biological characteristics; pathogenicity

由新月弯孢 *Curvularia lunata* 引起的玉米弯孢叶斑病是一种严重的叶部病害, 在我国普遍发生, 严重影响玉米产量, 有时甚至超过玉米大斑病和黑粉病引起的损失^[1-2]。研究发现, 新月弯孢存在明显生理分化和致病性变异^[3-4]。多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 是降解植物果胶骨架结构的主要酶之一, 是一类重要的果胶酶^[5-8]。果胶酶在植物病原菌侵染寄主的过程中起重要作用, 是病原菌致病因子之一^[9-11]。Jia 等通过对辣椒疫霉 *Phytophthora capsici* 的毒力和酶活性的试验表明, 辣椒疫霉中的多聚半乳糖醛酸酶及果胶裂解酶等的酶活性在致病性中起主要作用, 随着发病程度加重酶活性升高^[12]。Shieh 等^[13]对黄曲霉 *Aspergillus flavus* 产生的内

切多聚半乳糖醛酸酶 P2 c 进行了研究, 发现 P2 c 有助于黄曲霉对棉铃的侵染和定殖, 导致致病性加剧, 表明 PG 参与黄曲霉的致病过程。Roper 等^[14]则发现糖基水解酶基因家族中 *pglA* 基因编码的 PG 是引起难养木质部小菌 *Xylella fastidiosa* 侵染葡萄 *Vitis vinifera* 必须的关键致病因子, 该基因缺失后 *X. fastidiosa* 无法侵染寄主植物。Ten Have 等^[15]通过对灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 的内切半乳糖醛酸酶 *Bcpg1* 基因进行基因敲除, 发现 *Bcpg1* 基因的缺失导致 PG 的酶含量降低, 其致病力显著降低。值得注意的是, 当紫麦角菌 *Claviceps purpurea* 的两个 PG 基因 *Cppg1* 和 *Cppg2* 被敲除后, 病菌的致病力几乎丧失^[16]。冯晶等^[17]将玉米弯孢叶斑病菌

收稿日期: 2018-11-23

修订日期: 2019-01-06

基金项目: 海南大学高层次人才科研启动基金(KYQD(ZK)1851)

* 通信作者 E-mail: 刘铜 liutongamy@sina.com; 左豫虎 zuoyuhu@163.com

分别接种到玉米抗感两个品种上,发现 PG 在玉米弯孢叶斑病菌侵染过程中可能起重要作用。周舒扬等^[18]对玉米弯孢叶斑病菌进行酶活性的测定,发现病原菌可以产生多聚半乳糖醛酸酶等,PG 分别在第 4 天和第 10 天产生一个峰值,酶活性变化较大,表明 PG 可能与其致病性相关。

本研究通过构建玉米弯孢叶斑病菌 *Clpg1* 基因敲除突变体,分析其对病原菌菌丝生长、分生孢子和附着胞的形态、产孢量和孢子萌发率、多聚半乳糖醛酸酶活性、致病性的影响,旨在明确 *Clpg1* 在病菌致病过程中的生物学功能,为进一步解析玉米弯孢叶斑病菌致病分子机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与材料

野生型玉米弯孢叶斑病菌 DQ-1 保存于黑龙江

八一农垦大学植物病理与应用微生物研究所。玉米‘黄早四’由沈阳农业大学薛春生教授惠赠,质粒 pBHt1 由上海交通大学陈捷教授惠赠。大肠杆菌感受态 DH5 α 购自天根生化科技有限公司,pMD-19T Vector 购自 TaKaRa 公司。

反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time) 和荧光定量试剂盒 SYBRTM Premix Ex TaqTM II(Tli RNaseH Plus)以及 Quick Taq 酶均购于 TaKaRa 公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(离心柱型)、质粒大提试剂盒及全 RNA 提取试剂盒 RNAPrep Pure Plant Kit 购于天根生化科技有限公司,TRIzol 试剂购于 Invitrogen 公司,潮霉素 B 购于 Roche 公司,溶壁酶购于广东微生物所,PEG 4000 购于 MP 公司。引物利用软件 Primer 5 进行设计,由铂尚生物技术(上海)有限公司合成,本研究所用引物见表 1。

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers used in the test

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	用途 Use
GAPDH-F	GACGGCAACAACCTGACT	内参基因
GAPDH-R	CAGTGCTGCTGGGAATGA	
Clpg1-F	CTCATTGCCAACATCCACT	定量 PCR 检测 <i>Clpg1</i> 基因表达量
Clpg1-R	GTTCTCTCGCTCTCTCTT	
Clpg2-F	TCCTGCTGGCACTACTCTG	定量 PCR 检测 <i>Clpg2</i> 基因表达量
Clpg2-R	CATCCACCCTTCTGACC	
Clpg3-F	ATGGTTATTGGCTCTATGGG	定量 PCR 检测 <i>Clpg3</i> 基因表达量
Clpg3-R	TGACGCCTTTGACCTGAA	
Clpg4-F	ACTTCAAGGGCACAACGA	定量 PCR 检测 <i>Clpg4</i> 基因表达量
Clpg4-R	TGACCTGACTCTTCACGCTA	
HPH-F	GGAGGTCAACACATCAATG	扩增潮霉素 <i>hph</i> 基因
HPH-R	CTACTCTATTCTTTGCCCTCG	
Clpg11-F	CCCAGTCCCTACTTCACAG	扩增 <i>Clpg</i> 基因上游片段 UP
Clpg11-R	CATTGATGTGTGTTGACCTCC	
	CACAAGCAAGACCCAACA	
Clpg12-F	CTACTCTATTCTTTGCCCTCG	
	GGTAGAGTGGGCAAGTCG	扩增 <i>Clpg</i> 基因下游片段 DOWN
Clpg12-R	GTTCCAATACGCTAAACATC	
Clpg-F	CCACCCACAGAGCCAATC	PCR/RT-PCR 检测 <i>Clpg1</i> 突变体的 <i>Clpg</i> 基因
Clpg-R	ACGCCAACGCCAACT	

