

金线莲菌根真菌的分离与鉴定

江绮晴^{1,2}, 方祥³, 郑贵朝¹

(1. 东莞生物技术研究, 广东东莞 523086) (2. 广东省生产许可证审查服务中心, 广东广州 510220)

(3. 华南农业大学, 广东广州 510642)

摘要: 从 38 株野生金线莲中共分离获得 29 株菌根真菌, 其中丝核菌类 (*Rhizoctonia sp.*) 真菌 7 株, 结合菌株形态、融合群测定及 5.8S rDNA-ITS 序列分析, 鉴定结果如下: J1、F1、F7 属于双核丝核菌 AG-P 融合群, F1、F7 为 AG-P 融合群中的同一亚群, J1 为不同的亚群; G1、G3、G5、G6 为多核丝核菌, 初步推断为兰科丝核菌类的念珠菌根菌 (*Moniliopsis*)。

关键词: 金线莲; 丝核菌; 融合

文章编号: 1673-9078(2012)9-1136-1138

Isolation and Identification of Mycorrhizal Fungi from *Anoectochilus roxburghii*

JIANG Qi-Qing^{1,2}, Fang Xiang³, Zheng Gui-Zhao¹

(1. Dongguan Research Institute of Biotechnology, Dongguan, Guangdong 523086, China)

(2. Guangdong Inspection Service Center of Production Licence, Guangzhou, Guangdong 510220, China)

(3. South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: 29 strains of endophytic fungi were isolated from *A. roxburghii*, and 7 strains belonged to *Rhizoctonia sp.* Basing on the culture modality of *Rhizoctonia sp.*, tests of anastomosis group and analysis of 5.8S rDNA-ITS, J1, F1, F7 were found to belong to binucleate *Rhizoctonia* AG-P. F1 and F7 were in the same sub-group, and J1 was in a single sub-group. G1, G3, G5 and G6 were pilot concluded belonging to *Moniliopsis* of multinucleate *Rhizoctonia* from orchid.

Key words: *A. roxburghii*; *Rhizoctonia sp.*; anastomosis

金线莲在自然界中与真菌共生。郭顺星等^[1]多次从野生金线莲菌根部分共分离得到 26 种内生真菌, 其中丝核菌类真菌约占 1/3, 其后郭顺星等对分离菌株进行生物活性测定, 结果表明 2 株丝核菌类真菌及 1 株开唇兰小菇属真菌能够明显促进金线莲生长, 并形成菌根结构。作者也曾从野生金线莲菌根部位分离出几株丝核菌, 发现其对金线莲种子的萌发有明显的促进作用。

为了获得更多更优良的菌根真菌, 作者再次从福建、广西等地采集野生金线莲, 并对其菌根真菌进行分离与鉴定, 为实现人工培育金线莲共生苗打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌根真菌的分离

采集福建及广西野生金线莲, 取其下茎段, 用洗

衣粉溶液浸泡, 自来水冲洗干净后切割, 保留茎节段, 75% 酒精浸泡 10~20 s, 0.1% 升汞浸泡 2~3 min, 无菌水冲洗 5 次, 最后将茎节段置于 PDA (含 100 μ/mL 硫酸链霉素) 平板中, 28 °C 培养。待真菌菌丝从茎节内长出后, 挑取尖端菌丝纯化培养。

1.2 菌根真菌的鉴定

根据培养特征及菌丝差异, 将所分离菌株初步鉴定到属, 并采用番红 O-KOH 细胞核染色^[2]、菌丝融合测定^[3]及 5.8S rDNA-ITS^[4,5]序列分析作进一步的分类。其中菌丝融合测试包括分离菌株间的互相融合及分离菌株与标准菌株间的融合。采用了丝核菌标准菌株 AG-1-IA、AG-1-IC、AG-2-1、AG-2-2IV、AG-2-IIIB、AG-3、AG-4、AG-5、AG-6、AG-8、AG-9、AG-9-S21, 由华南农业大学周而助教授提供。其余多核丝核菌标准菌株及双核丝核菌标准菌株因缺乏而无法进行全面的测试。

1.3 5.8S rDNA-ITS 序列分析

1.3.1 DNA 提取

采用庄彩云等^[6]的改良 SDS 提取法。

收稿日期: 2012-08-19

基金项目: 东莞市高等院校科研机构科技计划项目(2007108101106)

作者简介: 江绮晴 (1984-), 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物

通讯作者: 郑贵朝, 研究员, 研究方向: 生物技术

1.3.2 PCR 扩增

采用真菌rDNA特异性扩增通用引物ITS1、ITS4，参照于金凤^[7]的5.8SrDNA-ITS区特异性PCR反应体系及条件，成功扩增后将PCR产物送往广州景瑞生物技术公司进行纯化、克隆、转化，最后双向测序。

1.3.3 序列分析

在GenBank上下载各测序序列同源率最高的ITS序列，以及立枯丝核菌融合群、玉蜀丝核菌、双核丝核菌部分菌株ITS序列。所有序列经过ClustalX1.8软件比对，掐头掐尾后用MEGA4.0软件构建Neighbor-Joining (NJ) 系统发育树。

