

我国和欧美洲栗疫菌低毒株 dsRNA 同源性比较

全 勇 梁平彦 陈开英 周淑敏

(中国科学院微生物所, 北京 100080)

摘要 在发现我国栗疫菌(*Cryphonectria parasitica* = *Endothia parasitica*)含 dsRNA 低毒力菌株基础上, 分别以国内菌株 EpC140 和 EpC32、欧洲低毒株 Ep713 的 dsRNA 为探针, 同欧洲、美洲及亚洲低毒力菌株 dsRNA 进行分子杂交, 结果表明亚洲株同欧洲株之间有序列同源性, 同美洲株之间无序列同源性。

关键词 栗疫菌, 低毒力, dsRNA 分子杂交, 同源性

板栗疫病 (Chestnut blight) 是由栗疫菌 (*Cryphonectria parasitica* = *Endothia parasitica*) 引起的栗树病, 主要表现为树皮及树干发生溃疡, 严重的可导致死亡。此病在国内外都相当普遍^[1,2]。若干年来, 欧美等地用低毒力菌株进行生物防治取得了明显的治疗效果。已有的研究表明, 致病力的强弱是由胞质因子引起的, 其中 dsRNA 起重要作用^[3]。我们研究了国内低毒株的 dsRNA 组分, 并通过分子杂交与国外低毒株的 dsRNA 进行了比较。这是亚洲地区同欧、美大陆栗疫菌低毒株 dsRNA 同源性分析的首次报道。

1 材料和方法

1.1 菌种来源和菌体培养

国内栗疫菌低毒力株 EpC32(云南)、EpC140(广西)、EpC88(江苏)和 EpC100(浙江)由本实验室保存, 菌落特征及致病力见前文^[4,5]。欧洲株 Ep713 及 Ep42[F](法国株)、Ep748 及 Ep747(意大利株)均由美国康涅狄克农业实验站 Dr. Anagnostakis 提供。美国 Virginia 株 Ep915 和 Michigan 株 Ep868 由南京农业大学王克荣同志转赠。

菌体培养在覆有无菌玻璃纸的 PDA 培养皿内, 菌落长成后用刀片将菌丝体自玻璃纸上刮下称重, -20℃ 保存备用。

1.2 菌丝体 dsRNA 提取

根据文献^[6]自植物提取 dsRNA 的方法作了修改。每 10g 冷冻的菌丝体内加 STE (0.1mol/L NaCl, 0.001 EDTA, 0.05 Tris, pH7.0) 缓冲液 10ml, 10% SDS 1ml 及巯基乙醇 0.1ml, 少许金刚砂研磨, 然后加 10ml 苯酚:氯仿:异戊醇 (24:24:1), 冰浴中振荡 20 分钟, 低速离心去沉淀, 上清液调至含 15% 乙醇, 1.25% Bio-Rad Cellex N-1 纤维素粉,

• 中国科学院“七五”重大项目资助。

本文于 1992 年 6 月 30 日收到。

冰浴过夜。离心后沉淀用含 15% 乙醇的 STE 缓冲液洗涤三次,再用 STE 缓冲液洗脱,离心后上清液中加 1/10 体积 2mol/L 乙酸钠(pH6.0),2.5 倍体积 95% 冷乙醇, -20℃ 过夜沉淀核酸。离心后将沉淀真空干燥,悬浮于 2×SSC 缓冲液中,即为 dsRNA 粗制品。

1.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳

4% 凝胶,电压 8v/cm,电泳 9 小时,硝酸银染色。dsRNA 分子量参照物为黑曲霉(*Aspergillus niger*)病毒 dsRNA (AnV-dsRNA),分子量分别为 4.0、2.5、1.87、1.70、 1.44×10^6 道尔顿。

1.4 探针的标记及分子杂交

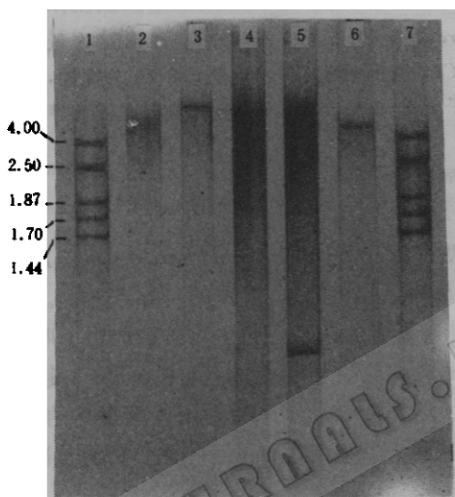


图1 亚洲、欧洲、美洲栗疫菌低毒株 dsRNA 谱带比较

1,7. 分子量参照物,黑曲霉病毒 dsRNA($\times 10^6$);

