

栗疫菌营养体亲和型多样性比较及 野生栗栗疫菌交配型的分子检测

潘琪¹, 张国珍², 贺伟^{1*}, 费松林³, 陈余朝⁴, 张海旺²

(1. 北京林业大学林学院, 北京林业大学森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083;

2. 中国农业大学植物病理学系, 农业部植物病理学实验室, 北京 100094;

3. 普渡大学林业与自然资源系, 美国 47907; 4. 陕西省安康市林业技术推广中心, 陕西 安康 725000)

摘要:在北京周边县区、湖北大老岭山区以及陕西安康地区分别调查栗疫病发生情况, 采集病原栗疫菌(*Cryphonectria parasitica*)菌株并进行营养体亲和性试验。结果表明:北京板栗栽培区和陕西安康地区野生栗栗疫病发病率较高, 局部地区危害严重;湖北大老岭山区栗疫病发病率低, 危害轻微。北京地区菌株群体营养体亲和型多样性指数(Shannon-Wiener's diversity index)极显著低于湖北菌株群体和陕西菌株群体, 而陕西与湖北菌株群体营养体亲和型多样性指数差异不显著。随机选取湖北、陕西野生栗栗疫菌部分菌株, 利用特异性引物, 通过普通 PCR 和巢氏 PCR, 对其交配型进行测定, 发现陕西与湖北野生栗菌株群体中均存在 MAT-1 与 MAT-2 两种交配型的菌株。通过 PCR 扩增, 在两地的野生菌株群体里均发现同时具有两种交配型基因的菌株, 其中, 陕西群体此类菌株比例较大, 湖北菌株比例较小

关键词:野生栗; 栗疫菌; 营养体亲和型; 交配型; 香农-维那指数

中图分类号: S718.8

文献标识码: A

Comparison of Vegetative Compatibility Diversity of *Cryphonectria parasitica* from Wild and Cultivated Chestnut and Molecular Detection of Mating-type of the Pathogens from Wild Chestnut

PAN Qi¹, ZHANG Guo-zhen², HE Wei¹, FEI Song-lin³, CHEN Yu-chao⁴, ZHANG Hai-wang²

(1. The Academy of Forestry, Beijing Forestry University, Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, Beijing 100083, China; 2. Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. Department of Forestry and Natural Resource, Purdue University, West Lafayette 47907, USA;

Key Laboratory of Plant Pathology, Ministry of Agriculture, Beijing 100094, China;

4. Forestry Technology Promotion Center of Ankang City, Ankang 725000, Shaanxi, China)

Abstract: The incidence of chestnut blight caused by *Cryphonectria parasitica* in the regions of Beijing, Hubei and Shaanxi was investigated and the pathogen strains collected from these regions were used to detect their vegetative compatibility groups (VCGs). The results showed that the incidence of chestnut blight in Beijing and Shaanxi, varying according to different site conditions, was higher than that in Hubei. The Shannon-Wiener's diversity indexes of the VCGs of strains collected from Hubei and Shaanxi were statistically higher than that of strains from Beijing, whereas no statistical difference between the indexes of Shaanxi and Hubei. In addition, the mating-types of the representative strains selected randomly from Shaanxi and Hubei populations were detected by means of primary and

收稿日期: 2012-01-06

基金项目: 由美国板栗协会部分资助(TACF2009-13)

作者简介: 潘琪(1985—), 男, 河南人, 硕士研究生, 主要从事森林病理学研究。

* 通讯作者: 贺伟, 博士, 教授, 主要从事森林病理学研究

nested PCR with specific primers. The results showed that both populations had two mating-types. Meanwhile, the strains with two mating-types in a single strain were detected as well, showing higher proportion in Shaanxi population than in Hubei population.

Key words: wild-chestnut; *Cryphonectria parasitica*; vegetative compatibility; mating-type; Shannon-Wiener's diversity index

栗疫病是世界上著名的森林病害,19世纪末到20世纪初,该病的大流行使北美板栗遭到全面灭种的威胁,成为植物病害摧毁自然物种的唯一例子^[1]。自1913年起,我国也发现了此病,部分板栗(*Castanea mollissima* Bl.)栽培地区此病害还较严重^[2]。近年来,随着气候条件变化及粗放经营模式下的栽培生产,栗疫病有加重的趋势,需要加强病害监测和防治研究,而抗病种质资源的发掘则成为了病害防治研究的重点。