1.2 试验方法

1.2.1 果胶诱导下 *Clpg* 基因的表达分析

选取在 PDA 培养基上培养 7 d 的野生菌 DQ1 菌落,沿边缘打取 5 块直径为 5 mm 的菌饼,分别转接到含有 0.2 g 果胶的 100 mL PD 液体培养基中诱导 DQ-1 的 *Clpg* 基因的表达,28 $^{\circ}$ C,120 r/min 恒温

振荡培养 2、4、6 和 8 d 后,在无菌环境下用无菌水冲洗,收集菌丝,置于一 80 $^{\circ}$ C 保存备用。

总 RNA 的提取及第一链 cDNA 合成:参照说明书采用试剂盒提取总 RNA,一 80 $^{\circ}$ C 保存备用。选用第一链 cDNA 试剂盒进行反转录,反转录后的 cDNA 于一 20 $^{\circ}$ C 保存备用。

荧光定量 PCR:选用 *GADPH* 为内参基因, cDNA 为模板, 引物 *Clpg1-F/R*、*Clpg2-F/R*、*Clpg3-F/R* 和 *Clpg4-F/R* 分别扩增 *Clpg1*、*Clpg2*、*Clpg3* 和 *Clpg4* 基因, qRT-PCR 采用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, Japan) 试剂盒以及 ABI 7500 系统 (Applied Biosystems, 美国) 进行。反应体系步骤按说明书进行, 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算, 试验重复 3 次。

1.2.2 *Clpg1* 基因敲除载体构建

利用 CTAB 法提取野生菌 DQ-1 基因组, 以 DNA 为模板, 引物 *Clpg11-F/R* 扩增 *Clpg1* 基因的上游片段 UP, 引物 *Clpg12-F/R* 扩增 *Clpg1* 基因的下游片段 DOWN, 引物 *HPH-F/R* 扩增 *hph* 基因片段, 并将条带切胶回收, 连接到 pMD19-T simple Vector 载体, 挑选阳性菌落测序。使用 Double-joint PCR 方法构建融合片段, 方法参照宋娜等^[19]略有修改。将上述 UP、HPH、DOWN 片段为模板, 通过 Double-joint PCR 法获得 UP-HPH-DOWN 重组片段。

Double-joint PCR 法分两步。第一步: 将 UP、HPH 以及 DOWN 片段混合进行 PCR 扩增, 反应条件为 95℃ 2 min; 95℃ 30 s, 65℃ 4 min, 72℃ 1.5 min, 15 个循环; 72℃ 10 min; 16℃ 保存。第二步: 将第一步的 PCR 产物用引物 *Clpg11-F/Clpg12-R* 进行扩增, 反应程序为 95℃ 2 min; 95℃ 30 s, 65℃ 4 min, 72℃ 1.5 min, 35 个循环; 72℃ 10 min; 16℃ 保存。

将所得上述片段切胶回收, 连接到 pMD19-T simple Vector 载体, 挑选阳性菌落测序。随后将融合片段 UP-HPH-DOWN 用于原生质体转化。原生质体制备与 PEG 介导原生质体转化方法参照刘铜等^[20]。将原生质体涂布在含有 200 μg/mL 潮霉素的原生质体固体再生培养基平板上, 28℃ 培养 7 d, 然后将新长出来的单个菌落转移到含潮霉素 (200 μg/mL) 的 PDA 平板上进行二次筛选, 再将正常生长的菌落转移到 PDA 平板上, 筛选第 3 次, 如此交替到第 5 代可以正常生长的玉米弯孢叶斑病菌即为转化子。

1.2.3 *Clpg1* 基因敲除突变体鉴定

在 DNA 水平上对突变体进行检测: 以野生菌 DQ-1 和突变体的 DNA 为模板, 利用引物 *HPH-F/R* 和引物 *Clpg1-F/R* 分别检测野生菌与突变体中的 *hph* 基因和 *Clpg1* 基因。

在转录水平上对突变体进行检测: 通过 RT-PCR 技术在转录水平检测。以 cDNA 为模板, 采用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒 Prime Script[™] RT Master Mix (Perfect Real Time) 进行反转录, 以 *GAPDH* 为内参基因, 引物 *Clpg-F/R* 扩增目的基因, 进行 RT-PCR 检测。

