

文章编号: 1001-1498(2008)06-0825-07

# 乳牛肝菌属分离株分子鉴定及其遗传关系的研究\*

冯锦霞<sup>1</sup>, 王敏杰<sup>2</sup>, 闫伟<sup>1\* \*</sup>

(1. 内蒙古农业大学林学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

**摘要:** 本文采用 ITS 序列分析方法和 ITS-RFLP 分子标记方法对内蒙古大青山地区分离获得的 27 个乳牛肝菌属 (*Suillus* spp.) 真菌菌株进行了分子鉴定和遗传关系研究。通过 ITS 序列比对鉴定出 SP1、SP2、SP3、SP4、SP5、SP6、SP7、SP8、SP9、SF1、SF2、SF3、P. Lac-1、P. Lac-2、3、3、3<sup>#</sup> 菌株属于褐环乳牛肝菌 (*Suillus luteus*)。27 株乳牛肝菌属真菌分为 3 个遗传类型, 且每个遗传类型在分类上属于同一个种。樟和 1<sup>#</sup> 与其余菌株的遗传距离较大, 其原因可能是宿主和生境的影响。序列分析方法能够更准确地分析出遗传差异, 但 ITS-RFLP 方法更简单、实用, 可以用于初步的菌株鉴定。两种方法结合可以更有效和准确地鉴定外生菌根真菌和研究其遗传关系。

**关键词:** 外生菌根真菌; 乳牛肝菌属; ITS; 分子鉴定; 遗传多样性; ITS-RFLP; 序列分析

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

## Study on Molecular Identification and Genetic Relationships of Ectomycorrhizal Strains of *Suillus* Gene

FENG Jin-xia<sup>1</sup>, WANG Ming-ji<sup>2</sup>, YAN Wei<sup>1</sup>

(1. College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, Inner Mongolia, China;

2. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

**Abstract:** The molecular identification and genetic diversity of 27 *Suillus* strains isolated from Inner Mongolia were studied based on the sequencing analysis of ITS, the internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes, and ITS-RFLP for the first time. ITS sequences of 27 *Suillus* strains were subjected to a GenBank search and SP1, SP2, SP3, SP4, SP5, SP6, SP7, SP8, SP9, SF1, SF2, SF3, P. Lac-1, P. Lac-2, 3, 3, 3<sup>#</sup> were belonged to *Suillus luteus* with 99% similarity to DQ440568.1 in GenBank. These *Suillus* strains were classified into 3 genotypes. The great genetic distance of "zhang2" and 1<sup>#</sup> from others might be the results of the influence by its hosts and habitats. Although sequence analysis of ITS was accurate, the ITS-RFLP was simple and practical and might be useful to the quick identification of ectomycorrhizal fungi. It was more effective and accurate for using these two techniques combination.

**Key words:** ectomycorrhize; *Suillus*; ITS; genetic diversity; molecular identification; ITS-RFLP; sequencing analysis

乳牛肝菌属 (*Suillus* Mich. ex Gray) 属担子菌亚门 (Basidiomycotina), 层菌纲 (Hymenomyces), 伞菌目 (Agaricales), 牛肝菌科 (Boletaceae)<sup>[1]</sup>。乳牛肝

菌属真菌对针叶树种有很高的宿主专一性, 是松属 (*Pinus* Linn.) 的优势外生菌根真菌, 它的分布与松属的天然分布相一致<sup>[2]</sup>。

收稿日期: 2007-04-10

基金项目: 国家自然科学基金 (30660150)

作者简介: 冯锦霞 (1980—), 女, 内蒙古乌海人, 硕士。E-mail: fengjinxia2000@163.com

\* 致谢: 本文得到中国林业科学研究院卢孟柱研究员的指导和支持, 特致谢意。

\* \* 通讯作者: 闫伟, 教授, 主要从事林木菌根生物技术研究。E-mail: weiyang@inau.edu.cn

核糖体 RNA (rDNA) 基因包括 18S、ITS1、5.8S、ITS2 和 28S 基因及其非转录区 (IGS)。其中 ITS1、5.8S rDNA 基因和 ITS2 常被合称为 ITS 区, ITS 区是中度保守区域, 其保守性基本上表现为种内相对一致, 种间差异比较明显<sup>[3]</sup>。自 ITS 区特定分类单元扩增的特异性引物相继被设计出来就在菌根研究中得到广泛应用<sup>[4]</sup>。

乳牛肝菌 (*Suillus* spp.) 真菌的大量研究工作证明核糖体 RNA 可以用于推断乳牛肝菌属内不同种之间的系统发育学关系<sup>[5-8]</sup>。ITS 区的 RFLP 图谱能准确地区分开乳牛肝菌属内的不同种<sup>[9]</sup>。目前, ITS-RFLP 分子标记和 ITS 区 DNA 序列分析被广泛用于外生菌根真菌分子鉴定<sup>[10-11]</sup>、遗传关系<sup>[12-13]</sup>、菌根真菌多样性<sup>[14-15]</sup>、真菌种群结构<sup>[8, 16]</sup>以及菌根真菌在苗圃和造林地上持久性<sup>[17]</sup>等方面的研究。