关于栗属(*Castanea* Mill.)植物种质资源的问题,世界各国学者,如 Rutteret、Jaynes 等认为,其起源及遗传多样性中心是中国大陆,但长期以来缺乏直接的证据^[3]。郎萍等^[4]通过对分布于亚洲、欧洲和北美的栗属植物的遗传多样性的研究发现,中国大陆地区板栗的遗传多样性显著大于茅栗(*C. seguinii* Dode)、美洲栗(*C. dentata* (Marsh.) Borkh.)和欧洲栗(*C. sativa* Mill.),而长江流域中国板栗的遗传多样性大于中国其他品种群。除板栗外,我国也是世界栗属植物中锥栗(*C. henryi* (Skan) Reld. et Wils.)和茅栗的原产地,并拥有丰富多样的野生栗资源;一般来说,我国栗属植物对栗疫病有较强的抗性^[5],是重要的抗病种质资源。位于长江流域的大巴山、神农架一带,板栗、茅栗、锥栗处在野生状态,人为因素影响较小,是寻找栗疫病抗病种质资源较为理想的地区,同样也是调查病原菌遗传多样性较为适宜的地区。

王克荣等^[6-7]对分布在中国东部板栗区栗疫菌(*Cryphonectria parasitica*(Murr.) Barr)的营养体亲和组(VCG)(或称营养体亲和型)和交配型进行过测定,并描述了栗疫菌在这一区域的大致情况,但其所研究的栗疫菌寄主对象多数为栽培板栗,而关于我国野生栗栗疫菌的营养体亲和型和交配型的研究资料有限。本文选择湖北大老岭、陕西安康地区野生栗分布区进行栗疫菌营养体亲和型研究,也研究

了北京周边地区栽培板栗栗疫菌的营养体亲和型,并与上述两地栗疫菌的营养体亲和型多样性进行比较。此外,利用特异性引物和PCR扩增试验,对湖北、陕西部分野生栗栗疫菌的交配型进行了测定,以判断是否有可能在自然条件下进行有性杂交或者自交,从而预测此两地野生栗栗疫菌营养体亲和型变化的情况。

对栗疫病发生情况以及病原菌遗传多样性开展调查,不仅能够大致了解野生栗栗疫菌营养体亲和型多样性情况,也可为抗病种质资源的保护和利用、病害流行病学和防治研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

2006—2007年、2009—2010年,分赴北京周边县区、湖北大老岭山区以及陕西安康等地区实地调查并采集栗疫菌菌株25、35、131株,共191株(表1),其中,北京周边县区所采25株栗疫菌的寄主均为栽培板栗;湖北35株栗疫菌的寄主分别为野板栗、茅栗、锥栗,前2种寄主各分离菌株1株,其余菌株寄主均为锥栗;陕西菌株中,48株的寄主为锥栗,44株的寄主为茅栗,38株的寄主为野板栗,1株的寄主为日本栗(*C. crenata* Sieb. et Zucc.)。

采用样方法,每个样方大小为30 m×30 m,每一样方中采集所有能够采集的病样。行政村和自然生境为采样基本单位,从中分离的菌株属于1个群体,群体间相距至少10 km,有的群体含子群体,子群体相距1.5 km左右。

在所采的菌株中,大部分为单病斑分离菌株,少数为同一树上不连续病斑分离菌株与大病斑菌株。病组织块面积为10 cm×10 cm,其来源与获取时间见表1。所有用于营养体亲和型检测的菌株都是经纯化的单分生孢子后代。