1.2.4 生物学特性

菌落和孢子形态: 将野生型 DQ-1、敲除突变体 $\Delta Clpg1$ 和带潮霉素基因的抗性转化子 DQ-ECT 接种在 PDA 平板中央, 28℃ 黑暗条件培养 5 d 后对菌落形态进行观察, 拍照记录, 同时分别制备孢子悬浮液, 显微镜观察孢子形态照相记录, 并对孢子形态进行统计 (每个重复统计 500 个孢子)。设置水平重复, 生物学重复各 3 次。

产孢能力和孢子萌发率测定: 将 DQ-1、DQ-ECT 和 $\Delta Clpg1$ 菌株, 在 PDA 平板上培养 5、7 d 后, 选取 6 个直径为 6 mm 的菌饼放到 10 mL 离心管中, 用 ddH₂O 洗下孢子, 对过滤得到的孢子悬浮液进行孢子产量统计。将培养 7 d 的菌株, 制备浓度为 10⁶ cfu/mL 的孢子悬浮液, 采用悬滴法进行孢子萌发率的统计, 28℃ 倒置培养 3、6、9 h, 观察并记录结果。每个菌株至少观察 3 皿, 试验重复 3 次^[21]。

附着胞形态观察: 将培养 7 d 的 DQ-1、DQ-ECT 和 $\Delta Clpg1$, 分别制备成孢子悬浮液, 调节浓度到一个视野中有 1~2 个孢子为宜。取洋葱内表皮 (约 1 cm × 1 cm) 置于载玻片上, 在其表皮上滴加 20 μL 孢子悬浮液, 28℃ 保湿培养 7.5 h, 显微镜下观察附着胞的形态并拍照。设置 3 次水平重复和 3 次生物学重复^[21]。

1.2.5 $\Delta Clpg1$ 敲除突变体 PG 酶活测定

将菌株 DQ-1、DQ-ECT 和 $\Delta Clpg1$ 在 PDA 培养基上培养 5 d, 分别向每 100 mL 培养液中加入 5 块直径为 6 mm 菌饼, 28℃ 振荡培养 3 d。收集滤液, 10 000 r/min 冷冻离心 30 min, 得到的上清液即为待测酶液^[22]。通过 DNS 法在分光光度计 540 nm 处测定待测液的吸光值, 根据酶反应释放的还原糖计算多聚半乳糖醛酸酶活性。

测定方法: 取底物 0.5 mL 加 1 mL 0.05 mol/L pH=5.0 醋酸-醋酸钠缓冲液和 1% 多聚半乳糖醛酸溶液。50℃ 水浴锅中酶解 60 min 后, 加 3 mL DNS 终止反应, 振荡混匀, 在 540 nm 处测定其酶活。对照在终止反应加入底物, 操作同上, 结果用 U/mL 表示。

1.2.6 致病性检测

取相同叶龄玉米叶片的相同部位,叶片两端用浸湿 6-BA 溶液(10 mol/L)的棉花包裹。致病性检测包括离体叶片的伤口处理及无伤口处理。检测方法参照马炳辰^[21],将培养 7 d 的 DQ-1、DQ-ECT 和 $\Delta Clpg1$ 菌株的 PDA 菌饼(直径为 6 mm)或滴加 10 μ L 浓度为 10^7 cfu/mL 孢子悬浮液(孢子悬浮液中加入 0.02% Tween 20 和 2% 的蔗糖)分别接种在玉米叶片正面,28 $^{\circ}$ C 昼夜交替光照保湿培养。每天观察记录发病情况,设 3 次水平重复和 3 次生物学重复^[21]。

1.3 数据分析

所有数据均使用 SPSS 软件进行差异显著性分

析($P=0.05$),结果用平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 果胶诱导下 PG 基因家族表达分析

玉米弯孢叶斑病菌 *Clpg1*、*Clpg2*、*Clpg3* 和 *Clpg4* 基因在果胶诱导的不同培养时间均有表达。*Clpg1* 和 *Clpg2* 在果胶诱导培养 6 d 时表达量最高,*Clpg3* 和 *Clpg4* 在 4 d 时表达量最高,其中 *Clpg1* 基因表达量最高(图 1)。前期研究也表明 *Clpg1* 基因在病菌与寄主交互 3 h 后表达量最高^[23]。这些结果表明 *Clpg1* 基因在病菌侵染早期可能起重要作用。