在内蒙古大青山地区的大部分牛肝菌科 (Boletaceae) 真菌主要以油松 (*Pinus tabulaeformis* Carr.)、华北落叶松 (*Larix principis-rupprechtii* Mayr.)、白桦 (*Betula platyphylla* Suk.)、云杉 (*Picea asperata* Mast) 等为主要宿主植物。乳牛肝菌属真菌是大青山地区油松和樟子松 (*Pinus sylvestris* L. var. *mongolica* Litv.) 的优势外生菌根真菌。内蒙古农业大学在内蒙古大青山地区多年开展优良外生菌根菌种和菌株的采集和筛选, 已经从子实体和外生菌根上分离、纯化得到大量菌株。因此对实验室现有菌种进行更可靠的鉴定是菌根实验室开展应用研究亟待解决的问题。本文采取 ITS 区 DNA 序列分析来鉴定乳牛

肝菌属真菌菌种并将从分子水平研究内蒙古大青山地区乳牛肝菌属真菌的遗传关系<sup>[18-19]</sup>, 旨在弄清此地区乳牛肝菌属真菌的分类, 有利于探索乳牛肝菌与不同宿主植物间的共生理理, 筛选对一定土壤和环境状况适应性更强的优良外生菌根菌种, 进而在生态恢复区实施菌根生物应用技术, 使其在提高宿主抗性、成活率、生物量上发挥更大的有益效应, 为生态退化区植被的恢复与重建在理论和技术上提供指导<sup>[20]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 DNA 提取及 PCR 扩增

菌株由内蒙古农业大学菌根实验室提供 (见表 1), 经菌根形态和子实体鉴定 27 株真菌应属于乳牛肝菌属。

所有菌株采用 Pach 培养基置 25℃ 下培养 10 d 后, 刮取其菌丝体, 立刻放入研磨管用液氮研磨成粉末状, 提取总 DNA, 总 DNA 经 RNA 酶纯化后, PCR 扩增 rDNA ITS 区段, 经 0.8% 琼脂糖凝胶在 1×TAE 电泳缓冲液中电泳分析, 方法参照参考文献 [21]。用 B 型小量 DNA 片段快速纯化回收试剂盒 (北京博大泰克生物基因技术有限公司) 纯化 PCR 扩增产物。使用通用引物 ITS1-F 和 ITS4-B, 由北京奥科生物技术有限责任公司合成, 其序列为:

ITS1-F: 5'-CTTGGTCA TTTTA GA GGAA GTAA-3'

ITS4-B: 5'-CA GGA GACTTGTCACGGTCCAG-3'

表 1 菌株名称及基本情况

| 编号    | 分离菌株代号                      | 采样地       | 宿主      | 分离组织 | 分离年份 |
|-------|-----------------------------|-----------|---------|------|------|
| 1-9   | SP1 ~ SP9                   | 呼和浩特郊区苗圃地 | 2年生油松幼苗 | 菌根   | 2002 |
| 10-12 | SF1 ~ SF3                   | 大青山油松人工林  | 20年生油松  | 子实体  | 2002 |
| 13    | 96牛                         | 大青山油松人工林  | 20年生油松  | 子实体  | 1996 |
| 14    | 99牛                         | 大青山油松人工林  | 20年生油松  | 子实体  | 1999 |
| 15    | 00牛                         | 大青山油松人工林  | 20年生油松  | 子实体  | 2000 |
| 16    | <i>Suillus</i> 2            | 大青山       | 20年生油松  | 菌根   | 2002 |
| 17    | P. Lac-1                    | 大青山       | 20年生油松  | 菌根   | 2002 |
| 18    | P. Lac-2                    | 大青山       | 20年生油松  | 菌根   | 2002 |
| 19    | 樟                           | 大青山       | 樟子松大树   | 菌根   | 2002 |
| 20    | 3                           | 大青山       | 20年生油松  | 菌根   | 2002 |
| 21    | 1                           | 大青山混交林    | 20年生油松  | 菌根   | 2002 |
| 22    | 3                           | 大青山       | 20年生油松  | 菌根   | 2002 |
| 23    | 3 <sup>#</sup>              | 大青山       | 20年生油松  | 菌根   | 2002 |
| 24    | 6 <sup>#</sup> <i>Pinus</i> | 大青山       | 20年生油松  | 菌根   | 2002 |
| 25    | 6 <sup>#</sup> <i>Pinus</i> | 大青山       | 20年生油松  | 菌根   | 2002 |
| 26    | 6 <sup>#</sup> <i>Pinus</i> | 大青山       | 20年生油松  | 菌根   | 2002 |
| 27    | 6 <sup>#</sup> <i>Pinus</i> | 大青山       | 20年生油松  | 菌根   | 2002 |

