

芥黄蜜环菌交配型复等位基因的研究*

秦国夫¹⁾ 郝玉山²⁾ 贺伟³⁾ 龙军海⁴⁾

(1) 国家林业局森林病虫害防治总站, 110034, 沈阳; 2) 内蒙古大兴安岭林业管理局森林病虫害防治站, 022150, 内蒙古牙克石; 3) 北京林业大学森林资源与环境学院, 100083, 北京; 4) 辽宁省抚顺市顺城区林业局, 113008, 辽宁抚顺;
第一作者 31 岁, 男, 工程师)

摘要 从大兴安岭长白山采集 17 号芥黄蜜环菌, 用分离的单孢菌株进行交配型测定, 证实中国该种为双因子异宗配合机制, 选取各号标本的 4 种交配型菌株进行循环配对实验, 结果发现该种的交配型基因座的多样性很高, 共有 13 对复等位基因, 证明该种在世界分布区域内具有较强的生态适应能力。是目前国际首次用实验测定的蜜环菌交配基因数目。

关键词 蜜环菌; 复等位基因; 多样性

分类号 S718.81

蜜环菌复合种(*Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kummer complex) 是一个寄主范围极广, 形态和培养特征变异甚大的林木病原菌。1978 年以来, 单倍体菌株的遗传交配研究发现它是由若干个互交不育群(Intersterility Groups, ISG) 即生物种组成, 绝大多数 ISG 属于四极性异宗配合种, 只有非洲的黑姆蜜环菌(*A. heimii* Pegler)、欧洲的无环蜜环菌(*A. ectypa* (Fr.) Emel) 和蜜环菌日本亚种(*A. mellea* subsp. *nipponica* Cha & Igarashi) 等少数地区存在同宗配合种。目前各国林病学者和菌物分类学家一致采用 ISG 来作为划分种的标准。为调查中国蜜环菌种类, 从 1992 年开始对东北蜜环菌进行的生物种研究, 发现了 5 个生物种^[1], 经过与欧洲、北美生物种菌株的交配, 发现了中国生物种 A, 即芥黄蜜环菌(*Armillaria sinapina* Berube & Dessur.), 并对东北种类作了进一步的订正。同时为详细调查中国蜜环菌存在同宗配合的可能性和交配等位基因的数量, 对芥黄蜜环菌的所有菌株进行了交配型及其复等位基因的遗传测定, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种采集

1993 ~ 1997 年间本文第一作者从大兴安岭和长白山采集芥黄蜜环菌共 17 号(表 1), 将蜜环菌子实体在无菌滤纸上做孢子印, 孢子印低温保存, 带回实验室进行单孢分离。

1.2 单孢分离和交配极性测定方法

培养基采用 2% MEA(2% 的 Sigma 麦芽粉, 2% 的琼脂), 方法按参考文献[1]、[2] 进行。每一子实体至少分离 40 个单孢菌株, 从中挑选典型的单孢菌落形态并且生长旺盛的 12 个菌

* 本文为国家自然科学基金青年基金项目“中国蜜环菌生物种与世界分类种系统学关系的研究”(1995 ~ 1998 年) 和国家自然科学基金项目“蜜环菌群体遗传多样性与寄主协同进化关系的研究”(1998 ~ 2000 年) 的内容之一。本研究部分内容是第一作者在业师沈瑞祥先生指导下完成, 工作中得到赵俊、田淑敏、郭丽华等高工的大力协助, 谨向各位表示由衷的谢意。

株进行列联配对,推断交配极性。有些难以推断交配型的子实体需要重复配对实验 2~3 次。

1.3 复等位基因的配对测试方法和判断标准

培养基采用改进的 MEJA^[2],从每一子实体分离株中选取 4 个不同交配型(A_1B_1 、 A_2B_2 、 A_1B_2 、 A_2B_1)的代表菌株进行 2 个子实体间的 4×4 配对。通过 16 个配对反应推断菌株的交配基因多样性。在 MEJA 培养基上,不亲和交配反应的对峙线清晰明显,而亲和性交配反应更易判断:不仅对峙双方菌落都变为褐色,而且产生较长的根状菌索。如果 16 个均为亲和反应,则为不同的复等位基因,即一方的交配因子为 A_1 、 A_2 、 B_1 、 B_2 ,而另一方为 A_3 、 A_4 、 B_3 、 B_4 ;如果 2 个携带 A 因子的菌株表现非亲和反应,则它们的交配因子均为 A_1 、 A_2 ,B 因子也依此类推。为确定表 1 中菌株的交配因子,所有标本的菌株都进行配对试验。

