

具有与低致病力有关的 dsRNA 的我国栗疫菌的研究

梁平彦 陈开英

(中国科学院微生物研究所, 北京)

由 *Endothia parasitica* (Murr) And (= *Cryphonectria parasitica* (Murr) Barr) 引起的可致死的栗树溃疡斑, 可以通过接种具有低致病力的胞质基因的菌株加以控制^[1,2]。意大利首先发现天然传播的低致病力菌株, 法国引入低致病力菌株用于生物防治都获得了重建因病而毁灭的栗树林的效果^[3-5]。在北美密执安也得到天然低致病力第一个菌株^[6]。这是真菌中发现的可传递的天然胞质低致病力因子的首次报告。此因子经研究证实是 dsRNA^[7-9]。欧洲与美洲大陆菌株之间 dsRNA 带谱不同, 缺乏序列同源性^[10], dsRNA 的结构及全序列正在研究中^[11]。亚洲菌株中是否存在 dsRNA 一直受到注意, 我国迄今尚无报告。

材料和方法

(一) 菌种来源及培养

自京郊、河北、江苏、浙江、云南等地栗树枝干溃疡斑上或孢子器分离菌种。欧洲及美洲低致病力菌种由美国康涅狄格农业试验站 Dr. Anagnostakis 提供。PDA 培养基 26℃ 培养。

(二) 菌体 dsRNA 提取及检测

基本上按照 Morris 和 Dodds (1979)^[12] 的方法并加以改变。用 Biorad Cellex N-1 纤维素粉。1% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 40V, 电泳 4-6h。

(三) dsRNA 酶解实验

RNase (Sigma 生产, 20μg/ml), 37℃ 保温 10min 后电泳。

结果和讨论

(一) 病害及病菌培养性状

自栗树主要栽植区均采集到病斑, 分离到菌种, 局部地区因病毁林改种, 造成严重损失。菌落多数为深浅不同的桔红色, 具光诱导的同心环状排列孢子器, 少数菌落白色。两类菌落中都得到具 dsRNA 的菌株。如云南六库的白菌落, 大营的桔红色菌落都有 dsRNA, 生长速度较意大利或法国的低致病力菌株 EP747 和 EP713 为快。田

间及室内接种初步检测, 菌株间致病力有明显区别。

(二) 病菌中 dsRNA 的检验

自江苏宜兴、浙江金华等地分离的菌株中, 检测到了 dsRNA 带。以云南菌株为例, 黑龙潭 3 号和 9 号, 石林 1 号和大营 4 号菌丝体中均提取到 dsRNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色显示一条电泳带, 而黑龙潭 7 号除有一条迁移率相同的带外还有一条泳动率快的带(图 1)。

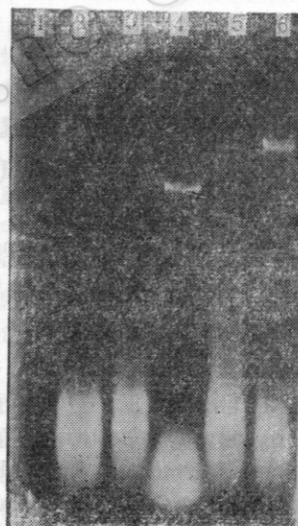


图 1 几株栗疫菌的菌体 dsRNA 1% 琼脂糖凝胶电泳图

1. 黑曲霉病毒 dsRNA; 2. 云南昆明黑龙潭 9 号菌株; 3. 云南大营 9 号; 4. 黑龙潭 7 号; 5. 云南石林 1 号; 6. 黑龙潭 3 号。

(三) 菌体 dsRNA 酶解特性

提取的核酸样品在高离子强度 ($2 \times \text{SSC}$) 下抗 RNase, 而经 106℃, 10min 变性后对 RNase 敏感, 在高离子强度下对 RNase 的抗性, 解链后对 RNase 敏感表明是 dsRNA。

以黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 病毒 dsRNA

本文于 1989 年 2 月 21 日收到。

为分子量参照物 (M.W. 4.0, 2.50, 1.87, 1.70, 1.44×10^6) 推算栗疫病菌 dsRNA 分子量为 $5.0—6.8 \times 10^6$, 这与法国低致病力菌株 EP713 (M.W. 4.6, 5.0, 5.9 和 6.2×10^6)^[6] 及美国低致病力菌株 EPGH₁ (9.0 Kbp, 3.5 Kbp, 0.9 Kbp)^[13] 中的个别片段相近。菌株间的同源性尚待通过分子杂交进一步确定。

已发现欧美大陆间低致病力菌株 dsRNA 带谱可由主要及次要电泳带组成, 而分子量大小, 含量及序列同源性均可不同^[13], 我国具 dsRNA 的低致病力菌株尚需研究及利用。

参 考 文 献

- [1] Anagnostakis, S. L.: *Advances in Plant Pathology*, 6: 123—136, 1988.
- [2] Grenie, J. et al.: *Comp. Rend. Hebd. Seances Acad. Sci(France) Ser. D*, 268: 2347—2350, 1969.
- [3] Grente, J. et al.: *ibid.*, 268: 3173—3176, 1969.
- [4] Grente, J.: *Ann. Phytopathol.*, 7: 216—218, 1975.
- [5] 梁平彦: *世界农业*, 9: 46—47, 1984.
- [6] Garrod, S. W. et al.: *Phytopathology*, 75: 535—538, 1985.
- [7] Anagnostakis, S. L.: *Sciences*, 215: 466—471, 1982.
- [8] Elliston, J. E.: *Phytopathology*, 75: 151—158, 1985.
- [9] Van Alfen, N. K.: *Annu. Rev. Phytopathol.*, 20: 349—362, 1982.
- [10] Brigitte, L. J.: *Gen. Virol.*, 60: 351—355, 1986.
- [11] Tartaglia, J. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83: 9109—9113, 1986.
- [12] Morris, T. J. et al.: *Phytopathology*, 69: 854—858, 1979.
- [13] Tartaglia, J. et al.: in "Viruses of fungi and simple eukarotes", edited by Koltin Y., pp. 283—308, 1988.

A STUDY OF THE dsRNA ASSOCIATED WITH HYPOVIRULENT CHESTNUT BLIGHT FUNGUS IN CHINA

Liang Pingyan Chen Kaiying

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Since the hypovirulent strains of chestnut blight fungus [*Endothia parasitica* (Murr.) And = *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.] associated with dsRNA have been discovered in Europe and United State, the presence or absence of dsRNA in Asian strains are concerned. 140 strains of chestnut blight fungus have been isolated from natural cankers collected from southeast, north and east China. Mycelial extracts in these fungi were analyzed for double stranded ribonucleic acid (dsRNA) content, and one or two bands of RNA with molecular weight of $5.0—6.8 \times 10^6$ Dalton appeared respectively in some of these strains during 1% agarose

gel electrophoresis. The RNA resisted to RNase at a high ionic concentration ($2 \times \text{SSC}$), but are sensitive after being treated with 106°C for 10', and was thus demonstrated as dsRNA.

The present paper is the first report of the presence of dsRNA from Asian strains of chestnut blight fungi. The connection of these unique dsRNA and fungal virulence and the comparison study between these strains and European or American strains are under studying.

Key words

Endothia parasitica; Hypovirulence; dsRNA