单孢分离方法见张海旺等^[8]的方法。

表1 菌株来源、VCG 分组以及香农-维那多样性指数统计表

采集地区	具体地点	菌株编号及营养体亲和组	亲和型数 (VCGs)	菌株数 / 株	香农-维那多样性指数 (H)	寄主	采集时间 (年-月)
北京	怀柔区桥梓镇	(Qza115、Qzb18、Qzc120、Qzd122、Qze124、Qzf126、Qzg128、Qzh129、Qzi131、Qzj133)	1	10	0.0	栽培板栗	2006-07
	怀柔区九渡河镇吉寺村	(Jsa135、Jsb139、Jsc143、Jsd148、Jse151)	1	5	0.0	栽培板栗	2007-08
	怀柔区渤海镇渤海所村	(Bhs1、Bhs3)	1	2	0.0	栽培板栗	2007-09
	密云区不老屯镇大窝铺村	(Dwp203、Dwp207)	1	2	0.0	栽培板栗	2006-08
	房山区十渡镇西关上村	(Gsc191、Gsc192)	1	2	0.0	栽培板栗	2006-08
	延庆县四海镇海字口村	(Hz268、Hz271)	1	2	0.0	栽培板栗	2006-08
	昌平区兴寿镇下庄村	(Xz248、Xz257)	1	2	0.0	栽培板栗	2006-08
		总计:25 个菌株			平均 0		
湖北	鼓浆坪	(P24、P25、P26); (P27、P28)	2	5	0.67	锥栗	2009-10
	长冲	(P29、P30); P31; P32; (P33、P37、P40); P38; P39; P41	7	10	1.83	野板栗、锥栗	2009-10
	宜昌大老岭国家森林公园	大垭 P11; P14; P15 板壁岩 P16; P17; P18; P19	3 4	3 4	1.11 1.39	锥栗 茅栗、锥栗	2009-10 2009-10
		猪槽沟东 (P1、P3); P2; P7; P8; P9	5	6	1.57	锥栗	2009-10
		猪槽沟南 (Px1、Px3、Px6); Px4; Px5; Py1; Py4	5	7	1.46	锥栗	2009-10
		总计:35 个菌株			平均 1.34 **		
	陕西	岚皋县南宫山长梁子	1q; (3q、4q、5q); (8q、9q); 10q	4	7	1.27	茅栗、锥栗
岚皋县蕲河乡大湾村山沟		(81q、85q); 83q; 84q; (87q、92q、93q); 88q; 89q; 90q; 91q; 95q; 96q	10	13	2.20	茅栗、锥栗	2010-10
蕲河乡大湾村北坡		30q; 32q; 33q; 35q; 36q; 37q; 38q; 39q; 41q; 42q; 43q; 45q; 46q; 47q; 49q	15	15	2.71	茅栗、锥栗	2010-10
蕲河乡大湾村柏树堡		55q; 56q; 57q; 61q; 62q	5	5	1.61	茅栗	2010-10
蕲河乡大湾村1组		67q; 68q; 71q; 72q; 73q; 74q	6	6	1.79	茅栗、锥栗	2010-10
蕲河乡大湾村2组		75q; 76q; 77q; 78q; 79q; 80q; 82q; 86q; 94q; 97q	10	10	2.30	茅栗、锥栗	2010-10
蕲河乡草垭村1组		98q; 99q; 102q; 109q; 111q; 118q; 123q; 130q; (134q、135q); 136q; 140q; 142q	12	13	2.46	茅栗、锥栗	2010-10
蕲河乡草垭村2组		101q; 103q; 104q; 105q; 107q; 108q; (110q、112q、113q、114q、117q); 116q	8	12	1.81	锥栗	2010-10
蕲河乡草垭村3组		120q; 121q; (122q、129q); 125q; 131q; 132q; 133q; (137q、141q); (139q、143q)	9	12	2.14	锥栗	2010-10
平利县女娲山乡七里村九道梁地区		(158q、159q); 160q; 161q; 162q; 163q	5	6	1.58	野板栗	2010-10
平利县女娲山乡女娲山村8组		144q; 147q; 149q; 150q; 151q; 152q; 153q; 154q; 157q	9	9	2.21	野板栗	2010-10
安康市汉滨区吉河镇		165q; 168q; 170q	3	3	1.11	日本栗、野板栗	2010-10
		迎风乡红霞村 (171q、173q、174q、175q); 172q	2	5	0.50	野板栗	2010-10
安康市		油房村 (177q、181q); 179q	2	3	0.63	野板栗	2010-10
汉滨区吉河镇		东西沟村 182q; 183q; 185q; 186q; 187q; 188q; 189q; 191q	8	8	2.08	野板栗	2010-10
		国庆村 192q; 193q; 194q; 196q	4	4	1.39	野板栗	2010-10
		总计:131 个菌株			平均 1.74 **		

注:相同营养体亲和型的菌株用“()”包括,不同营养体亲和型的菌株(组)用“;”分隔开; **表示在 $\alpha = 0.01$ 的水平上差异极显著。

1.2 营养体亲和型测定方法

1.2.1 PDA 培养基与 PDAMB 培养基^[6] PDA 培养基配方:去皮马铃薯 200 g,葡萄糖 10 g,琼脂粉 18 g,水 1 000 mL;PDAMB 培养基配方:每升 PDA 培养基配方中再加入 100 mg 甲硫氨酸和 1 mg 生物素,用 $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠水溶液或者乳酸调节 pH 值为 6.4~7.0。

1.2.2 对峙培养法^[6] 将保存好的单分生孢子菌株转移到 PDA 培养基上,25 °C 光照培养,至菌落直径扩展为 4~5 cm,然后用直径为 0.5 cm 的打孔器在栗疫菌菌落边缘打取菌饼,用灭菌牙签将来自不同菌株的菌饼相距 0.5 cm 放置在直径 6 cm 的 PDAMB 培养基平板上对峙培养,每个处理 3 个重复,25 °C 暗培养。培养 10~12 天后,观察记录对峙菌株是否亲和。判断标准如下:两配对菌株菌落融合,记为亲和;两配对菌株菌落边缘出现分界线,记为不亲和。