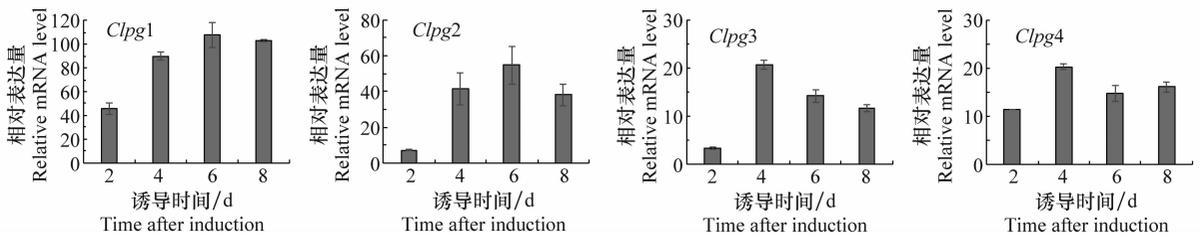


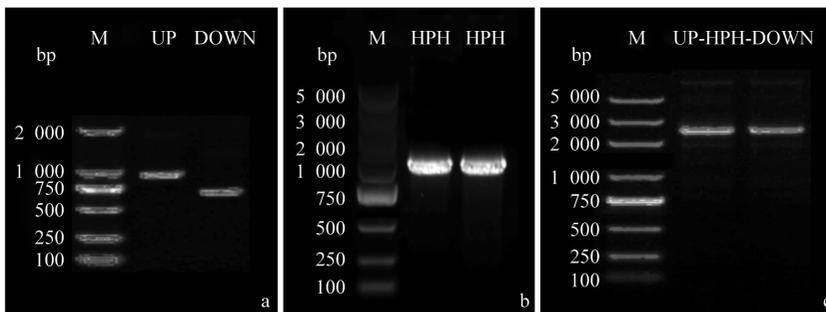
图 1 *Clpg* 基因在果胶诱导不同时期表达情况

Fig. 1 Expression of *Clpg* gene induced by pectin in different periods

2.2 *Clpg1* 基因敲除

以野生型 DQ-1 的 DNA 扩增 *Clpg1* 基因的上下游片段,分别得到 853 bp UP 片段、634 bp DOWN 片段,经测序片段与目的序列一致(图 2a)。

以 pBht1 质粒为模板扩增潮霉素片段,得到 1 343 bp 的 HPH 片段,经测序片段与目的序列一致(图 2b)。回收产物通过 Double-joint PCR 法,构建出一条片段长为 2 830 bp 的融合片段 UP-HPH-DOWN(图 2c)。



a: *Clpg1* 基因 UP、DOWN 片段; b: 潮霉素基因 HPH 片段; c: 融合片段 UP-HPH-DOWN; M: 2 000 bp Marker, 5 000 bp Marker
a: *Clpg1* UP and DOWN fragment; b: Hygromycin gene fragment; c: Fusion fragment UP-HPH-DOWN; M: 2 000 bp Marker, 5 000 bp Marker

图 2 构建 *Clpg1* 基因敲除体

Fig. 2 Construct of *Clpg1* knock-out mutant

经原生质体转化和再生培养基筛选,共获得 19 株潮霉素抗性菌株;将这 19 株菌株放在含有潮霉素 B 和不含潮霉素 B 的 PDA 培养基上交替培养 5 代后,最终获得 18 株抗潮霉素的转化子(图 3)。

经检测,18 株抗潮霉素的转化子中鉴定出 1 株不含 *Clpg1* 基因的转化子(图 4a 和图 4b)。通过 RT-PCR 对 *Clpg1* 基因表达量的分析,发现该突变

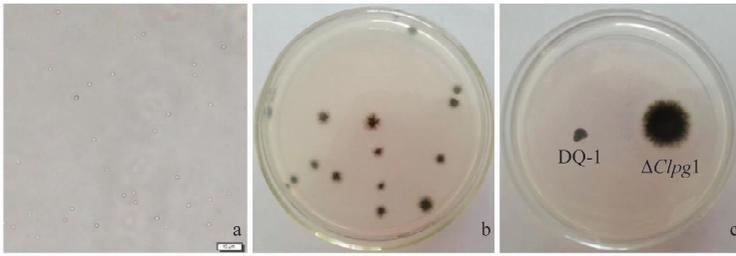
体中 *Clpg1* 基因不表达,表明该转化子为 *Clpg1* 敲除突变体,命名为 $\Delta Clpg1$ (图 4c)。

2.3 生物学特性观察

对野生型菌株 DQ-1、带潮霉素的抗性转化子 DQ-ECT 和敲除突变体 $\Delta Clpg1$ 的生物学特性进行观察。 $\Delta Clpg1$ 敲除突变体菌株在 PDA 培养基上的菌落形态与 DQ-1 存在较小差异。所有菌株菌落均

为墨绿色,但 $\Delta Clpg1$ 没有同心圆环,菌丝较野生型菌株 DQ-1 更致密且平滑,分生孢子形态无差异,附着孢的形成正常(图 5)。通过对产孢量和孢子萌发

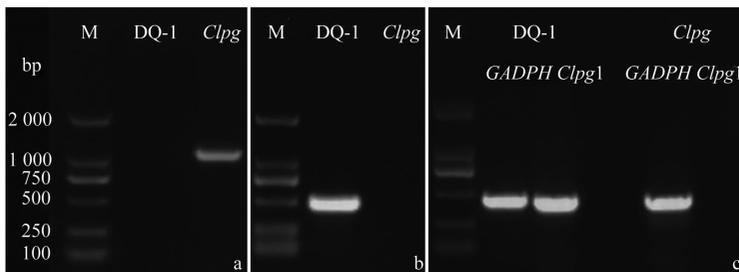
率检测发现 $\Delta Clpg1$ 比野生型 DQ-1 的产孢量和孢子萌发率均显著降低($P < 0.05$)(图 6)。



a: DQ-1酶液处理4 h释放的原生质体; b: 再生培养基上抗潮霉素转化子; c: $\Delta Clpg1$ 和DQ-1在潮霉素PDA中生长
a: Enzymolysis for 4 hours after protoplasts; b: Hygromycin-resistant transformants; c: $\Delta Clpg1$ and DQ-1 with hygromycin in PDA