## 1.2 PCR扩增产物的克隆及测序

采用 pMD18-T Vector 质粒 (TaKaRa 公司) 为克隆载体与 ITS 区进行连接, 采用大肠杆菌 (*Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers) 感受态细胞 DH5 (北京天为时代科技有限公司) 进行转化, 经 PCR 法检测确认载体中插入 ITS 片段的长度大小。每个菌株测两个不同克隆的序列来确定准确序列。由北京奥科生物技术有限责任公司进行测序。

## 1.3 ITS 区段的序列比对及遗传多样性分析

将所得测序结果输入 GenBank, 运用 BLAST 进行序列比对, 序列相似系数在 99% 以上在分类上被确定为同一种<sup>[9,11]</sup>。使用 DNA star 软件中 ClustalW 方法进行多重序列比对分析, 得到菌株之间的遗传距离和序列相似系数。在 GenBank 中选取与乳牛肝菌属真菌亲缘关系相近的一些代表菌株, 同时以属外成员空柄小牛肝菌 (*Bolbitis cavipes* (Opat) Kalchbr) 为外群, 根据 DNA-MAN 5.2.10 软件的多重序列排列比对分析 (Mul-

tip le Sequence Alignment) 程序中 Kimura 模型构建系统进化树 (Phylogenetic trees), 通过自举检验法 (从 1 000 个重复实验分析中计算出自举检验值 (bootstrap values)) 来评价每个菌株之间的系统发育关系。

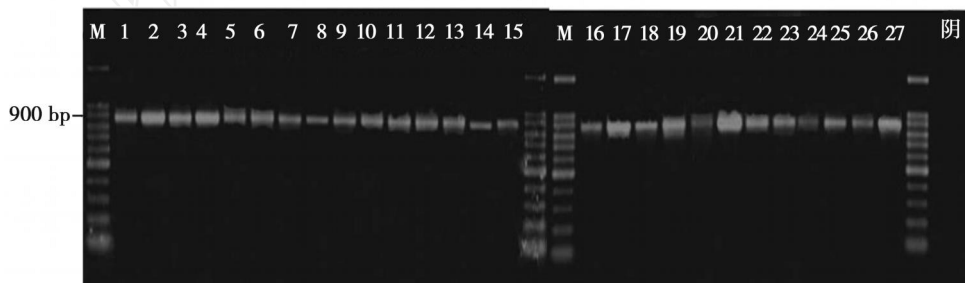
## 1.4 rDNA ITS 区的酶切

纯化 PCR 扩增产物 3  $\mu$ L 分别用 Hae I、Alu I、Hinf I (0.5  $\mu$ L) 于 37  $^{\circ}$ C 酶切 2 h, 用 3% 的琼脂糖凝胶在 0.5  $\times$  TBE 电泳缓冲液中电泳分离, UV 凝胶成像系统扫描并记录扩增产物在琼脂糖凝胶上的酶切片段。每个 PCR 扩增产物至少被一种酶消化 2 次, 来确定酶切图谱和片段大小。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增产物的检测与分析

27 株乳牛肝菌 rDNA ITS 区经 PCR 反应扩增, 扩增产物用凝胶电泳检测得到大小约 900 bp 的特异性条带, 阴性对照中无任何扩增条带 (见图 1)。



M 为 100 bp Marker, 1~27 为菌株编号

图 1 27 株乳牛肝菌属真菌 ITS 区段 PCR 产物凝胶电泳图

### 2.2 测序结果和 BLAST 序列比对结果分析

(1) SP1、SP2、SP3、SP4、SP5、SP6、SP7、SP8、SP9、SF1、SF2、SF3、3、3、P. Lac-1、P. Lac-2 和 3<sup>#</sup> 与数据库中褐环乳牛肝菌 (*Suillus luteus* (L. ex Fr) Gray) 分离株 DQ440568.1 全长 802 bp 同源性高达 99% (800/802), 证明这些菌株在分类上属于褐环乳牛肝菌。

(2) 96 牛和 99 牛全长 873 bp; 00 牛、*Suillus* 2、6<sup>#</sup> *Pinus*、6<sup>#</sup> *Pinus*、6<sup>#</sup> *Pinus*、6<sup>#</sup> *Pinus* 全长 874 bp 与数据库中褐粘盖牛肝菌 (*Suillus collinitus* Fr) 分离株 AY935515.1 全长 835 bp 同源性为 97% (811/835); 与点柄乳牛肝菌 (*Suillus granulatus* (L. : Fr) O. Kuntze) AJ272410.1 全长 691 bp 同源性为 98% (681/692)。

