

文章编号: 1001-1498(2007)02-0283-04

# 韩国、美国和中国栗疫病菌的遗传变异分析

朴春根<sup>1</sup>, Kim Kyung-hee<sup>2</sup>, Lee Sang-hyun<sup>2</sup>, Lee Seung-kyu<sup>2</sup>, Moon Byung-ju<sup>3</sup>

(1 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 10091;

2 韩国国立山林科学院山林病虫害科, 韩国首尔 130-712; 3 东亚大学, 韩国釜山 604-714)

**摘要:** 用 RAPD 方法, 对来自韩国、美国和中国的 26 个栗疫病菌菌株进行了遗传变异分析。使用筛选的 12 个随机引物, 共扩增了 115 个 0.19~3.1 kb 大小的扩增片段, 其中多态性片段占 61%。聚类分析结果, 相似系数为 0.92 时, 26 个菌株分为两大组, 一组由 21 个菌株组成, 包括大部分韩国菌株和美国菌株; 另一组包括部分韩国菌株和中国菌株。表明美国菌株和大部分韩国菌株的遗传相似性很高, 部分韩国菌株有较大的变异, 而中国菌株则表现出了遗传上的远缘关系。

**关键词:** 栗疫病; 寄生隐丛赤壳; 栗树; 遗传变异

中图分类号: S763

文献标识码: A

## Genetic Variation of Strains of *Cryphonectria parasitica* from Korea, USA and China

PIAO Chun-gen<sup>1</sup>, KM Kyung-hee<sup>2</sup>, LEE Sang-hyun<sup>2</sup>, LEE Seung-kyu<sup>2</sup>, MOON Byung-ju<sup>3</sup>

(1 Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2 Department of Forest Diseases and Pests, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea; 3 Faculty of Natural Resources and Life Science, DongA University, Pusan 604-714, Korea)

**Abstract** Genetic variation of 26 strains of *Cryphonectria parasitica* from Korea, USA and China was investigated using random amplified polymorphic DNA (RAPD) of genomic DNA. 115 RAPD bands were amplified by polymerase chain reaction with 12 random primers, and 61% of which were polymorphic; the size of amplified RAPD bands ranged from 0.19 to 3.1 kb. The lineage of 26 strains based on cluster analysis of RAPD bands could be classified as 1 big group and the big group included 17 strains of Korea and 4 strains of USA. From this result it was showed that most strains of Korea were similar to each other and also similar to strains of USA, and the genetic relationship with strain of China was very low.

**Key words** chestnut blight; *Cryphonectria parasitica*; *Castanea* spp.; genetic variation

栗疫病菌 (寄生隐丛赤壳 *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr) 是危害栗树 (*Castanea* spp.) 的主要病原菌之一。自 1904 年在美国首次发现后, 曾给欧美的栗树带来了毁灭性的灾害。在亚洲, 1913、1925 年和 1916 年分别在中国、日本和韩国首次发表了有关该病的记录。在亚洲虽然栗疫病普遍发生, 但并不造

成象欧美那样严重危害, 普遍认为亚洲的栗树品种抗病性较强。但是, 1999 年的调查表明, 在韩国的主要板栗生产区中, 栗疫病的发病率为 66%, 其中栗疫病菌的分离率为 53%, 庆尚南道地区的发病尤为严重<sup>[1]</sup>。在欧洲首次发现栗疫病菌的弱致病力现象后,

收稿日期: 2006-06-02

基金项目: 本研究得到了韩国科学财团 (KOSEF) Brain Pool Program 的资助

作者简介: 朴春根 (1963—), 男, 朝鲜族, 吉林汪清人, 副研究员, 主要从事林业微生物资源工作。E-mail: ckg@caf.ac.cn

作为生物防治的可能途径,做了很多相关研究<sup>[2]</sup>。栗疫病菌弱致病力菌株的细胞质中存在有 dsRNA, 利用含有 dsRNA 的弱致病力菌株进行的生物防治同菌株的细胞融合系有密切关系。较单一的细胞融合系是在欧洲部分地区成功进行生物防治的关键因素<sup>[3]</sup>。用于栗疫病菌遗传变异分析的探针有 dsRNA、分散中度重复序列、线粒体 DNA 等<sup>[4]</sup>。RAPD 方法由于简便的实验方法和较多的多态性扩增产物等特点,广泛应用于包括栗疫病菌在内的病原菌的遗传、进化、分类、连锁分析、基因图谱等研究。SSRs (Simple-sequence repeats)、SRLS UniPrimer 等单引物的开发与利用,使 RAPD 方法更加多样化。本文利用 RAPD 遗传标记,对包括弱致病力菌株在内的韩国、美国和中国的栗疫病菌菌株进行了遗传变异分析,这对栗疫病的生物防治研究将提供基础信息。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