图 3 *Clpg1* 基因敲除体的筛选

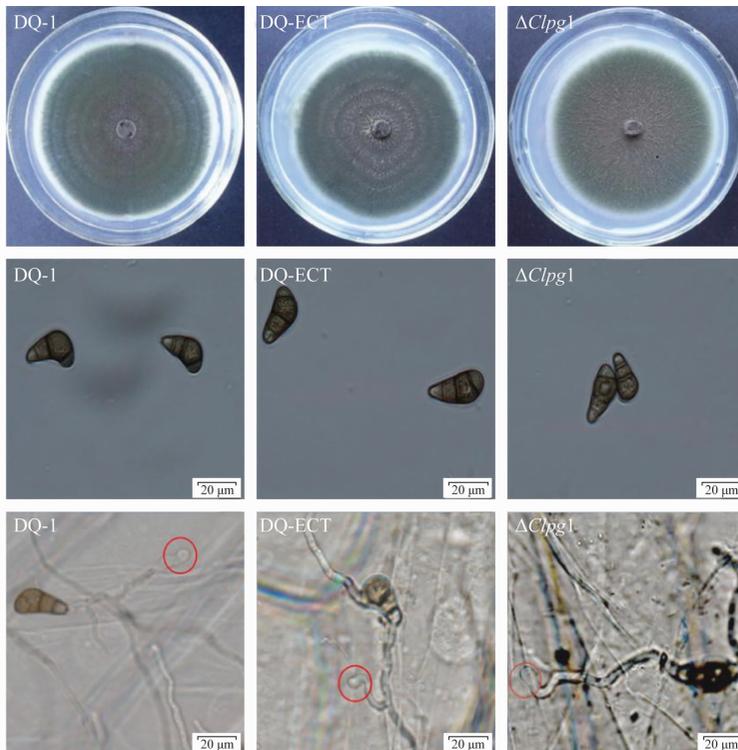
Fig. 3 Screening for *Clpg1* knock-out mutant



a: 潮霉素抗性基因检测; b: *Clpg1* 基因片段检测; c: RT-PCR检测; M: 2 000 bp Marker
a: Hygromycin gene fragment; b: *Clpg1* gene fragment; c: RT-PCR electrophoresis test; M: 2 000 bp Marker

图 4 *Clpg1* 基因敲除体检测结果

Fig. 4 Test results of *Clpg1* knock-out mutant



红圈标注为附着胞形态
Red circle is appressorium

图 5 DQ-1、DQ-ECT 和 $\Delta Clpg1$ 在营养生长和生殖生长间差异

Fig. 5 Differences between vegetative growth and reproductive growth in DQ-1, DQ-ECT and $\Delta Clpg1$

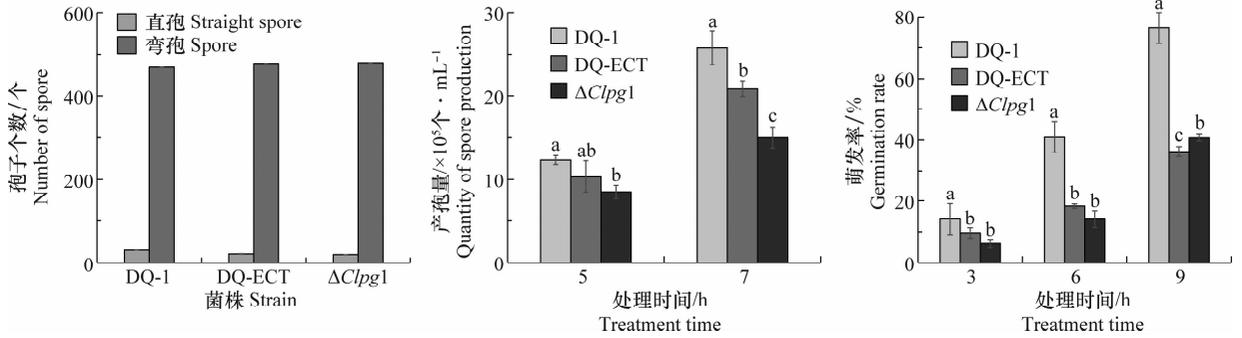


图 6 DQ-1、DQ-ECT 和 $\Delta Clpg1$ 孢子个数、产孢量以及萌发情况统计

Fig. 6 Statistics of spore number, spore production and germination in DQ-1, DQ-ECT and $\Delta Clpg1$

2.4 $\Delta Clpg1$ 多聚半乳糖醛酸酶活性

通过多聚半乳糖醛酸酶活性测定, 结果表明 DQ-1、DQ-ECT 和 $\Delta Clpg1$ 的 PG 酶活性分别为 $(7.80 \pm 0.11)U/mL$, $(8.02 \pm 0.03)U/mL$ 和 $(6.49 \pm 0.21)U/mL$ 。其中 $\Delta Clpg1$ 多聚半乳糖醛酸酶的酶活性比野生型菌株 DQ-1 下调了 16%, 显示 $\Delta Clpg1$ 敲除突变体的 PG 酶活性下降, $Clpg1$ 基因