2,3. 中国低毒株 EpC140, EpC32;

4,5. 欧洲意大利及法国低毒株 Ep748, Ep42(F);

6. 美洲株 Ep915;

Fig. 1 PAGE patterns of dsRNA extracted from Chinese, European and American isolates of *Cryphonectria parasitica*.

Line 1, 7. M. W. Markers, *Aspergillus niger* viral dsRNA;

Line 2, 3. Chinese strains EpC140, EpC32;

Line 4, 5. European strains Ep748, Ep42(F);

Line 6. American strain Ep915.

粗提的 dsRNA 经纯化后用 [γ - 32 P]ATP 末端标记,具体方法见文献[7]。

斑点杂交参照 Garger^[8]的方法。将硝酸纤维素滤膜用无离子水、20×SSC 缓冲液分别处理 5 分钟、烘干。取适量乙醇沉淀的 dsRNA 加 10μl 无离子甲酰胺,100℃ 煮沸 10 分钟,冰浴骤冷。真空抽干后悬浮于 8μl 重蒸水中,点在处理好的硝酸纤维素膜上,灯下烤干,夹在两层新华三号滤纸中于 80℃ 烘 2 小时,置于杂交袋中,加预杂交液(50% 甲酰胺,5×Denhardt's 溶液,5×SSCP 缓冲液(1×SSCP=0.15 mol/L NaCl,0.015 柠檬酸钠,0.01 NaH₂PO₄,pH7.0),0.1% SDS,25μg/ml 变性鱼精 DNA),于 42℃ 预杂交 4 小时。取热变性的 EpC32、EpC140 或 Ep713 探针 10^6 cpm 加入杂交袋中,42℃ 杂交 24 小时。杂交后滤膜分别用 5×SSCP,0.1% SDS;2×SSCP,0.1% SDS;及 0.1×SSCP,0.1% SDS 各洗两次,每次 10 分钟,洗涤温度 42℃,用 X 胶片于 -70℃ 放射自显影 16-24 小时。

2 结 果

2.1 中国的与欧洲栗疫菌低毒株 dsRNA 间的同源性

4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果显示,国内低毒株同欧洲株 dsRNA 均由分子量范围

为 5.0 或 6.0×10^6 道尔顿的带组成,而欧洲株如 Ep42[F]还含有一条分子量较小的片段(图 1)。用国内株 EpC140 制备探针,同欧洲株杂交,结果表明中国低毒株同来自法国、意大利的低毒株 Ep42(F)、Ep748 均有同源性(图 2)。用法国低毒株 Ep713 作探针,同中国低毒株 EpC32 等杂交,也显示出同源性(图 3)。我们用中国低毒株 EpC32 作探针,同欧洲低毒株进行杂交也得到相同结果。中国株同欧洲株虽然 dsRNA 电泳图谱略有差异,但在核酸序列上却有相同部分。

2.2 中国株与美洲株 dsRNA 同源性比较

美洲株 Ep915 的 dsRNA 在 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳上同中国低毒株 EpC140 泳动率相近,都是一条分子量约 5.0×10^6 道尔顿的大分子带。然而用中国株 EpC140 和 EpC32 制备探针分别同美国低毒株的 dsRNA 杂交,表明两者之间没有序列同源性(图 2、图 4)。

2.3 中国低毒力菌株间 dsRNA 同源性比较

自云南、广西、江苏、浙江等地采集的含 dsRNA 的低毒力菌株,虽然地理位置相差较远,形态各异,但都具有分子量为 5.0 或 6.0×10^6 道尔顿的 dsRNA 电泳带。以中国低毒株 EpC32 dsRNA 制备探针,分别同 EpC100、EpC88、EpC140 的 dsRNA 杂交,表明菌株之间 dsRNA 均有同源性(图 4)。