用于本实验的菌株为保存在韩国国立山林科学院树木病理研究室的韩国菌株 21 个(其中 1 个为弱致病力菌株)、美国菌株 4 个(其中 2 个为弱致病力菌株)和中国菌株 1 个,共 26 个(表 1,图 1)。将供试菌株在尼龙滤膜的 PDA 培养基上,24 ℃下培养 15 d,刮取菌丝,风干,-80 ℃保存,待用。

表 1 栗疫病菌供试菌株及其来源

菌株号	来源
FR C-rP1	韩国江原道, Koseong County
FR C-rP2	韩国京畿道, Suwon-City
FR C-rP3	韩国京畿道, Anseong County
FR C-rP4	韩国京畿道, Yicheon-City
FR C-rP5	韩国庆尚南道, Sancheong County
FR C-rP6	韩国庆尚南道, Jinju-City
FR C-rP7	韩国庆尚北道, Kyungju-City
FR C-rP8	韩国庆尚北道, Sangju-City
FR C-rP9	韩国庆尚北道, Cheongdo-City
FR C-rP10	韩国全罗南道, Kwangyang-City
FR C-rP11	韩国全罗南道, Kurum County
FR C-rP12	韩国全罗北道, Jangsu County
FR C-rP13	韩国全罗北道, Yimsil County
FR C-rP14	韩国济州道, Seogwi-City
FR C-rP15	韩国济州道, Seogwi-City
FR C-rP16	韩国济州道, Nam Cheju-County
FR C-rP17	韩国忠清南道, Kongju-City
FR C-rP18	韩国忠清南道, Buyeo County
FR C-rP19	韩国忠清北道, Koesan County
FR C-rP20	韩国忠清北道, Cheongwon County
FR C-rP21	中国北京市怀柔县
FR C-rP22	美国(原菌株号: ep155-2)
FR C-rP23	美国(原菌株号: sb2)
FR C-rP24	美国(原菌株号: uep-1 弱致病性)
FR C-rP25	美国(原菌株号: CP3Q 弱致病性)
FR C-rP26	韩国庆尚南道, Hadong county(弱致病性)



图 1 韩国栗疫病菌供试菌株的采集地(示意图)

### 1.2 DNA 的提取

采用修改的 Lee & Tayler 方法<sup>[5]</sup>,将沉淀 DNA 用 TE 溶解和 RNase A 处理,最后用无菌水定量,-20 ℃下保存。

### 1.3 扩增反应

本实验采用了美国 Operon 公司的随机引物盒和 PE9600 扩增仪(PERKIN ELMER GeneAmp™ PCR System 9600)。20 μL 反应液包括 20 ng 模板 DNA、15 ng 随机引物、1 unit Taq DNA 聚合酶(TAKARA)和 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP。扩增程序为,最初 95 ℃变性 5 min,然后以 94 ℃-1 min,36 ℃-1 min 和 73 ℃-2 min 为 1 个循环,共进行 40 个循环;最后 73 ℃延长 5 min。

电泳和数据分析:用 3% Nusive 3:1 Agarose (EMC Bioproducts USA)和 TBE 缓冲液,120 V 电泳 4 h 用溴化乙锭染色 40 min 和 1 mmol·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> 脱色 1 h 紫外照相,并用 NTSYS-pc (Version 1.80) 的 UPGMA 软件进行聚类分析。

## 2 结果与分析

基于扩增反应的多态性和重复性, 本实验筛选并采用了 12 个随机引物(表 2)。利用 12 个随机引物, 在 26 个供试菌株中共扩增了 115 个扩增片段, 其分子量大小为 0.19~3.1 kb, 多态性扩增片段占 61.7%, 平均每个随机引物获得了 5.9 个多态性扩增片段(图 2)。Wronski 等用随机引物 OPE-G 对奥地利的栗疫病菌进行的 RAPD 遗传变异分析表明, 其平均每个随机引物能获得 8 个多态性扩增片段<sup>[4]</sup>, 说明因筛选的引物不同而所获取的信息量也不同。本实验中, 尚未发现能区别致病力菌株和弱致病力菌株的特异性 RAPD 扩增片段。

