

# 中国落叶松杨栅锈菌4个流行小种的RAPD标记

魏明, 曹支敏<sup>\*</sup>, 田呈明<sup>2</sup>

(1. 西北农林科技大学林学院, 陕西杨凌 712100; 2. 北京林业大学省部共建森林培育与保护重点实验室, 北京 100083)

**摘要** 以156条随机引物, 对目前中国落叶松杨栅锈菌(*Melampsora larici-populina* Kleb)的主要优势菌系进行了RAPD片段的筛选, 寻找到了1号、3号、4号、5号4个流行生理小种的特异性RAPD标记。经过多批次扩增, 引物S205和S284分别得到1号生理小种长度约450和760 bp的特异条带, S25得到3号生理小种长度约1440 bp的特异条带, S51和S286得到4号生理小种长度约970和1020 bp的特异条带, S23和S96分别得到5号生理小种长度约750和780 bp的特异条带。此结果表明, 通过寻找落叶松杨栅锈菌生理小种的特异性RAPD片段, 能够建立起中国落叶松杨栅锈菌生理小种的分子检测体系。

**关键词** 落叶松杨栅锈菌; RAPD; 分子标记

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)18-05366-02

## RAPD Markers of 4 Physiological Races of *Melampsora larici-populina* in China

Wei Ming et al. (College of Forestry Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract** 156 random primers was used to screen main dominance fungus strain of Chinese *Melampsora larici-populina* Kleb by RAPD technique and the special RAPD fragments of physiological races of C1, C3, C4 and C5 were founded successfully. Through many batches of amplification, the primers of S205 and S284 obtained C1 special fragment with race length about 450 and 760 bp respectively; S25 obtained C3 special fragment with race length about 1440 bp; S51 and S286 obtained C4 special fragment with race length about 970 and 1020 bp respectively and S23 and S96 obtained C5 special fragment with race length about 750 and 780 bp respectively. The results indicated that a molecular identification system for the physiological races of *Melampsora larici-populina* in China could be established through cosmically searching special RAPD fragments of different races.

**Key words** *Melampsora larici-populina* Kleb; RAPD; Molecular marker

落叶松杨栅锈菌(*Melampsora larici-populina* Kleb)是我国杨树的主要病害, 危害幼苗, 影响苗木生产。在青海省互助县, 由于落叶松杨栅锈菌的危害, 导致60多年树龄的杨树死亡。作为专性寄生菌, 落叶松杨栅锈菌常规的鉴定及监测, 需要借助于一整套的鉴别寄主及其反应型来进行, 其方法复杂, 工作量大, 耗时长, 准确性也易受到鉴定条件的影响。随着分子生物学技术的发展, 为深入认识寄主和病原物相互作用的本质提供了新途径。RAPD技术可以在DNA序列未知的情况下, 检测基因的多个位点, 便于快速寻找多个DNA样品间的多态性, 而且不受环境变化、生理因素、发育阶段的影响, 也不依赖基因表达与基因互作。因此, 特别适合于专性寄生、人工培养比较困难的病原真菌遗传分化的研究。

国内对落叶松杨栅锈菌的生理分化、遗传分化、致病性分化等进行了大量研究<sup>[1-4]</sup>。发现落叶松杨栅锈菌小种间存在丰富的DNA多态性, 并获得了来自不同地区13个菌株的特异RAPD图谱, 但上述研究并未涉及小种特异性的分子标记。RAPD已成功标记了小麦条锈菌的4个流行小种<sup>[5]</sup>, 证实大量的筛选引物, 确立落叶松杨栅锈菌流行生理小种的RAPD标记是可行的。笔者以优化的RAPD分析体系, 用156条随机引物, 寻找中国落叶松杨栅锈菌流行小种的相关分子标记, 以便快速鉴定及检测相应小种, 为落叶松杨栅锈病的综合防治和杨树抗病育种提供科学依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 试验菌种的繁殖与常规鉴定** 供试菌种的原始菌样来自西北(甘肃、宁夏、青海、陕西)、华北(北京)、东北(吉林、黑龙江)和西南(四川)8个省市。采回菌样(夏孢子)以后, 用夏孢子悬液摩擦接种在对所有菌样都感病的太白杨(*Populus purdomi*)1~3年生幼苗上, 然后进行单孢子堆化, 形成单孢子