3 讨 论

栗疫菌中 dsRNA 存在导致病菌低毒力是 dsRNA 的参与影响到病原菌对寄主的致病力极其突出的例子^[8,10]。目前发现的栗疫菌低毒株都不同程度地含有 dsRNA,但含量与所含片段数目、大小有所差别,各菌株的形态特征也不相同。由于未发现与低毒力表型相关的共同 dsRNA 组分,有必要研究它们之间的序列同源性。通过低毒力机制的研究,促进了植物病原真菌分子生物学基础研究的发展^[11,12],开辟了病害防治的新途径^[3,13,14]。

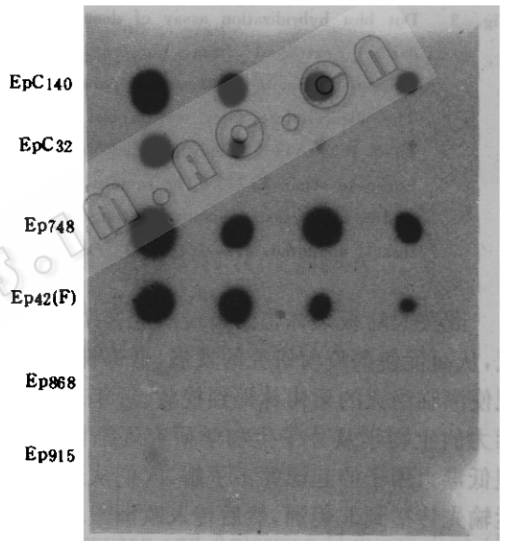


图 2 用斑点杂交比较中国、欧洲、美洲栗疫菌低毒株 dsRNA 的同源性

探针为 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 末端标记中国株 EpC140

自左至右样品稀释度为:原液、1/2、1/4、1/8

Fig. 2 Dot blot hybridization assay of denatured dsRNA extracted from Chinese, European and American isolates of *Cryphonectria parasitica*

The nitrocellulose filter was probed with $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})$ ATP end-labelled dsRNA of Chinese strain Epc140. The samples were spotted in decreasing quantities (from left to right): undiluted, 1/2, 1/4, 1/8.

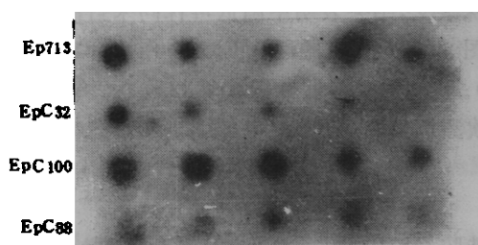


图3 斑点杂交法比较栗疫菌中国株和欧洲株 dsRNA 同源性

探针为欧洲株 Ep713, 以 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 末端标记
自左到右稀释度为原液, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16

Fig. 3 Dot blot hybridization assay of denatured dsRNA extracted from European and Chinese isolate of *Cryphonectria parasitica*. The nitrocellulose filter was probed with ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$) ATP endlabelled dsRNA of European strain Ep713. The samples were spotted in decreasing quantities (from left to right): undiluted, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16.

欧美大陆板栗林曾因栗疫病危害而遭毁灭, 从而促使栗疫菌研究的发展。低毒株的发现使濒临绝灭的栗树林得到挽救。近年来, 低毒力的生物学及分子生物学研究逐渐深入,

但低毒力因子的起源并不了解, 人们从进化的角度设想栗疫菌最早起源于亚洲, 随着苗木运输先传播到北美洲, 然后传入欧洲^[3]。50年代后, 首先在欧洲发现低毒株, 80年代又在美洲发现低毒株。L'Hostis^[15]和 Paul^[16,17]等研究比较了美国株和欧洲株 dsRNA 之间的同源性, 发现两者之间无同源性。我们的研究证明在亚洲存在栗疫菌低毒株, 而且它们的 dsRNA 同欧洲株有同源性, 与美洲株无同源性。此结果与上述设想不一致。栗疫菌传入欧洲可能还存在其它途径, 或栗疫菌传入欧洲美洲后, 在各自环境中与外界相互作用, 通过杂交, 异核体形成及病毒侵染等过程形成现在的低毒力因子。