表 2 用于 RAPD 分析的引物及其序列

引物号	碱基序列 (5'→3')	DNA 片段数*
OPA-03	AGT CAG CCA C	8(3)
OPA-08	GTG ACG TAG G	12(5)
OPA-11	CAA TCG CCG T	12(11)
OPA-13	CAG CAC CCA C	14(8)
OPA-16	AGC CAG CGA A	13(7)
OPA-18	AGG TGA CCG T	9(9)
OPA-19	CAA ACG TCG G	7(6)
OPE-04	GTG ACA TGC C	8(4)
OPE-07	AGA TGC AGC C	9(4)
OPE-16	GGT GAC TGT G	7(3)
OPE-18	GGA CTG CAG A	8(7)
OPE-20	AAC GGT GAC C	9(4)
(合计)		115(71)

注: \* 示多态性片段数; 均为 Operon Tech Inc.

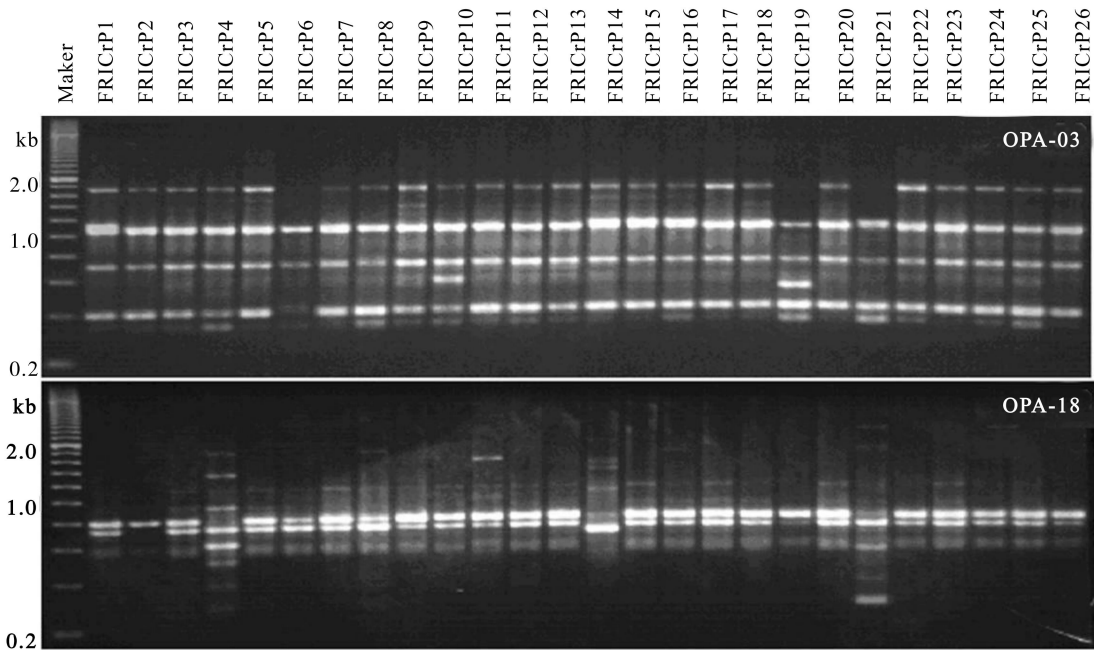


图 2 用引物 OPA-03 和 OPA-08 扩增的栗疫病菌 RAPD 图谱, Maker 为 200 bp 梯度的分子量标记

用 12 个随机引物扩增的 71 个多态性扩增片段中, 为了避免因片段的模糊而造成的误差, 从中只选择比较清楚的 59 个扩增片段进行了菌株间的聚类分析(图 3)。结果表明, 在树状分类中, 相似系数为 0.92 时, 由 17 个韩国菌株和 4 个美国菌株组成一个大组, 而其他菌株则表现出了较大的变异, 其中中国菌株的变异最大。这个大组又分成两个小组, 一个小组包括分离自韩国江原道 (FRICrP1)、京畿道 (FRICrP2, 3)、庆尚南道 (FRICrP5)、庆尚北道 (FRICrP7)、全罗南道 (FRICrP10, 11)、全罗北道 (FRICrP12)、济州岛 (FRICrP15, 16) 和忠清南道 (FRICrP17) 的菌株, 而另一个小组则包括分离自庆