系, 小种鉴定方法见文献[1]。

**1.2 落叶松杨栅锈菌(gDNA)的提取** 采用余仲东<sup>[6]</sup>的方法, 称取约0.005 g干燥的夏孢子, 置1.5 ml离心管中。加100 mmol/L Tris-HCl(pH 7.8) 80  $\mu$ l、20% KOH和20% Chelex-100(Sigma生产)各40  $\mu$ l, 加入灭菌钢珠2颗(4 mmol/L)。在MSI Minishker IKA(广州仪科实验室科技有限公司生产)上2000 r/min高速涡旋4 min左右, 并取溶液置显微镜下不断观察, 直到90%以上夏孢子被破碎为止。用钢针在离心管底刺一小孔, 并在管底套上另一灭菌离心管, 置离心机上短暂离心使上面离心管内液体甩入下面离心管中。再在上面离心管中加入40  $\mu$ l 100 mmol/L Tris-HCl(pH 7.8)清洗1次, 液体再次短暂离心甩入下面离心管内。将收集液体的离心管置于95  $^{\circ}$ C水浴5 min, 用1%的琼脂糖电泳检测, 或者用分光光度计检测浓度和纯度。置-20  $^{\circ}$ C保存, 使用前短暂离心, 取上清液稀释8倍, 做反应模板。

**1.3 落叶松杨栅锈菌的RAPD分析** 10 bp随机引物购自上海生工, dNTPs购自大连宝生物公司, Taq酶选用MBI产品。反应体系为50  $\mu$ l: 8倍稀释液2  $\mu$ l、4  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)、5  $\mu$ l 10 $\times$ PCR Buffer、4  $\mu$ l dNTPs(2.5  $\mu$ mol/L)、5  $\mu$ l随机引物(10  $\mu$ mol/L)、Taq酶0.6  $\mu$ l(5 U  $\mu$ l)、ddH<sub>2</sub>O 29.4  $\mu$ l。每次反应均设无菌去离子水阴性对照。扩增在PTC200热循环仪上进行, 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 1 min, 34.5  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 5个循环。93  $^{\circ}$ C 3 min, 34.5  $^{\circ}$ C 50 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 35个循环, 72  $^{\circ}$ C 10 min 30 s。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶、1 $\times$ TBE电泳缓冲液电泳分离, 电泳后采用凝胶自动成像系统成像(图象采集软件为EIO CAPT V.10, 法国)。

## 2 结果与分析

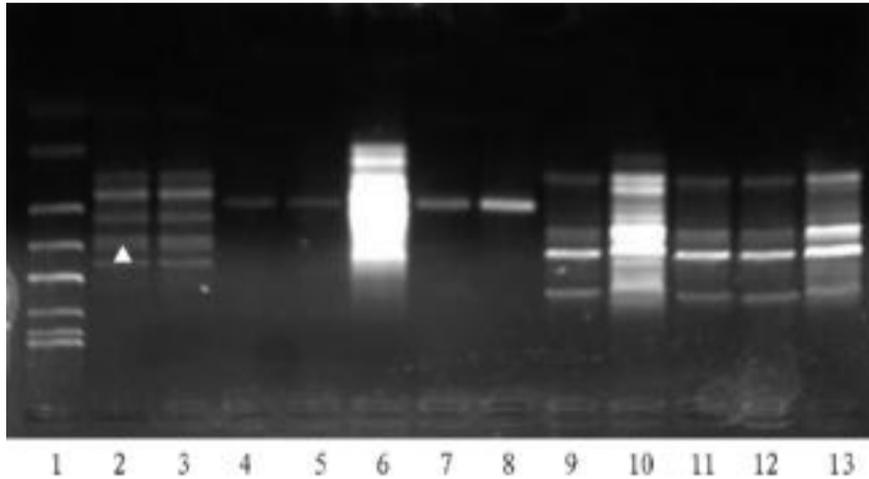
通过对落叶松杨栅锈菌5个流行生理小种的RAPD分析, 共计筛选随机引物156条。研究表明, 各落叶松杨栅锈菌生理小种间存在着丰富的遗传变异, 但是, 只有少数随机引物的扩增谱型表明了小中间的差异。其中以S205、S284