低毒力菌株用于生物防治, 以其简便、无污染、成本低、效果明显等特点, 日益受到重视。80年代在美国密执安和西维吉尼亚等地先后发现低毒株, 用于治疗美国栗疫病达到良好效果, 而欧洲株却不行。以后 L'Hostis^[15]等研究证明欧美洲低毒株 dsRNA 无序列同源性似乎是欧洲株不能治疗美洲栗疫病最直接的证据。在实验条件下, 欧洲低毒菌株可治疗中国毒力菌株引起的溃疡斑^[5], 这与中国低毒力菌株同欧洲低毒株之间有同源性相一致。至于中国株中是否存在与美洲株同源的含 dsRNA 低毒株尚待研究。

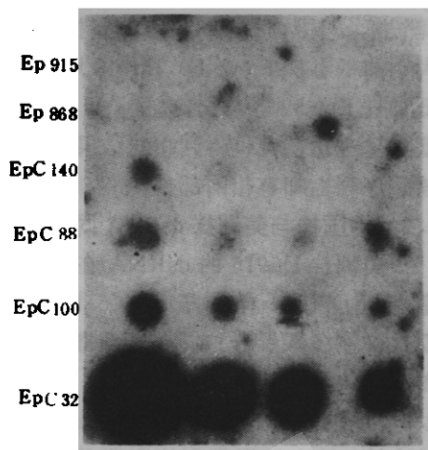


图4 斑点杂交法比较栗疫菌中国株同美国株 dsRNA 同源性

探针为 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 末端标记中国低毒株 EpC32, 自左至右样品稀释度为: 原液, 1/2, 1/4, 1/8

Fig. 4 Dot blot hybridization assay of denatured dsRNA extracted from American and Chinese isolates of *Cryphonectria parasitica*. The nitrocellulose filter was probed with ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$) ATP endlabelled dsRNA of Chinese strain EpC32. The samples were spotted in decreasing quantities (from left to right): undiluted, 1/2, 1/4, 1/8.

参 考 文 献

- [1] 于远斌,等. 森林病虫通讯, 1988, 2: 24—25.
- [2] 陈秀虹. 西南林学院学报, 1988, 1: 68—76.
- [3] Fulbright D W. Biocontrol of Plant Disease, Mukerji K G ed. CRC press, 1988, 121—139.
- [4] 梁平彦,等. 微生物学报, 1990, 30: 73—74.
- [5] 梁平彦,等. 微生物学报, 1992, 32: 253—261.
- [6] Morris T J *et al.* *Phytopathology*, 1979, 69: 854—858.
- [7] 梁平彦,等. 病毒学报, 1990, 6(3): 245—249.
- [8] Garger S J *et al.* *Plant Molecular Biology Report*, 1983, 1: 21—25.
- [9] Hollings M. *Ann Rev Phytopathology*, 1971, 9: 93—118.
- [10] Dodds J A. *Virology*, 1980, 107: 1—12.
- [11] Hiremath S *et al.* *J Gen Virology*, 1988, 69: 2441—2453.
- [12] Choi G H *et al.* *EMBO J*, 1992, 11: 473—477.
- [13] Anagnostakis S L. *Science*, 1982, 215: 466—471.
- [14] Elliston J E. Advance in plant pathology. Ingram, D S, Williams P H ed. Academic Press, 1982, 1: 1—33.
- [15] L'Hostis B *et al.* *J Gen Virol*, 1985, 66: 351—355.
- [16] Paul C P *et al.* *Phytopathology*, 1984, 74: 861.
- [17] Paul C P *et al.* *Phytopathology*, 1985, 75: 1325.

SEQUENCE HOMOLOGY OF dsRNA AMONG CHINESE, EUROPEAN AND AMERICAN HYPOVIRULENT STRAINS OF *CRYPHONECTRIA PARASITICA*

Quan Yong Liang Pingyan Chen Kaiying Zhou Shumin

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Dot blot of dsRNA from Chinese, European and American Hypovirulent (H) strains of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, were hybridized with (γ - 32 P) ATP endlabeled fragments of denatured dsRNA of Chinese and French origins, respectively. The dsRNA from Chinese hypovirulent strains, EpC140 and EpC32, hybridized well with dsRNA from European strains Ep748 and Ep42(F), but not with dsRNA from American strains Ep868 and Ep915. These results confirm similar studies in which European H strain Ep713 was used as a probe.

Key words *Cryphonectria parasitica*, Hypovirulence, dsRNA hybridization, Homology