(3) 樟、1 全长 870 bp 与数据库中褐环乳牛肝菌分离株 DQ367918.1 全长 1062 bp 同源性为 97% (811/835); 与数据库中厚环乳牛肝菌 (*Suillus grevillei* (Kl) Sing) 分离株 M91616.1 全长 653 bp 同源性为 97% (591/597)。

### 2.3 序列相似性和聚类分析结果

根据序列中碱基差异 27 株乳牛肝菌属真菌聚为三个遗传类型 (见图 2): SP1、SP2、SP3、SP4、SP5、SP6、SP7、SP8、SP9、SF1、SF2、SF3、P. Lac-1、P. Lac-2、3、3、3<sup>#</sup> 为第一类, 96 牛、99 牛、00 牛、*Suillus* 2、6<sup>#</sup> *Pinus*、6<sup>#</sup> *Pinus*、6<sup>#</sup> *Pinus*、6<sup>#</sup> *Pinus* 为第二类, 樟、1 为第三类。

根据序列相似系数 (见表 2) 大于 99%, 判断菌种在分类上属于同一种, 序列比对结果表明, SP1、

表 2 27 株乳牛肝菌属真菌序列差距和相似系数

序列相似系数/%

|    | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7     | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26    |      |
|----|-----|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|-------|------|
| 1  | 100 | 99.7 | 93.3 | 93.4 | 99.8 | 99.5 | 99.7  | 95.1 | 94.9 | 95.2 | 95.1 | 99.7 | 99.5 | 99.5 | 99.7  | 99.5  | 99.7  | 99.7  | 99.8  | 99.9 | 99.4 | 99.5 | 94.7 | 94.8 | 95.1 |       |      |
| 2  | 0.3 | 100  | 93.8 | 93.9 | 99.8 | 99.5 | 100.0 | 95.4 | 95.3 | 95.5 | 95.4 | 99.8 | 99.8 | 99.8 | 99.9  | 99.9  | 99.8  | 99.9  | 99.9  | 99.8 | 99.7 | 99.7 | 99.7 | 95.1 | 95.2 | 95.4  |      |
| 3  | 6.4 | 6.2  | 100  | 99.7 | 93.6 | 93.3 | 93.7  | 92.0 | 91.8 | 92.1 | 92.0 | 93.6 | 93.6 | 93.6 | 93.7  | 93.6  | 93.7  | 93.7  | 93.7  | 93.6 | 93.4 | 93.6 | 91.4 | 91.5 | 92.0 |       |      |
| 4  | 6.3 | 6.1  | 0.3  | 100  | 93.7 | 93.4 | 93.8  | 92.1 | 92.0 | 92.2 | 92.1 | 93.7 | 93.7 | 93.7 | 93.8  | 93.8  | 93.7  | 93.8  | 93.8  | 93.7 | 93.6 | 93.7 | 91.5 | 91.6 | 92.1 |       |      |
| 5  | 0.2 | 0.1  | 6.3  | 6.2  | 100  | 99.8 | 99.9  | 95.4 | 95.3 | 95.5 | 95.4 | 99.7 | 99.8 | 99.8 | 99.9  | 99.9  | 99.8  | 99.9  | 99.8  | 99.9 | 99.9 | 99.7 | 95.1 | 95.2 | 95.4 |       |      |
| 6  | 0.5 | 0.3  | 6.6  | 6.4  | 0.2  | 100  | 99.7  | 95.2 | 95.1 | 95.3 | 95.2 | 99.4 | 99.5 | 99.5 | 99.7  | 99.7  | 99.5  | 99.7  | 99.5  | 99.5 | 99.7 | 99.4 | 99.4 | 94.8 | 94.9 | 95.2  |      |
| 7  | 0.3 | 0.0  | 6.2  | 6.0  | 0.1  | 0.3  | 100   | 95.4 | 95.3 | 95.5 | 95.4 | 99.9 | 99.9 | 99.9 | 100.0 | 100.0 | 99.9  | 100.0 | 100.0 | 99.9 | 99.8 | 99.8 | 95.1 | 95.2 | 95.4 |       |      |
| 8  | 4.5 | 4.2  | 7.5  | 7.3  | 4.3  | 4.5  | 4.2   | 100  | 99.9 | 99.9 | 99.8 | 95.2 | 95.3 | 95.3 | 95.4  | 95.4  | 95.3  | 95.4  | 95.3  | 95.2 | 95.2 | 95.2 | 95.3 | 99.7 | 99.7 | 100.0 |      |
| 9  | 4.7 | 4.3  | 7.6  | 7.5  | 4.4  | 4.7  | 4.3   | 0.1  | 100  | 99.8 | 99.7 | 95.1 | 95.2 | 95.2 | 95.3  | 95.3  | 95.2  | 95.2  | 95.2  | 95.1 | 95.1 | 95.2 | 99.5 | 99.5 | 99.9 |       |      |
| 10 | 4.4 | 4.1  | 7.3  | 7.2  | 4.2  | 4.4  | 4.0   | 0.1  | 0.2  | 100  | 99.9 | 95.3 | 95.4 | 95.4 | 95.5  | 95.4  | 95.5  | 95.4  | 95.4  | 95.3 | 95.3 | 95.4 | 99.5 | 99.5 | 99.9 |       |      |
| 11 | 4.5 | 4.2  | 7.5  | 7.3  | 4.3  | 4.5  | 4.2   | 0.2  | 0.3  | 0.1  | 100  | 95.2 | 95.3 | 95.4 | 95.4  | 95.3  | 95.4  | 95.3  | 95.3  | 95.2 | 95.2 | 95.2 | 95.3 | 99.4 | 99.4 | 99.8  |      |
| 12 | 0.3 | 0.1  | 6.3  | 6.2  | 0.2  | 0.5  | 0.1   | 4.3  | 4.4  | 4.2  | 4.3  | 100  | 99.7 | 99.7 | 99.8  | 99.8  | 99.7  | 99.8  | 99.8  | 99.7 | 99.5 | 99.5 | 99.5 | 94.9 | 95.1 | 95.3  |      |