对峙培养实验组合包括:(1)每一个小生境中的所有菌株之间两两进行的对峙培养实验;(2)随机选取来自北京、湖北、陕西共 16 个菌株组成一个群体(北京 2 个菌株,湖北 3 个,陕西 11 个),该群体中所有菌株两两进行的对峙培养实验;(3)北京不同小生境间所有菌株两两进行的对峙培养实验。

1.3 栗疫菌交配型分子测定方法

1.3.1 供试菌株及试剂 供试菌株采用从单病斑上分离并多次纯化后试管斜面保存的原始菌株,能更真实地反应自然界菌株的交配型分布情况;对分离到的湖北、陕西野生栗疫菌选取一定数量的随机菌株进行 PCR 扩增,检测其群体交配型比例。根据季哲等^[9]二项式通项的理论,按照每个交配型在自然群体中出现的频率为 50% 计算,那么在 99.9% 的保证率下,需要 n 个菌株才能出现全部 2 种交配型,其二项式为: $1 - [(1/2)^n + (1/2)^n] \geq 99.9\%$,计算得到 $n \geq 11$,即用于试验中的菌株数量大于等于 11 时,就可以保证 2 种交配型全部出现的概率在 99.9% 以上。因此,检测的每个群体随机选取大于等于 11 的菌株进行交配型的检测,以获得能够代表该群体的交配型比例的群体。本实验随机选取来源于湖北的菌株的数量为 17 株,来源于陕西的菌株的数量为 35 株。

所用培养基以及试剂为:PDA 培养基(用于菌株的活化和培养)、真菌 DNA 提取裂解液、ExTaq 套装。

真菌 DNA 提取裂解液配方: $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 1% SDS(以上浓度均为终浓度)用 $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调 pH = 8.0。

ExTaq 套装, TaKaRa 公司产品: ExTaq Polymerase($5 \text{ unit} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $10 \times$ ExTaq PCR Buffer(含 Mg^{2+})、dNTPs($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $6 \times$ Loading Buffer。

1.3.2 菌丝体收集 将保存于试管斜面的菌株转移至直径 9 cm 的 PDA 平板上,置于 25 °C 培养箱培养数日,待菌落长满 PDA 平板后用灭菌小勺收集菌丝体至无菌 PCR 管内, -20 °C 低温保存。

1.3.3 栗疫菌基因组 DNA 提取 采用林彩丽等^[10]的方法。

1.3.4 引物条件 Marra^[11]利用 DNA 杂交技术最终设计出栗疫菌交配型特异性引物以及配套巢氏引物,后经葡萄牙 Braganca 等^[12]验证,能够达到区分栗疫菌 2 种交配型的结果。本试验采用的即是此套引物,并将 PCR 条件优化。实验引物均由 invitrogen 英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.3.5 PCR 扩增体系及扩增程序

(1) Primary PCR 30 μL 体系: $10 \times$ ExTaq PCR Buffer(含 Mg^{2+}) 3 μL , dNTPs($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2.4 μL , ExTaq Polymerase($5 \text{ unit} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.15 μL , MAT-1 或者 MAT-2(Primary/Nested)引物每种 0.6 μL , 模板 DNA 0.7 μL , 双蒸水补足至 30 μL 。

(2) Nested PCR 30 μL 体系: $10 \times$ ExTaq PCR Buffer(含 Mg^{2+}) 3 μL , dNTPs($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2.4 μL , ExTaq Polymerase($5 \text{ unit} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.15 μL , MAT-1 或者 MAT-2(Primary/Nested)引物每种 0.6 μL , Primary PCR 产物 1.2 μL , 双蒸水补足至 30 μL 。

(3) 扩增程序: 95 °C 预变性 30 s, 然后 95 °C 30 s, 66 °C 1 min, 72 °C 4 min, 30 个循环(Primary PCR)/22 个循环(Nested PCR)之后 72 °C 延伸 3 min, 4 °C 保存。所用的 PCR 仪为 GeneAmp[®] PCR System 9700 或者 Applied Biosystems Veriti 96Well Thermal Cycler。

1.3.6 琼脂糖凝胶电泳及紫外成像 以 DL2000DNA 分子量作为标记,将 PCR 扩增产物取 5 μL ,用 $6 \times$ Loading Buffer 1 μL 混匀,再加入到 1.2% 琼脂糖凝胶的点样孔内,110 V 恒压直流电条件下,在 $0.5 \times$ TBE 电泳缓冲溶液中电泳 30 min;将琼脂糖凝胶放入浓度为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溴化乙锭溶液中染色 10~12 min;染色完毕,在紫外透射成像仪下检查结果,