尚北道 (FRICrP8, 9)、全罗北道 (FRICrP13)、忠清南道 (FRICrP18) 和忠清北道 (FRICrP20) 等 4 个韩国菌株和 4 个美国菌株。分离自京畿道、庆尚南道、济州岛和忠清北道的 4 个韩国菌株表现出了较大的变异, 而中国菌株与韩国以及美国菌株间的亲缘关系则较远。大部分韩国菌株间的亲缘关系较近且尚看不出地域性特征, 并且与美国菌株间的亲缘关系也较近。但韩国菌株中也存在有部分变异较大的菌株, 而中国菌株与韩国和美国菌株间的亲缘关系则较远。

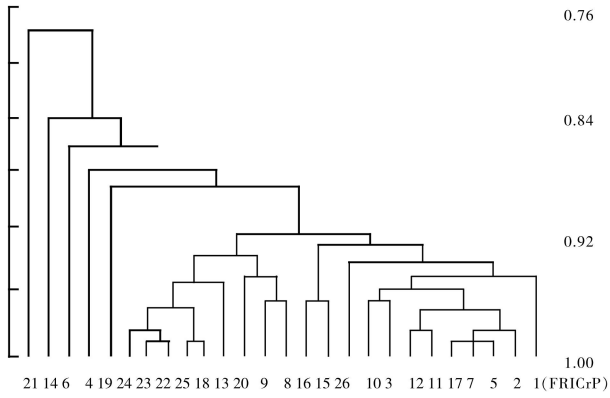


图 3 利用 12 个随机引物扩增的 RAPD 片段和 UPGMA 的栗疫病菌 26 个菌株的 RAPD 树状图 (NTSYSpc Ver 1.80)

### 3 讨论

对 35 个奥地利栗疫病菌的 RAPD 遗传标记分析表明,其地域性特征很小<sup>[4]</sup>,同样,韩国国内的栗疫病菌菌株也没有地域性遗传特征。韩国菌株与美国菌株有很近的亲缘关系,而中国菌株与韩国、美国菌株间的遗传亲缘关系则很小。对来自中国、日本、北美和欧洲的栗疫病菌菌株的 RFLP 分析表明,北美和欧洲菌株间的亲缘关系最近,这两者与日本菌株间的亲缘关系也较近,而它们与中国菌株间的亲缘关系则较远,认为北美的栗疫病菌是由日本传入

的<sup>[6]</sup>。结合本实验的结果,推测北美、欧洲、日本和韩国的栗疫病菌菌株可能存在相似的遗传背景,而中国菌株在遗传上可能是较独立的。在韩国菌株中也有变异较大的菌株,因此不排除从中国等地传入的可能性。今后,应对欧美亚等世界主要板栗栽培区的栗疫病菌菌株进行系统的遗传变异研究,将有助于弱致病力菌株的筛选和引进及其细胞融合系等生物防治的相关研究。

### 参考文献:

- [1] Kim K H, Lee S H, Lee S M, *et al.* 1999 年度林业研究事业报告书 (山林环境 5-1) [R]. 韩国林业研究院, 1999: 384~ 393
- [2] Anagnostakis S L. *Cryphonectria parasitica* cause of chestnut blight [J]. *Advances in Plant Pathology* 1988, 6: 123~ 136
- [3] Heringer U, Riegling D. Biological control of chestnut blight in Europe [J]. *Annu Rev Phytopathol* 1994, 32: 581~ 599
- [4] Wronski R, Kuderna U, Wehner E. Characterization of *Cryphonectria parasitica* strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique and conventional methods [J]. *Eur J For Path* 1997, 27 (2): 95~ 103
- [5] Lee S B, Taylor J W. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores [A]. *In: A Guide to Methods and Application* [M]. APS Press, St Paul MN USA, 1990: 282~ 287
- [6] Milgrom M G, Wang K, Zhou Y, *et al.* Intercontinental population structure of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* [J]. *Mycologia*, 1996, 88 (2): 179~ 190