表 1 用于交配基因测定的芥黄蜜环菌菌株

标本号	寄 主	采 集 地 点	采集日期(年-月-日)
93005	白桦(<i>Betula platyphylla</i> Suk.)	内蒙莫尔道嘎	1993-09-01
93006	白桦	内蒙乌尔其汗	1993-09-02
93007	阔叶树	内蒙绰尔	1993-09-05
93009	蒙古栎(<i>Quercus mongolica</i> Fisch. et Turcz.)	内蒙绰尔	1993-09-09
93011	黑桦(<i>B. dahurica</i> Pall.)	内蒙绰尔	1993-09-09
93012	黑桦	内蒙绰尔	1993-09-09
96015	岳桦(<i>B. ermanii</i> Cham.)	长白山岳桦林带	1996-08-28
96016	岳桦	长白山岳桦林带	1996-08-28
96017	松树(<i>Pinus</i> sp.)	长白山地下森林	1996-08-28
96022	岳桦林地	长白山岳桦林带	1996-08-30
96023	岳桦林地	长白山岳桦林带	1996-08-30
96024	岳桦林地	长白山岳桦林带	1996-08-30
96025	落叶松(<i>Larix</i> sp.)	长白山岳桦林带	1996-08-30
96037	冷杉(<i>Abies</i> sp.)	长白山地下森林	1996-09-02
96041	不详	长白山白河市场	1996-09-03
96042	白桦	内蒙绰尔	1996-09-08
97011	灌木	内蒙阿尔山	1997-09-04

2 结果与分析

2.1 交配极性测定

共进行了约 1 600 个配对组合,所采集的 17 号芥黄蜜环菌都呈现典型的双因子异宗配合交配系统,除极少数子实体因列联配对的 12 个菌株中只有 3 个交配型外,绝大多数都得到 4 种交配型。这一结果表明中国的该物种不存在同宗配合交配机制。

2.2 复等位基因的测算

共进行了 3 轮,首先对采自大兴安岭的 93005~93012 共 6 个菌株进行了第一轮循环配对试验,其中 93011 和 93012 呈现近似子实体内的交配反应,属于同一个克隆,具有 2 个共同的交配因子,其它各号都属于复等位基因,分别编为 $A_1 \sim A_{10}$ 和 $B_1 \sim B_{10}$ 。第 2 轮对长白山的

96015 ~ 96041 和大兴安岭的 96042、97011 进行循环配对实验, 结果 96023 和 96024 为同一克隆, 96015 与其它各号标本呈现近似部分亲和反应, 难以判断, 故排除其交配因子, 其余都属于交配的复等位基因, 编为 $A_{11} \sim A_{28}$ 和 $B_{11} \sim B_{28}$ 。第 3 轮配对实验目的检验前 2 轮的交配因子是否存在重复, 选取每号标本的 2 个代表不同交配型的菌株 (A_1B_2+ A_2B_1 或 A_1B_1+ A_2B_2) 进行循环配对, 最后结论证明, 93012 和 96042 属于同一克隆, 合并其共同的交配因子, 其它 13 对复等位交配基因之间不存在重叠, 由于该两个菌体相距约 20 km, 说明大兴安岭存在较大的克隆。结果见表 2。

表 2 复等位基因循环交配结果

菌株号	93005	93006	93007	93009	96011	93012	96016	96017	96022	96023	96024	96025	96037	96041	96042	97011
93005	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
93006		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
93007			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
93009				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
96011					P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
93012						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
96016							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
96017								+	+	+	+	+	+	+	+	+
96022									+	+	+	+	+	+	+	+
96023										P	+	+	+	+	+	+
96024											+	+	+	+	+	+
96025												+	+	+	+	+
96037													+	+	+	+
96041														+	+	+
96042																+
97011																