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39970616)。

作者简介 魏明(1979-), 男, 陕西眉县人, 硕士研究生, 研究方向: 森林病理学。\* 通讯作者, 博士生导师, 教授。

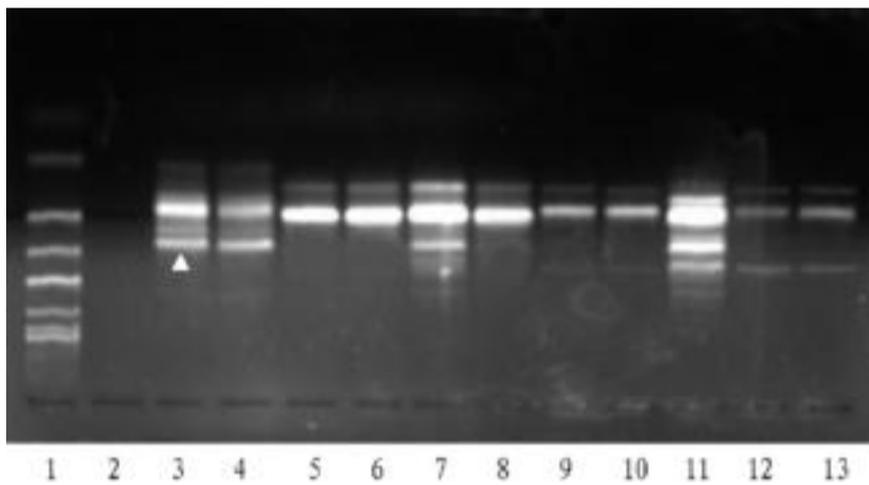
收稿日期 2007-04-14

扩增得到1号生理小种长度约450 bp的特异条带(图1)及长度约760 bp的特异条带(图2);以S25扩增得到3号生理小种长度约1 440 bp的特异条带(图3);以S51、S286扩增得到4号生理小种长度约970 bp的特异条带(图4)及长度约1 020 bp的特异条带(图5);以S23、S96扩增得到5号生理小种长度约750 bp的特异条带(图6)及长度约780 bp的特异条带(图7)。



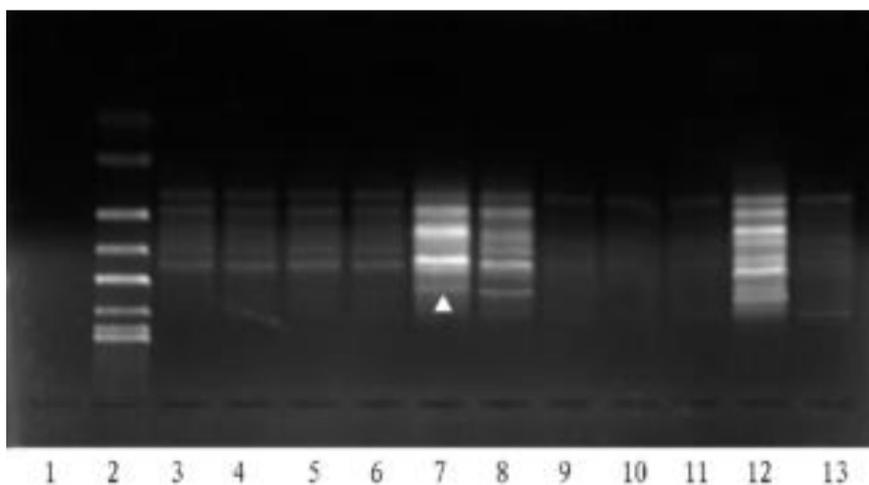
注:2、3、6、10为1号生理小种的4个单孢菌系;4、5为2号生理小种单孢菌系;7为3号生理小种单孢菌系;8为5号生理小种单孢菌系;9、11、12、13为4号生理小种单孢菌系;1为Marker。

图1 1号生理小种S205的RAPD谱型



注:3、4、7、11为1号生理小种的4个单孢菌系;5、6为2号生理小种单孢菌系;9、10为3号生理小种单孢菌系;8为5号生理小种单孢菌系;12、13为4号生理小种单孢菌系;1为Marker;2为对照。