的缺失影响了多聚半乳糖醛酸酶的活性。

2.5 致病性检测

通过对 DQ-1、DQ-ECT 和 $\Delta Clpg1$ 离体叶片有伤口和无伤口接种处理, 发现孢子悬浮液和菌饼接种后 $\Delta Clpg1$ 的病斑面积都明显小于 DQ-1 的病斑面积(图 7), $\Delta Clpg1$ 敲除突变体对寄主植物的致病性减弱, 表明基因 $Clpg1$ 可能参与了病菌致病性调控。

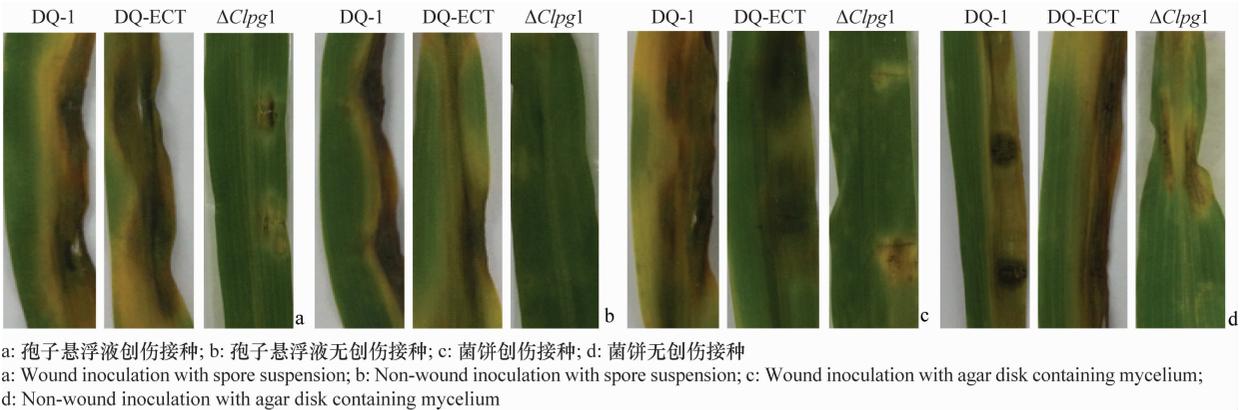


图 7 DQ-1、DQ-ECT 和 $\Delta Clpg1$ 对玉米离体叶片的致病性检测

Fig. 7 Pathogenicity assays of corn leaf segments inoculated with DQ-1, DQ-ECT and $\Delta Clpg1$

3 讨论

目前, 病原菌的细胞壁水解酶参与致病已有许多报道。病原菌产生一系列细胞壁水解酶降解植物细胞壁, 破坏寄主组织细胞, 释放营养物质, 促进病原菌繁殖, 有利于病害的发生。细胞壁水解酶主要包括果胶酶、角质酶和纤维素酶等, 根据作用底物的不同, 果胶酶又分为多聚半乳糖醛酸酶, 果胶甲酯水解酶和果胶裂解酶等^[24]。多聚半乳糖醛酸酶是一种细胞壁水解酶, 在细菌、真菌和植物中普遍存在, 是细菌和真菌降解寄主植物细胞壁的主要酶之一^[25-26]。Williamson 等^[27]首次通过分离纯化树莓果实获得了 PGIP 蛋白, 并且发现可以对灰霉菌的

PG 酶活性产生抑制作用。2005 年巩振辉等^[28]克隆了樟疫霉菌 *Phytophthora cinnamomi* 多聚半乳糖醛酸酶 *Pcpg16* 和 *Pcpg17* 基因。本研究通过荧光定量 PCR 技术发现玉米弯孢叶斑病菌 *Clpg* 基因家族成员在果胶诱导下的不同时期基因均有表达, 且 *Clpg1* 基因表达量最高, 推测 *Clpg1* 在诱发玉米弯孢叶斑病中起重要作用。2009 年 Sun 等^[29]克隆了辣椒疫霉的 7 个 PG 基因, 采用荧光定量 PCR 对叶片内 *Pcipg2* 基因进行检测, 发现在接种后的第 7 天 *Pcipg2* 表达量最高, 并对 *Pcipg2* 基因进行原核表达后接种辣椒健康植株叶片出现病斑, 表明其参与了病原菌的致病过程。本研究利用 Double-joint PCR 法构建了 *Clpg1* 基因的敲除突变体, 通过对表型、

DNA 水平以及转录水平分析,获得了一个 *Clpg1* 基因敲除突变体,通过对突变体的致病力分析,结果表明 $\Delta Clpg1$ 突变体对玉米的致病性有所减弱,暗示 *Clpg1* 基因可能参与了病菌的致病过程。Vallette-Collet 等^[30]研究表明灰葡萄孢的其中一个多聚半乳糖醛酸酶基因的缺失,导致发病延迟且致病性降低 50%~85%。这与本论文 *Clpg1* 基因敲除后致病力减弱的研究结果一致,表明 *Clpg1* 基因参与玉米弯孢叶斑病菌的致病性。然而病原菌在侵染过程中可以产生不同 PG 酶,并且不同的 PG 同工酶在致病性中作用存在差异。本研究鉴定的 4 个基因中,目前只对 *Clpg1* 基因进行敲除并且对其功能进行验证,但是其他 3 种同工酶是否参与功能调控以及致病性,还有待进一步的研究,该研究结果也为后期的试验奠定基础。