| 13 | 0.5 | 0.1  | 6.3  | 6.2  | 0.2  | 0.5  | 0.1   | 4.3  | 4.4  | 4.2  | 4.3  | 0.2  | 100  | 99.8 | 99.9  | 99.9  | 99.8  | 99.9  | 99.8  | 99.8 | 99.7 | 99.7 | 99.7 | 95.1 | 95.2 | 95.4  |      |
| 14 | 0.5 | 0.1  | 6.3  | 6.2  | 0.2  | 0.5  | 0.1   | 4.3  | 4.4  | 4.2  | 4.3  | 0.2  | 0.2  | 100  | 99.9  | 99.9  | 99.8  | 99.9  | 99.8  | 99.8 | 99.7 | 99.7 | 99.7 | 95.1 | 95.2 | 95.4  |      |
| 15 | 0.3 | 0.1  | 6.2  | 6.1  | 0.1  | 0.3  | 0.0   | 4.2  | 4.3  | 4.0  | 4.2  | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 100   | 99.9  | 100.0 | 99.9  | 99.9  | 99.8 | 99.8 | 99.8 | 99.8 | 95.2 | 95.3 | 95.5  |      |
| 16 | 0.3 | 0.0  | 6.2  | 6.1  | 0.1  | 0.3  | 0.0   | 4.2  | 4.3  | 4.0  | 4.2  | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.0   | 100   | 99.9  | 100.0 | 99.9  | 99.9 | 99.8 | 99.8 | 99.8 | 99.8 | 95.2 | 95.3  | 95.5 |
| 17 | 0.5 | 0.0  | 6.3  | 6.2  | 0.2  | 0.5  | 0.1   | 4.3  | 4.4  | 4.2  | 4.3  | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.1   | 0.1   | 100   | 99.9  | 99.8  | 99.8 | 99.7 | 99.7 | 99.7 | 95.1 | 95.2 | 95.4  |      |
| 18 | 0.3 | 0.1  | 6.2  | 6.1  | 0.1  | 0.3  | 0.0   | 4.2  | 4.3  | 4.0  | 4.2  | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.0   | 0.0   | 0.1   | 100   | 99.9  | 99.9 | 99.8 | 99.8 | 99.8 | 95.2 | 95.3 | 95.5  |      |
| 19 | 0.3 | 0.0  | 6.2  | 6.1  | 0.1  | 0.3  | 0.0   | 4.2  | 4.3  | 4.0  | 4.2  | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.0   | 0.0   | 0.1   | 0.0   | 100   | 99.8 | 99.7 | 99.7 | 99.7 | 95.1 | 95.2 | 95.4  |      |
| 20 | 0.2 | 0.1  | 6.2  | 6.1  | 0.2  | 0.5  | 0.1   | 4.3  | 4.4  | 4.2  | 4.3  | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.1   | 0.1   | 0.2   | 0.1   | 0.1   | 100  | 99.7 | 99.7 | 99.7 | 95.1 | 95.2 | 95.4  |      |
| 21 | 0.1 | 0.2  | 6.3  | 6.2  | 0.1  | 0.3  | 0.2   | 4.4  | 4.5  | 4.3  | 4.4  | 0.3  | 0.3  | 0.3  | 0.2   | 0.2   | 0.3   | 0.2   | 0.2   | 0.1  | 100  | 99.7 | 94.9 | 95.1 | 95.3 |       |      |
| 22 | 0.6 | 0.2  | 6.4  | 6.3  | 0.3  | 0.6  | 0.2   | 4.4  | 4.5  | 4.3  | 4.4  | 0.3  | 0.3  | 0.3  | 0.2   | 0.2   | 0.3   | 0.2   | 0.2   | 0.3  | 0.5  | 100  | 99.5 | 94.9 | 95.1 | 95.3  |      |
| 23 | 0.5 | 0.2  | 6.3  | 6.2  | 0.3  | 0.6  | 0.2   | 4.3  | 4.4  | 4.2  | 4.3  | 0.3  | 0.3  | 0.3  | 0.2   | 0.2   | 0.3   | 0.2   | 0.2   | 0.2  | 0.3  | 0.5  | 100  | 95.1 | 95.2 | 95.4  |      |
| 24 | 4.5 | 4.2  | 7.9  | 7.8  | 4.3  | 4.5  | 4.2   | 0.3  | 0.5  | 0.5  | 0.6  | 4.3  | 4.3  | 4.3  | 4.2   | 4.2   | 4.3   | 4.2   | 4.2   | 4.3  | 4.4  | 4.4  | 4.3  | 100  | 99.7 | 99.5  |      |
| 25 | 4.5 | 4.2  | 7.9  | 7.8  | 4.3  | 4.5  | 4.2   | 0.3  | 0.5  | 0.5  | 0.6  | 4.3  | 4.3  | 4.3  | 4.2   | 4.2   | 4.3   | 4.2   | 4.2   | 4.3  | 4.4  | 4.4  | 4.3  | 0.2  | 100  | 99.7  |      |
| 26 | 4.5 | 4.2  | 7.5  | 7.3  | 4.3  | 4.5  | 4.2   | 0.0  | 0.1  | 0.1  | 0.2  | 4.3  | 4.3  | 4.3  | 4.2   | 4.2   | 4.3   | 4.2   | 4.2   | 4.3  | 4.4  | 4.4  | 4.3  | 0.3  | 0.3  | 100   |      |
| 27 | 4.8 | 4.4  | 7.7  | 7.6  | 4.5  | 4.8  | 4.4   | 0.2  | 0.3  | 0.3  | 0.5  | 4.5  | 4.5  | 4.5  | 4.4   | 4.4   | 4.5   | 4.4   | 4.4   | 4.5  | 4.7  | 4.7  | 4.5  | 0.6  | 0.6  | 0.2   |      |
|    | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7     | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26    |      |