图2 1号生理小种S284的RAPD谱型



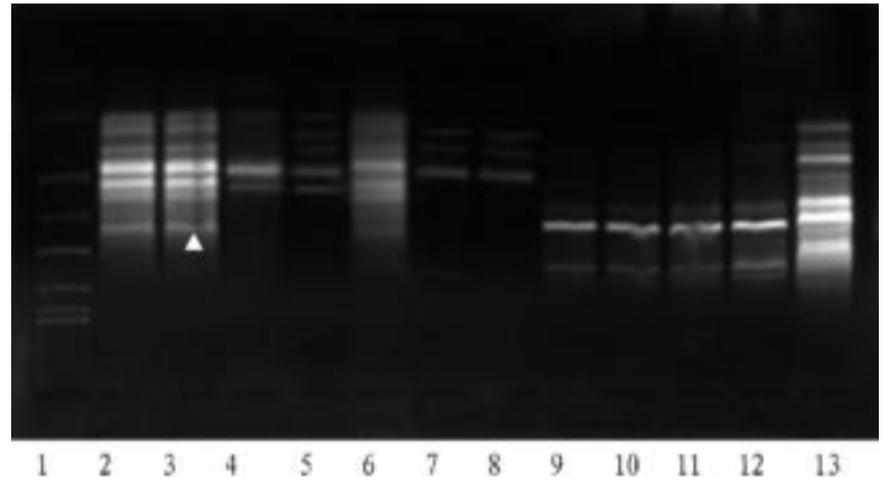
注:7、8、12为3号生理小种的3个单孢菌系;3、4、5、6为4号生理小种的单孢菌系;9为2号生理小种单孢菌系;10、11为1号生理小种单孢菌系;13为5号生理小种单孢菌系;2为Marker;1为对照。

图3 3号生理小种S25的RAPD谱型

### 3 讨论

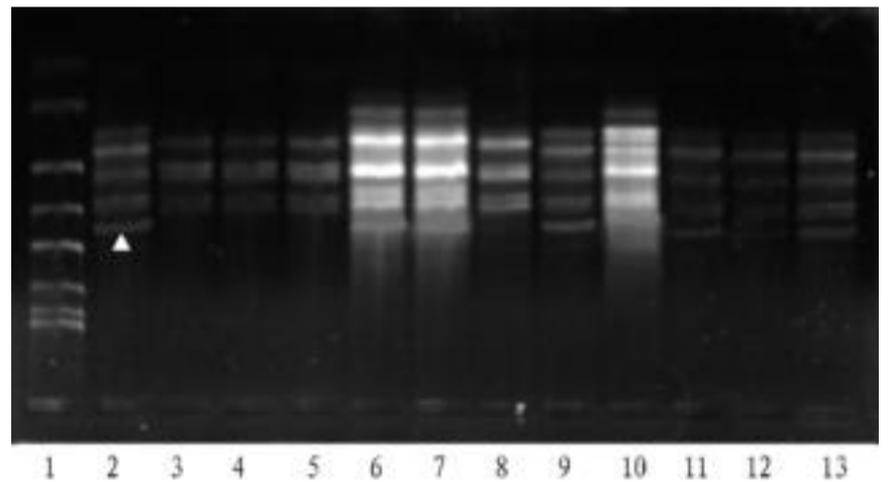
落叶松杨栅锈菌群体组成复杂,常多个小种并存,混合

发生。小种之间由于适应性不同而竞争力各异,加之不同抗性杨树品种、环境生态等因素的选择作用,新的小种不时出现,小种的发生频率也不断变化。落叶松杨栅锈菌生理小种监测一直是杨树抗病性育种的重要环节。应用现代分子标记技术进行落叶松杨栅锈菌的分类与鉴定,可减少常规鉴定程序的繁杂程序,缩短鉴定周期,减少环境寄主带来的影响,并能快速处理大量锈菌样本,全面了解病菌群体的遗传结构与动态变化。



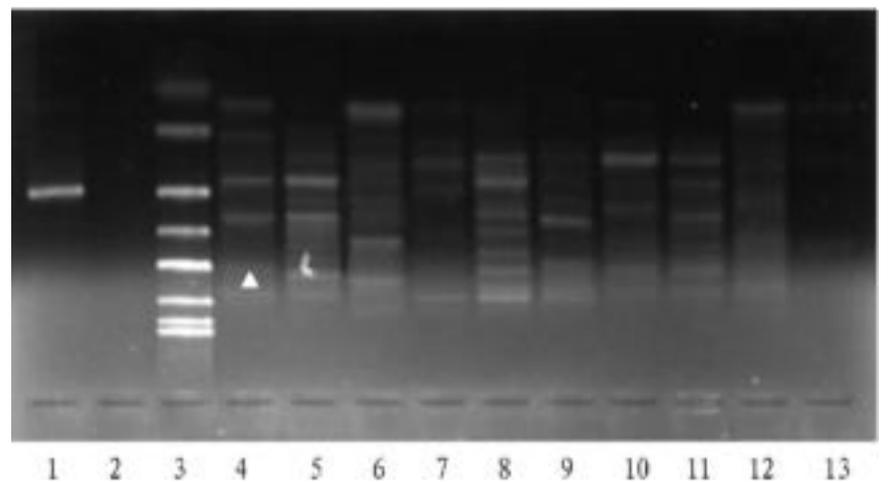
注:2、3、6、9、10、11、12、13为4号生理小种的8个单孢菌系;4为3号生理小种单孢菌系;5为5号生理小种单孢菌系;7、8为1号生理小种单孢菌系;1为Marker。