并拍摄电泳图片,所用软件为 GeneSnap from SynGene。

2 结果与分析

2.1 栗疫病病害调查概况

2.1.1 湖北大老岭地区栗疫病发生情况 湖北大老岭地区栗属植物以锥栗为主。所采集的 25 株病树中,23 株为锥栗,茅栗和野生板栗各 1 株。该地区野生栗树栗疫病发病地点分散,发病率整体较低 (<8%),发病栗树主要为锥栗,有的锥栗病株上产生多个病斑。

2.1.2 陕西安康地区栗疫病发生情况 所调查地区位于大巴山北坡,植被丰富,栗属植物中国特有种板栗、茅栗及锥栗均有较为广泛的分布,而栗疫病在此 3 种栗属植物上均有发生。发病率与严重程度随地点不同差别很大,其中,锥栗分布区内,栗疫病发病率达 30%~40%。调查中还发现,野生板栗的栗疫病老病斑较多,在之后进行的栗疫菌分离试验中,部分老病斑能分离到栗疫菌。

2.1.3 北京周边县区栗疫病发生情况 所调查地区为北京周边板栗栽培种植区,所有菌株都是从板栗树上分离得到。该地区各个调查点栗疫病发病率为 13%~18%,严重程度随地点不同差别较大。

2.2 菌株间营养亲和性反应的类型

本试验的观察结果中出现了菌株间营养亲和(同为一个营养体亲和型)与菌株间营养体不亲和(分属不同的营养体亲和型)两大类。同一亲和型菌株菌丝间相互融合,菌落间无抗衡区。本试验观察到的不同营养体亲和型反应现象可细分为以下 3 类: I、菌株间形成明显的抗衡区,抗衡区两侧产生密集的呈带状分布的分生孢子器; II、菌株间形成明显抗衡区,但只在抗衡区一侧形成分生孢子器带,另一侧菌株在抗衡区不成分生孢子器; III、菌株间菌丝不融合或者极少融合,有抗衡区,但分界线两侧无分生孢子器形成。

在所观察到的对峙培养反应中,不亲和占大多数,亲和的占组合总数的 16.52%,其中,北京菌株之间亲和的比例最高,达 44.09%;湖北菌株之间亲和的比例为 9.68%;陕西菌株之间亲和的比例为 5.03%。所观察到的不亲和组合中, I 型和 II 型占绝大部分(>90%)。

2.3 营养体亲和型多样性比较

根据上述判断菌株间是否亲和的标准,分别对

湖北大老岭、陕西安康以及北京周边县区的栗疫菌营养体亲和型多样性进行统计,所用标准为香农-维那多样性指数^[13]:

$$H = - \sum P_i \ln P_i$$

式中: P_i 为该群体内某一亲和型菌株所占比例。

根据上述公式,统计湖北大老岭、陕西安康以及北京周边县区三地栗疫菌营养体亲和型香农-维那多样性指数(表 1)。此外,具体的营养体亲和型分布在表 1 中有所体现。

对此三地栗疫菌菌株营养体亲和型香农-维那多样性指数平均值做多重比较(邓肯比较),结果表明:在 $\alpha = 0.01$ 的水平下,湖北、陕西菌株营养体亲和型香农-维那多样性指数平均值(湖北为 1.34,陕西为 1.74)都与北京菌株营养体亲和型香农-维那多样性指数平均值(0)差异极显著,而湖北菌株与陕西菌株营养体亲和型香农-维那多样性指数平均值之间差异不显著。

选取的来自三地的 16 个菌株 Gsc192、Jsg148(来源北京),P31、P19、P11(来源湖北)及 5q、38q、71q、111q、116q、143q、158q、168q、175q、182q 和 196q(来源陕西),两两进行的对峙培养实验结果表明这 16 个菌株属于 16 个不同的 VCG。

此外,试验结果显示:在北京周边,不同板栗栽培区的栗疫菌一般属于不同营养体亲和型,但是有些不同的栽培区的菌株具有同样的营养体亲和型,如代表菌株为来源于密云区不老屯镇大窝铺村的 Dwp203 的营养体亲和组,还包含 Xz257、Hz271 等来自昌平、延庆的菌株。