注: 1: P. Lac-1, 2: P. Lac-2, 3: 1, 4:樟, 5: 3, 6: 3, 7: 3<sup>#</sup>, 8: 6<sup>#</sup>Pinus, 9: 6<sup>#</sup>Pinus, 10: 6<sup>#</sup>Pinus, 11: 6<sup>#</sup>Pinus, 12~20: SP1~SP9, 21~23: SF1~SF3, 24: 96牛, 25: 99牛, 26: 00牛, 27: Suillus2.

SP2、SP3、SP4、SP5、SP6、SP7、SP8、SP9、SF1、SF2、SF3、P. Lac-1、P. Lac-2、3、3、3<sup>#</sup>菌株在分类上属于同一种(序列相似系数 99.78%), 96牛、99牛、00牛、Suillus2、6<sup>#</sup>Pinus、6<sup>#</sup>Pinus、6<sup>#</sup>Pinus、6<sup>#</sup>Pinus 菌株在分类上属于同一种(序列相似系数 99.79%), 樟、1 菌株在分类上属于同一种(序列相似系数为 99.66%), 三个遗传类型中的菌株之间没有多态性。其中, P. Lac-2, SP4, SP5, SP7, SP8, 3<sup>#</sup>序列相似系数高达 100%, 00牛和 6<sup>#</sup>Pinus 序列相似系数高达 100%。

2.4 系统发育分析结果

由进化树(见图 3)可以看出 27 株乳牛肝菌属真菌分为 3 个进化枝, 自举检验值均为 100%, 所有乳牛肝菌属真菌与属外空柄小牛肝菌亲缘关系较远(自举检验值为 100%)。27 株乳牛肝菌属真菌与 Suillus lakei 亲缘关系较远(自举检验值为 99%)。樟、1 与其余菌株亲缘关系较远(自举检验值为