2 结果与分析

2.1 金线莲菌根真菌分离情况

从38株野生金线莲中共分离获得29株菌根真菌，分离率达76.3%。根据培养特征及菌丝形态差异，将相同的种类合并，共获得纯化的菌根真菌有15种，其中丝核菌类真菌有7种^[8-10]。由于丝核菌类真菌为目标菌，故本文只对丝核菌类真菌作进一步的鉴定。

2.2 细胞核染色与融合测定

经过番红O-KOH细胞核染色结果(图1)，可将7株丝核菌类菌株分为两大类：双核丝核菌(J1, F1, F7)、多核丝核菌(G1, G3, G5, G6)。在培养过程中，G1、G5菌落形态变化很大，生长速度快慢不一，而其余菌株变化甚小。

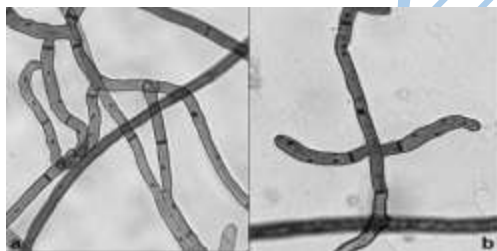


图1 丝核菌细胞核染色结果(a-双核 ×400; b-多核 ×400)

Fig.1 Nucleolus coloration of *Rhizoctonia sp.*

融合测试中，双核丝核菌测试菌株J1与F1、F7不完全融合，F1与F7完全融合，说明三者均来自同一融合群，其中F1、F7为同一亚群，J1为不同的亚群；多核丝核菌测试菌株之间及其与各立枯丝核菌标准菌株之间均不融合，表明所分离多核丝核菌之间互不为同一融合群，也不属于所测试立枯丝核菌标准菌株的任一融合群。

2.3 5.8S rDNA-ITS序列分析

采用真菌ITS通用引物ITS1与ITS4成功扩增7株丝核菌菌株，长度在684 bp~706 bp之间(含引物)。所有分离菌株序列提交至GenBank，进行序列相似性检索，得到各样品的最相似序列的种属及相似度(表1)。

表1 GenBank中与分离菌株5.8S rDNA-ITS核苷序列相似度最高的序列

Table 1 Highest similarity sequences to each isolate from the GenBank database

样品登记号	最相似序列			相似率/%
	种属	寄主	来源	
J1 DQ885776	<i>Ceratobasidium sp.</i>	AG-P unknown	China	98
F1 AB286941	<i>Ceratobasidium sp.</i>	AG-P unknown	Japan	97
F7 AB286941	<i>Ceratobasidium sp.</i>	AG-P unknown	Japan	97
G1 AJ318435	<i>Rhizoctonia solani</i>	orchids	Singapore	95
G3 DQ301760	<i>Ceratobasidium sp.</i>	AG-P kale	Brazil	94
G5 DQ301760	<i>Ceratobasidium sp.</i>	AG-P kale	Brazil	95
G6 AJ318435	<i>Rhizoctonia solani</i>	orchids	Singapore	95

下载上述同源率最高的几个序列，以及立枯丝核菌融合群、玉蜀丝核菌、双核丝核菌部分菌株ITS序列，用ClustalX及MEGA构建NJ系统发育树。

从构建的NJ发育树上可见(图2)，测试菌株、立枯丝核菌融合群(有性世代为*Thanatephonus cucumeris*)、除AG-P外的双核丝核菌融合群(有性世代为*Ceratobasidium*)、兰科双核丝核菌(有性世代为*Tulasnella*)、稻谷斑玉蜀黍丝核菌(有性世代为*Waitea cicutata*)均独立成枝，表明测试菌株间的遗传差异较小而与其它已知菌株遗传差异较大。局部上，7个分离菌株又分为三个枝，其中双核丝核菌J1、F1、F7与AG-P聚为一枝，多核丝核菌G1、G6、G5与AJ318434、AJ318435、DQ301760聚为一枝，G3单独一枝。可见，G3在测试分离菌株中遗传上差异最大。

从总体上，基于5.8S rDNA-ITS序列分析构建的NJ发育树的分类与融合群测定结果基本相符。根据Sharon^[11]研究结果-如果测试菌株与已知融合群菌株ITS序列相似率在95%以上，且遗传发育树上两者聚为同一枝，则两者极有可能为同一融合群或同一亚群。结合NJ发育树、融合群测定结果及菌株形态，可推出J1、F1、F7属于AG-P融合群，其中F1、F7为AG-P中的同一亚群，与J1则为不同的亚群。多核丝核菌中包括立枯丝核菌，水稻玉蜀黍丝核菌及兰科丝核菌中的念珠菌根菌。从NJ发育上看，本文所分离的多核菌株G1、G3、G5、G6与立枯丝核菌各融合群、稻谷斑玉蜀黍丝核菌各自成枝，遗传差异较大，这与融合群测定中4株多核菌株与立枯丝核菌融合群互不融合的结果是相符的。在形态上，上述4个菌株与立枯丝核菌、稻谷斑玉蜀黍丝核菌差异又较大。因此，根据NJ发育树、融合测定结果及菌株形态，推断G1、G3、G5、G6可能为同样为多核的念珠菌根菌。虽然在NJ发育树上G1、G6与

标注为立枯丝核菌的AJ318435归为一枝,相似率达95%,但由于AJ318435也从兰科植物中分离所得,结合比对结果,推断AJ318435归入立枯丝核菌可能有误。