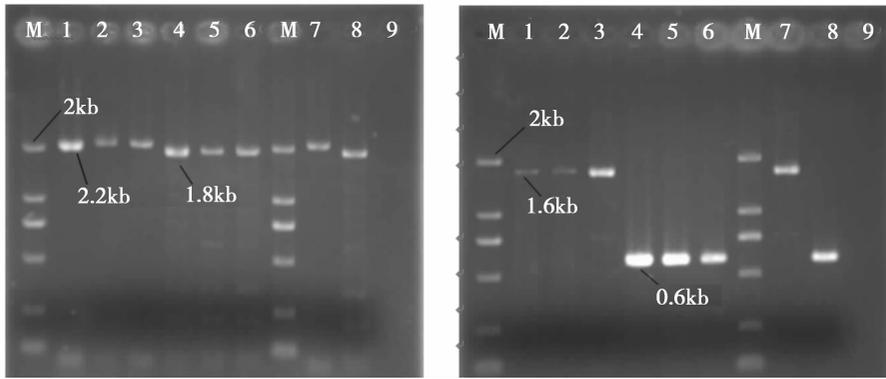
2.4 栗疫菌交配型的 PCR 扩增及分子检测

交配型 PCR 扩增结果表明:在 Primary PCR 扩增试验中, MAT-1 型、MAT-2 型特异性引物结合菌株 DNA 模板获得的 PCR 产物分别约是 2.2、1.8 kb 的片段;在 Nested PCR 扩增试验中, MAT-1 型、MAT-2 型特异性引物结合 Primary PCR 产物 DNA 模板获得的 PCR 产物分别约是 1.6、0.6 kb 的片段,这和 Marra^[11]、McGuire 等^[14]的研究吻合。部分菌株 Primary PCR 以及 Nested PCR 扩增结果见图 1(左为 Primary PCR 产物电泳结果,右为 Nested PCR 产物电泳结果)。

由图 1 左显示:用 Primary PCR 及其配套引物即可将 MAT-1 与 MAT-2 型菌株区分开来,但有一些菌株,用 Primary PCR 及其某一交配型配套引物扩增后电泳有目的条带,而用另一交配型配套引物

扩增后电泳无目的条带,但用无目的条带产生的 PCR 扩增产物作为模板再加以相反交配型的 Nested PCR 配套引物后,也能出现该 Nested PCR 引物扩增目的条带。这一现象和 Marra^[11]的研究相一

致,在排除其余如污染因素等的前提下,推测可能为同一野生栗栗疫菌单病斑菌株同时具有 2 种交配型基因(表 2)。



左图泳道(Primary PCR):1~3 分别为 p32、62q、132q(MAT-1 型);4~6 分别为 p9、96q、111q(MAT-2 型);7 为阳性对照 1(MAT-1 型),8 为阳性对照 2(MAT-2 型),9 为阴性对照。右图泳道(Nested PCR):1~3 分别为 p16、80q、168q(MAT-1 型);4~6 分别为 p1、158q、188q(MAT-2 型);7 为阳性对照 1(MAT-1 型),8 为阳性对照 2(MAT-2 型),9 为阴性对照。M:DL2000 Ladder

图 1 部分野生栗栗疫菌菌株的 PCR 扩增电泳图

表 2 湖北、陕西野生栗交配型基因片段 PCR 扩增结果

来源	菌株数 / 株	MAT-1 型	MAT-2 型	MAT-1 型/MAT-2 型	MAT-1:MAT-2 分离比
湖北	17	P32(共 1 个)	P1, P2, P7, P9, P24, P25, P26, P28, P30, P37, PX4, PX6, PY1 (共 13 个)	P15, P16, PY4(共 3 个)	1:13
陕西	35	62q, 132q, 163q (共 3 个)	39q, 41q, 55q, 71q, 96q, 111q, 175q, 188q(共 8 个)	22q, 25q, 50q, 61q, 74q, 80q, 81q, 84q, 93q, 95q, 104q, 107q, 112q, 118q, 120q, 135q, 136q, 139q, 158q, 167q, 168q, 179q, 181q, 182q(共 24 个)	3:8

两地的野生栗栗疫菌群里均发现了同时具有 2 种交配型的菌株,湖北的比例为 17.65%,陕西的比例为 68.57%。由于选取的是单病斑分离的原始菌株,故不能确定出现 2 种交配型基因的菌株是由于本身是异核(同一菌株同时具有 2 种相反的交配型)菌株还是同一病斑分离的菌株含有不同交配型的多来源混合体菌株,但陕西来源的此种野生栗栗疫菌株的比例显然大于湖北来源的野生栗栗疫菌菌株,这也许能部分解释为何陕西菌株的香农-维那多样性指数大于湖北。