注: + 示亲合性交配反应; P 示部分亲合。

3 讨 论

(1) 蜜环菌属中基于生物种而建立的概念相对较新, 所以种内变异的研究仍然不系统, 在菌索分支、担子果形态、生理生化特征和 RFLP 等方面的研究有一些初步观察^[3], 但是对于多态性最错综复杂的交配型基因座 (Mating-type loci) 研究甚少, 国际上还没有对任一生物种的交配型复等位基因的数目做出过测算, 欧洲、北美的一些专家估计在一个种的分布区域会达到两位数^[4,5]。根据本次测定结果的抽样数中出现复等位基因的比率 (13/17) 和最大克隆的菌体直径并按照参考文献[6]的方法进行统计推断, 分布于整个北美和亚洲的这一蜜环菌的复等位基因数目可达到 3 位数。说明该种在遗传基础上具有很强的生态适应能力和竞争生存能力。但是目前国际上尚无对蜜环菌各生物种之间的交配型基因多样性和相对竞争力进行测度学的研究。这种解析蜜环菌生态遗传机制的分析还需要深入。

(2) 蜜环菌的生物种是根据生殖隔离而建立, 已经成为蜜环菌分类中最可靠且最广泛使用的标准, 但同时同宗配合也是一项分种的补充标准, 加之异宗配合现象是产生遗传隔离机制的

前提,所以阐明本地蜜环菌配合类型也成为蜜环菌分类和森林病理学研究的一项必不可少的内容。目前欧洲、非洲、亚洲日本等地均已发现同宗配合种^[3,4],我国也极有可能存在,本研究为进一步探索由交配产生的蜜环菌遗传多样性演变机制奠定了方法基础。

参 考 文 献

- 1 贺伟,秦国夫,沈瑞祥.大兴安岭长白山蜜环菌生物种的研究.真菌学报,1996,15(1):9~16.
- 2 赵俊,田淑敏,王玉玲,等.蜜环菌遗传测定的单孢分离和培养方法.微生物学通报,1999,26(2).
- 3 秦国夫.蜜环菌生物种和分子系统发育研究进展.北京林业大学学报,1993,15(4):87~94.
- 4 Guilaumin J J, Anderson J B, Korhonen K. Life cycle, interfertility, and biological species. In: *Armillaria* Root Disease. United States Department of Agriculture, Forest Service, Agriculture Handbook (No. 691), 1991. 10~20.
- 5 Anderson J B, Ullrich R C. Biological species of *Armillaria mellea* in North America. Mycologia, 1979, 71: 402~414.
- 6 Murphy J F, Miller O K J, Diversity and local distribution of mating alleles in *Marasmiellus preacutus* and *Collubia subnuda* (Basidiomycetes, Agaricales). Can. J. Bot., 1997, 75(1): 8~17.

Diversity of Mating Alleles in *Armillaria sinapina* from Northeast China

Qin Guofu¹⁾ Hao Yushan²⁾ He Wei³⁾ Long Junhai⁴⁾

(1) General Station of Forest Pest Control, The State Forestry Administration, 110034, Shenyang, China;

2) Great Xingan Mountains Forestry Bureau, Inner Mongolia Region, 022150, Yakeshi, Neimenggu, China;

3) College of Forest Resource and Environment, Beijing Forestry University, 100083, Beijing, China;

4) Shuncheng District Forestry Bureau of Fushun City, Liaoning Province, 113008, Fushun, Liaoning, China)

Abstract The diversity of mating alleles in population of *Armillaria sinapina* in Great Xingan & Changbai Mountains were investigated. The results from mating tests between the four haploid strains which represented a fruiting body's mating genotype and another one were used to deduced mating genotypes among closely adjacent individuals. 13 pair mating factors have been found from the 17 stocks except four individuals from the same location (about twenty kilometers apart) sharing one mating genotype. The result indicated that the fungus possessed high level of mating alleles diversity and adapting ability in this area.

Key words *Armillaria sinapina*; mating alleles; diversity