4 结论

玉米弯孢叶斑病菌 PG 基因家族成员 *Clpg1* 基因在果胶酶诱导下,6 d 时表达量最高,敲除突变体 $\Delta Clpg1$ 在菌丝生长、产孢量、孢子萌发率等特性上均与野生型 DQ-1 存在差异。与野生型菌株比较,多聚半乳糖醛酸酶活性降低, $\Delta Clpg1$ 致病性减弱,因此推测该基因参与了病原菌的致病性调控。

参考文献

- [1] 戴法超,高卫东,王晓鸣,等.玉米弯孢菌叶斑病的初步研究简报[J].植物保护,1996,22(4):36-37.
- [2] 戴法超,王晓鸣,朱振东,等.玉米弯孢菌叶斑病研究[J].植物病理学报,1998,28(2):28-34.
- [3] GAO Shigang, ZHOU Feihong, LIU Tong, et al. A MAP kinase gene, *Clk1*, is required for conidiation and pathogenicity in the phytopathogenic fungus *Curvularia lunata* [J]. Journal of Basic Microbiology, 2013, 53(3): 214-223.
- [4] XU Shufa, CHEN Jie, LIU Lixing, et al. Proteomics associated with virulence differentiation of *Curvularia lunata* in maize in China [J]. Journal Integrative Plant Biology, 2007, 49(4): 487-496.
- [5] DE VRIES R P, VISSER J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(4): 497-522.
- [6] FONTANA R C, SALVADOR S, SILVEIRA M M. Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005, 32(8): 371-377.
- [7] MERTENS J A, BURDICK R C, ROONEY A P. Identification, biochemical characterization, and evolution of the *Rhizopus oryzae* 99-880 polygalacturonase gene family [J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(12): 1616-1624.
- [8] PERETTO R, FAVARON F, BETTINI V, et al. Expression and localization of polygalacturonase during the outgrowth of lateral roots in *Allium porrum* L. [J]. Planta, 1992, 188(2): 164-172.
- [9] 董章勇,王琪,秦世雯,等.香蕉枯萎病菌 1 号和 4 号生理小种细胞壁降解酶的比较[J].植物病理学报,2010,40(5):463-468.
- [10] COLLMER A, KEEN N T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis [J]. Annual Review of Phytopathology, 1986, 24(1): 383-409.
- [11] BASHI Z D, RIMMER S R, KHACHATOURIANS G G, et al. Factors governing the regulation of *Sclerotinia sclerotiorum* cutinase A and polygalacturonase 1 during different stages of infection [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58(5): 605-616.
- [12] JIA Yongjian, FENG Baozhen, SUN Wenxiu, et al. Polygalacturonase, pectate lyase and pectin methylesterase activity in pathogenic strains of *Phytophthora capsici* incubated under different conditions [J]. Journal of Phytopathology, 2010, 157(10):585-591.
- [13] SHIEH M T, BROWN R L, WHITEHEAD M P, et al. Molecular genetic evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2 c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(9): 3548-3552.
- [14] ROPER M C, GREVE L C, WARREN J G, et al. *Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(4): 411-419.
- [15] TEN HAVE A, MULDER W, VISSER J, et al. The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 11(10): 1009-1016.
- [16] OESER B, HEIDRICH P M, ULRIKE M, et al. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction [J]. Fungal Genetics and Biology, 2002, 36(3): 176-186.
- [17] 冯晶,高增贵,薛春生,等.玉米弯孢霉叶斑病菌产生的细胞壁降解酶的致病作用研究[J].杂粮作物,2002,22(3):164-166.
- [18] 周舒扬,杨洪一,赵敏,等.黑龙江省玉米弯孢菌叶斑病原鉴定及其产细胞壁降解酶和漆酶活性分析[J].玉米科学,2010,18(5):126-130.
- [19] 宋娜,戴青青,宋娜,等.苹果树腐烂病菌 GTP-环化水解酶 II 基因敲除载体构建及其突变体的表型分析[J].中国农业科学,2014,47(15):2980-2989.
- [20] 刘铜.玉米弯孢霉叶斑病毒素致病分子机理研究[D].上海:上海交通大学,2010.
- [21] 马炳辰.玉米弯孢叶斑病菌 Ras 同源蛋白 *Clg2p* 基因的功能研究[D].大庆:黑龙江八一农垦大学,2014.