3 结论与讨论

本研究结果表明:我国栗疫菌存在着广泛的营养体亲和型,其中,湖北大老岭地区以及陕西安康野生栗栗疫菌的营养体亲和型多样性比北京周边县区的栽培板栗栗疫菌的营养体亲和型多样性高。通过

进一步的营养体亲和型分析发现:分离自上述两地、同一株树上不相连病斑的栗疫菌均属于不同的营养体亲和型,这说明即使在同一株栗树上,不同病斑病菌来源也可能不同。此外,对北京地区菌株的观察表明,同一栽培地块的栗疫菌营养体亲和型基本一致,而不同栽培地块的栗疫菌营养体亲和型一般不同。

关于北京地区栗疫菌营养体亲和型相对较少的问题,可能以下几方面解释:第一,由于北京周边特定栽培区的板栗苗来源一致,致使带菌情况相同;第二,在栽培过程中,果农会有意识的淘汰一些患有栗疫病的病树,从而造成随树携带的栗疫菌的损失;第三,在北京周边地区采集及在实验室分离栗疫菌时未观察到有子囊壳的存在,分析认为栗疫菌有性生殖在北京的气候条件下不常见,也就无法造成 VCG 的数量增长。之所以存在不同栽培区的栗疫

菌有相同的 VCG 现象,可能是因为不同栽培区之间存在种质资源的交流,或者病菌易于传播的结果,当然这些都有待于进一步的研究。针对北京地区栗疫病菌营养体亲和型整体数量较多而局部数量少这一特点,在局部范围内利用栗疫病菌弱毒菌株控制栗疫病是一个合理的手段。

本文还分别随机选取了湖北、陕西和北京来自不同子群体的共计 16 个菌株进行对峙培养实验,结果这 16 个菌株分属 16 个不同的营养体亲和型。这一统计结果说明,北京地区的栗疫病菌营养体亲和型多样性虽然较低,但类型却与湖北、陕西等地栗疫病菌的营养体亲和型并不相同。

在我国,针对不同地区栗疫病菌的营养体亲和型已开展过一些研究,王克荣等^[6]对苏皖板栗产区栗疫病菌的营养体亲和型调查发现,其栗疫病菌营养体亲和型种类丰富,219 个菌株分属 131 个营养体亲和型,平均 1 个 VCG 含 1.67 个菌株;而罗正均等^[15]采取同样方法对湘、渝栗疫病菌的营养体亲和型进行调查,56 个菌株可分为 30 个 VCGs,平均 1 个 VCG 含 1.87 个菌株。Liu 等^[16]对中国大陆东部三省栗疫病菌和日本栗疫病菌的 VCG 多样性做一小结,发现在中国东部局部地区和日本,几乎每一个菌株就属于一个唯一的 VCG。本试验中,湖北、陕西各个栗疫菌子群体中营养体亲和型多样性较大(湖北菌株各个子群体中含菌株数最多的 VCG 所含菌株数为 3,大部分 VCG 只含 1 个菌株;陕西菌株各个子群体中含菌株数最多的 VCG 所含菌株数为 5,且只有一个,大部分 VCG 只含 1 个菌株)。上述数据均可表明,我国野生栗疫病菌的营养体亲和型多样性程度高。

在应用方面,关于栗疫病营养体亲和型的研究主要是寻求一些特殊的菌株,这些菌株细胞中含有弱毒力因子 dsRNA,通过与属于同一 VCG 的强毒力菌株菌丝融合传播 dsRNA,使得被传播的菌株也变成低毒力菌株从而防治栗疫病。在这一系列研究当中,Anagnostakis^[17]于 20 世纪 70 年代首次在国际上报道栗疫病菌的营养体亲和性反应现象,将栗疫病菌不亲和反应类型分为 2 种(即本文中的 I 型和 III 型),并将这 2 种类型分别称为强不亲和性和弱不亲和性。王克荣等^[7]根据自己研究结果,对 Anagnostakis 的结论进一步发展和完备,认为栗疫病菌营养体不亲和性可细分为 3 种,即本实验所出现的 3 种营养体不亲和类型,并认为除了同一 VCG 的菌株之间能进行低毒力传递、转移之外,弱不亲和的菌株间也有可

能出现该过程。本试验结果中的 I 型和 II 型属于强不亲和性,且比例很大,依据王克荣的结论,可判断我国野生栗疫病菌在自然条件下进行低毒力传递、转移的难度较大。

另外,Marra^[11]与 McGuire^[14]的研究表明,栗疫病菌中存在 2 种交配型,并且部分栗疫病菌株具有异核(同一菌株同时具有 2 种相反的交配型)现象,本实验中也证明了这点:通过 Primary PCR 以及 Nested PCR 的联用,在湖北大老岭和陕西安康野生栗疫病菌群体以及部分子群体中,均既发现了只有 1 个交配型的菌株,也发现了同时具有 2 种交配型的菌株。