图4 4号生理小种S51的RAPD谱型



注:2、6、7、9、10、11、12、13为4号生理小种的8个单孢菌系;3、4、5为1号生理小种单孢菌系;8为5号生理小种单孢菌系;1为Marker。

图5 4号生理小种S286的RAPD谱型



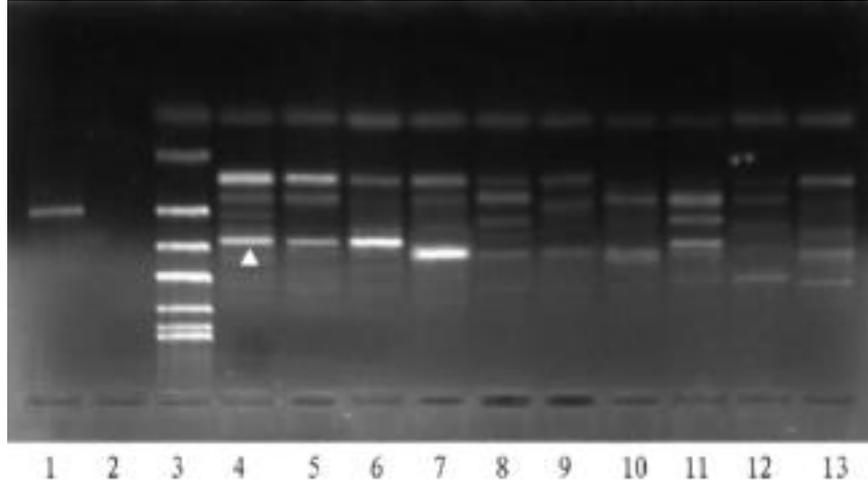
注:4、5、8、11为5号生理小种的4个单孢菌系;1为2号生理小种单孢菌系;7、10为3号生理小种单孢菌系;6为1号生理小种单孢菌系;9、12、13为4号生理小种单孢菌系;3为Marker;2为对照。

图6 5号生理小种S23的RAPD谱型

笔者在大量筛选随机引物的基础上,对4个锈菌生理小种进行了RAPD分析,获得了1号、3号、4号、5号生理小种

(下转第5392页)

(上接第5367页)



注:4、5、6、11 为 5 号生理小种的 4 个单孢菌系;1 为 2 号生理小种单孢菌系;8、9 为 3 号生理小种单孢菌系;7 为 1 号生理小种单孢菌系;10、12、13 为 4 号生理小种单孢菌系;3 为 Marker;2 为对照。

图7 5号生理小种S96的RAPD谱型的特异性RAPD标记。经过多批次扩增试验,这些RAPD标

记稳定性强,重复性比较好。在此基础上,可进一步将其转化为更经典的SCAR标记或合成DNA探针,可初步建立落叶松栅锈菌流行生理小种的分子鉴定、检测体系、简化常规鉴定的繁琐程序,使鉴定周期从几个月缩短到几天,这对准确、客观的监测落叶松杨栅锈菌群体组成,控制锈菌流行及抗病育种具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] 曹支敏,余仲东,潘彦平,等.中国落叶松-杨栅锈菌生理小种分化[J].植物病理学报,2005,35(2):184-186.
- [2] 曹支敏,李振岐,胡景江.落叶松-杨栅锈菌生理分化研究[J].西北林学院学报,1998,13(1):53-57.
- [3] 田呈明,康振生,李振岐,等.落叶松-杨栅锈菌遗传分化的RAPD分析[J].林业科学,2000,36(5):54-58.
- [4] 任本权,曹支敏,潘彦平,等.落叶松-杨栅锈菌致病性分化研究[J].西北林学院学报,2003,18(2):51-54.
- [5] 曹丽华,康振生,赵杰,等.中国小麦条锈菌4个流行小种的RAPD标记[J].西北农林科技大学学报,2004,32(7):37-40.
- [6] ZHONG DONG YU, ZH MIN CAO. A renewed DNA extraction method for molecular study of *Malampora larici-populina*[J]. Jour of Northwest Sci-Tech Univ of Agri and For: Nat Sci Ed, 2005, 33(11):155-158.