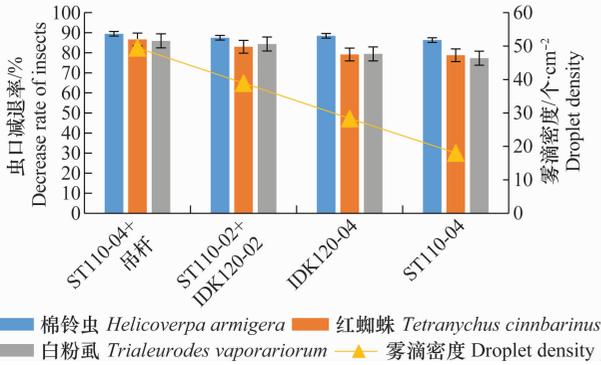


图6 雾滴密度与不同喷头喷雾对棉花害虫的防治效果

Fig. 6 Effects of the droplet density and different nozzle sprays on cotton pests

3 结论

本文通过田间试验测试了7种喷头类型的喷杆喷雾机喷雾雾滴在棉花冠层不同部位的沉积分布,对雾滴在棉花冠层的沉积密度结果和对棉花主要害虫的防治效果进行了分析。结果表明,沉积均匀性依次为ST110-04+双扇面吊杆>ST110-02+IDK120-02>IDK120-02+ST110-02>IDK120-02+IDK120-02>IDK120-04>ST110-04>ST110-02+ST110-02。对害虫防治效果与沉积均匀性保持一致,4种类型的喷头组合防治效果ST110-04+双扇面吊杆>ST110-02+IDK120-02>IDK120-04>ST110-04。综合以上试验结果,分析新型组合喷头的喷雾特性,确定最佳的喷雾组合方式为ST110-02+IDK120-02。

参考文献

[1] 刘国强,鲁黎明,刘金定.棉花品种资源耐盐性鉴定研究[J].作

物品种资源,1993(2):21-22.

[2] 张龙全,陈培坤.改良利用盐碱地种植棉花好处多[J].农业科技通讯,1982(4):12.

[3] 王双双.雾化过程与棉花冠层结构对雾滴沉积的影响[D].北京:中国农业大学,2015.

[4] 初晓庆,张晓辉,范国强,等.棉花植保机械应用现状及发展展望[J].中国棉花,2013,40(7):14-16.

[5] 魏新华,邵晋,解禄观,等.棉花分行冠内冠上组合风送式喷杆喷雾机设计与试验[J].农业机械学报,2016,47(1):101-107.

[6] FOQUÉ D, PIETERS J G, NUYTENS D. Spray deposition and distribution in a bay laurel crop as affected by nozzle type, air assistance and spray direction when using vertical spray booms [J]. Crop Protection, 2012, 41: 77-87.

[7] 时玲,张霞,吴红生.扇形喷头雾量分布均匀性的试验研究[J].云南农业大学学报,2011,26(3):389-394.

[8] 李娟.雾滴直径和喷雾量对茎叶处理除草剂药效的影响[D].北京:中国农业大学,2006.

[9] RAMON H, LANGENAKENS J. Model-based improvement of spray distribution by optimal positioning of spray nozzles [J]. Crop Protection, 1996, 15(2): 153-158.

[10] 徐艳蕾,包佳林,付大平,等.多喷头组合变量喷药系统的设计与试验[J].农业工程学报,2016,32(17):47-54.

[11] ZEMLIČKA J. Agritechnica 2015: Lechler introduces IDTA air injector double flat fan nozzle [EB/OL]. <https://www.farm-equipment.com/keywords/19867-idta-air-injector-double-flat-fan-nozzle>.

[12] 马宁.防飘喷头和标准扇形喷头的喷雾特性比较[D].北京:中国农业大学,2012.

[13] ANSI/ASABE S572. 1-2009, Spray Nozzle Classification by Droplet Spectra [S].

[14] MATTHEWS G A. Pesticide application methods [M]. 3rd edition. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2000.

(责任编辑:田喆)

(上接169页)

[22] 王小敏,吴文龙,闫连飞,等.分光光度计法测定果胶酶活力的方法研究[J].食品工业科技,2007,28(5):226-229.

[23] 刘震,赵丰舟,崔佳,等.玉米弯孢叶斑病菌PG基因家族鉴定与表达分析[J].玉米科学,2018,26(4):166-172.

[24] 赵晓燕,刘正坪.真菌多聚半乳糖醛酸酶研究进展[J].菌物研究,2007,5(3):183-186.

[25] MARKOVIC O, JANECEK S. Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution [J]. Protein Engineering, 2001, 14(9): 615-631.

[26] CARNEIRO J S, DE LA BASTIDE P, CHABOT M, et al. Suppression of polygalacturonase gene expression in the phytopathogenic fungus *Ophiostoma novo-ulmi* by RNA interference [J]. Fungal Genetics and Biology, 2010, 47(5): 399-405.

[27] WILLIAMSON B, JOHNSTON D J, RAMANATHAN V, et al.

Polygalacturonase inhibitor from immature raspberry fruits: a possible new approach to grey mould control [D]. Acta Horticulturae, 1993(352): 601-606.

[28] 巩振辉,吕元红,王晓敏.樟疫霉菌多聚半乳糖醛酸酶16和17基因的克隆,测序及其真核表达研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(6):1-6.

[29] SUN Wenxiu, JIA Yongjian, FENG Baozhen, et al. Functional analysis of *Pcipg2* from the straminopilous plant pathogen *Phytophthora capsici* [J]. Genesis, 2009, 47(8): 535-544.

[30] VALETTE-COLLET O, CIMERMAN A, REIGNAULT P, et al. Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene *Bcpme1* reduces virulence on several host plants [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2003, 16(4): 360-367.

(责任编辑:田喆)