在影响栗疫病菌营养体亲和型多寡的诸多因素中,不同营养体亲和型的异交配型菌株之间的有性生殖过程是造成栗疫病菌营养体亲和型数量增多的一个主要因素;虽然外来菌株的引入也是主要因素之一,甚至是某些栽培果园里可能的唯一因素,但是在湖北和陕西采样地点,由于野生栗林受人为影响很小,故可忽略由于菌株的引入造成 VCG 数量较多的可能性。因此,不同 VCG 的异交配型栗疫病菌株分别在湖北、陕西两地区的同一地方共存有特殊的意义,这使得栗疫病菌进行有性杂交的内在因素已经具备,一旦外部条件适合,这些不同交配型菌株之间、双交配型菌株和单一交配型菌株之间,乃至不同双交配型菌株之间都有可能发生有性杂交,这在增加了野生栗疫病菌遗传多样性的同时,也不可避免的使其 VCG 的数量增加^[7,18],而该过程也是使湖北及陕西栗疫病病菌营养体亲和型多样性较大的成因,而在采样及分离过程中,能够观察到栗疫菌子囊存在也佐证了这一点。笔者还可推断出此两地栗疫病菌营养体亲和型数目有进一步增多的趋势;至于双交配型菌株是如何产生,且为什么在陕西安康地区的比例如此之大,这可能涉及到单病斑菌系来源,也可能涉及到栗疫病病菌其他复杂的遗传机制,这都需要进一步的研究。

参 考 文 献:

- [1] 郭世保,徐瑞福,刘鸣韬. 栗疫病研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 339-365
- [2] 杨 旺,韩光明,罗晓芳. 我国板栗疫病研究初报[J]. 北京林学院学报, 1979(1): 74-77
- [3] 黄宏文. 从世界栗属植物研究的现状看中国栗属资源保护的重要性[J]. 武汉植物学研究, 1998, 16(2): 171-176
- [4] 郎 萍,黄宏文. 栗属中国特有种居群的遗传多样性及地域差异[J]. 植物学报, 1999, 41(6): 651-657
- [5] 叶建仁,贺 伟. 林木病理学[M]. 北京:中国林业出版社,

2011;243

- [6] 王克荣, 邵见阳, 陆家云. 苏皖地区栗疫病菌营养体亲和性研究[J]. 南京农业大学学报, 1991, 14(4): 44-48
- [7] 王克荣, 周而勋, 陆家云. 中国东部栗疫病菌的交配型[J]. 南京农业大学学报, 1997, 20(3): 117-119
- [8] 张海旺, 张国珍. 一种简便易行的栗疫病菌单孢分离方法[J]. 植物保护, 2009, 35(3): 94-95
- [9] 季 哲, 李玉祥, 薛淑玉. 黄伞的交配型性状研究[J]. 菌物学报, 2004, 23(1): 38-42
- [10] 林彩丽, 王曦苗, 朴春根, 等. 一种用于 PCR 扩增的真菌 DNA 快速提取方法: 中国, 200910235594[P]. 2010
- [11] Marra R E. Selfing in the context of self-incompatibility: the mixed-mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica* [D]. Cornell University, Ithaca, NY, 1998
- [12] Braganca H, Simoes S, Onofre N, et al. *Cryphonectria parasitica* in Portugal: diversity of vegetative compatibility types, mating types, and occurrence of hypovirulence [J]. For Path, 2007, 37: 391-402
- [13] Cortesi P, Milgroom M G, Marco B. Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy[J]. Mycol Res, 1996, 100(9): 1087-1093
- [14] McGuire I C, Marra R E, Milgroom M G. Mating-type heterokaryosis and selfing in *Cryphonectria parasitica* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2004, 41: 521-533
- [15] 罗正均, 任本权, 吴纪才, 等. 板栗疫病菌营养体亲和性研究[J]. 重庆林业科技, 2004(2): 42-43, 49
- [16] Liu Y C, Michael G. Milgroom. High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China[J]. Mycologia, 2007, 99(2): 279-284
- [17] Anagnostakis S L. Vegetative incompatibility in *Endothia parasitica* [J]. Exp Mycol, 1977, 1: 306-316
- [18] 丁 平, 刘福秀, 王克荣. 有性生殖对栗疫病菌群体结构的影响[J]. 菌物学报, 2006, 25(1): 41-47