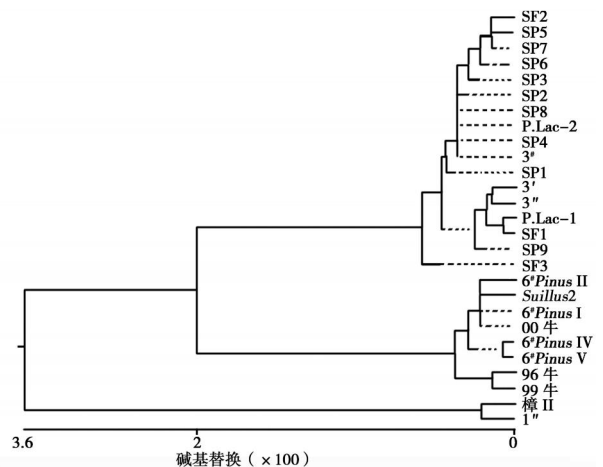


图 2 27 株乳牛肝菌属真菌同源聚类图

100%)。樟、1 与褐环乳牛肝菌分离株 DQ367918.1 和厚环乳牛肝菌各菌株聚在一起, 成为一簇(自举检验值为 100%)。其余菌株和点柄乳牛肝菌聚在一起, 成为一簇(自举检验值为 100%)。

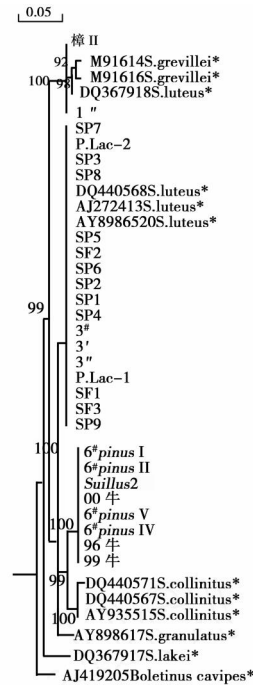
SP1、SP2、SP3、SP4、SP5、SP6、SP7、SP8、SP9、SF1、SF2、SF3、P. Lac-1、P. Lac-2、3、3、3<sup>#</sup>与褐环乳牛肝菌各菌株处在同一分枝。96牛、99牛、00牛、*Suillus2*、6<sup>#</sup>*Pinus*、6<sup>#</sup>*Pinus*、6<sup>#</sup>*Pinus*、6<sup>#</sup>*Pinus*与褐粘盖牛肝菌亲缘较近(自举检验值为 99%)。

2.5 ITS-RFLP图谱结果与分析

根据序列选取 Hae、A lu I Hinf 三种限制性内切酶,得到 27株乳牛肝菌属真菌每种酶的酶切图谱(见图 4、5、6),图谱将 27株乳牛肝菌属真菌分为二个不同的类群(见表 3),樟,1为第一类群,其余 25个菌株为第二类群。

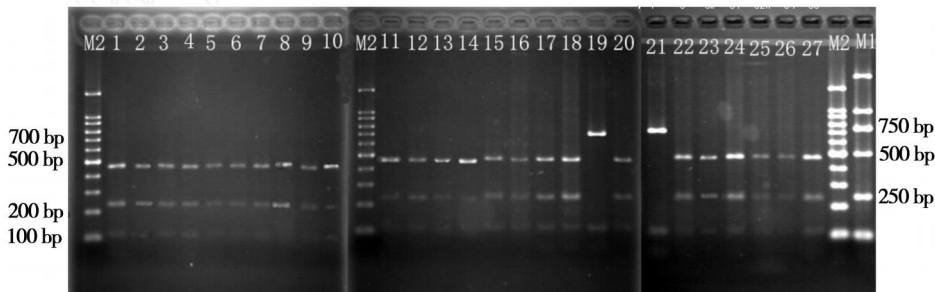
表 3 酶切图谱类型 bp

| 限制性内切酶类型    | 图谱类型               |                   |
|-------------|--------------------|-------------------|
|             | (樟,1)              | (其余 25株)          |
| Hae (图 4)   | 750, 110, 50       | 500, 250, 110, 50 |
| A lu I(图 5) | 800, 100           | 700, 120, 50      |
| Hinf (图 6)  | 350, 250, 150, 100 | 250, 150, 100, 50 |



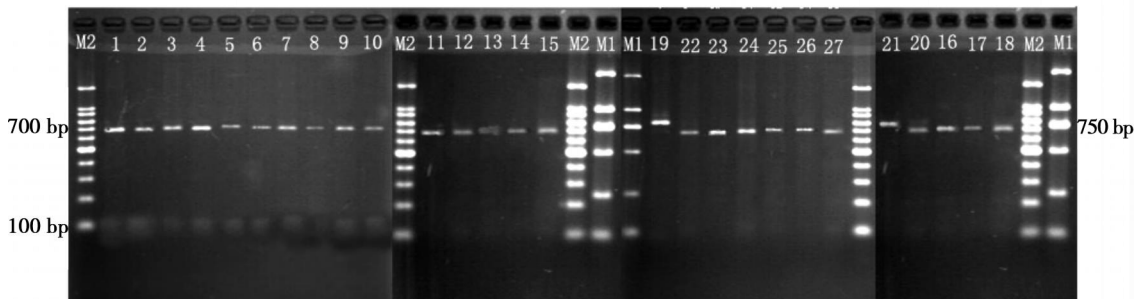
\* 为 GenBank基因核酸数据库中登录菌株

图 3 27株乳牛肝菌属真菌系统发育图



M1: DL2000 Marker M2: 100 bp Marker 1 ~ 27: 菌种编号

图 4 Hae 酶切凝胶电泳图谱



M1: DL2000 Marker M2: 100 bp Marker 1 ~ 27: 菌种编号

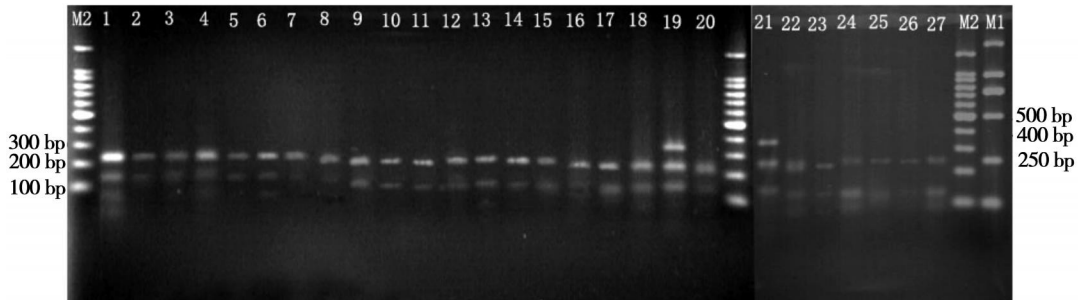
图 5 A lu 酶切凝胶电泳图谱

3 结论与讨论

本文首次对内蒙古大青山地区乳牛肝菌属真菌进行分子鉴定和遗传关系研究。通过 ITS序列比对鉴定 SP1、SP2、SP3、SP4、SP5、SP6、SP7、SP8、SP9、

SF1、SF2、SF3、P. Lac-1、P. Lac-2、3、3、3<sup>#</sup>菌株属于褐环乳牛肝菌,其余菌株还有待于进一步鉴定。

ITS RFLP图谱将 27株乳牛肝菌属真菌分为 2个不同的类群,序列分析结果和酶切图谱基本吻合,而且酶切图谱与前人研究所得的酶切图谱基本一



M1: DL2000 Marker M2: 100 bp Marker 1~27: 菌种编号

图 6 Hinf 酶切凝胶电泳图谱

致<sup>[22]</sup>。根据序列差距 27 株乳牛肝菌属真菌分为三个遗传类型,系统发育进化树将 27 株乳牛肝菌属真菌分为 3 个进化枝,3 个进化枝与 3 个遗传类型相同。

根据序列相似系数大于 99%,判断第一遗传类型的 17 个菌株 (SP1、SP2、SP3、SP4、SP5、SP6、SP7、SP8、SP9、SF1、SF2、SF3、P. Lac-1、P. Lac-2、3、3、3<sup>#</sup>) 在分类上属于同一种 (序列相似系数 99.78%),第二遗传类型的 8 个菌株 (96 牛、99 牛、00 牛、*Suillus*2、6<sup>#</sup> *Pinus*、6<sup>#</sup> *Pinus*、6<sup>#</sup> *Pinus*、6<sup>#</sup> *Pinus*) 在分类上属于同一种 (序列相似系数 99.79%),第三遗传类型 (樟、1) 在分类上属于同一种 (序列相似系数为 99.66%)。

分离于大青山油松大树菌根的 3<sup>#</sup>、P. Lac-2 菌株和分离于苗圃地 2 年生油松幼苗菌根的 SP4、SP5、SP7、SP8 菌株的序列相似系数高达 100%,分离于大青山油松林子实体的 00 牛菌株和分离于大青山油松大树菌根的 6<sup>#</sup> *Pinus* 菌株相似系数高达 100%,表明 ITS 区段 DNA 序列分析可用于监测外生菌根菌剂真菌在野外接种试验和研究菌根菌的菌种更替与可持续性。

以油松为宿主的菌株亲缘关系较近,宿主为樟子松的樟和采样地为混交林的 1 与其余菌株遗传距离较大,其原因可能是宿主和生境的影响,表明外生菌根真菌多样性可能随着宿主和生境的不同而发生变化。

由于 ITS 基因序列较短,酶切位点较少,反映的信息量较少,而序列分析方法可针对 DNA 序列的每一个碱基,能够准确地检测出单个碱基的区别,并且测得的 DNA 序列还可与数据库比对,不仅能进行分子鉴定,还可对菌根真菌类群的遗传多样性和系统发育进行研究,但 ITS-RFLP 方法更简单、实用,可以用于初步的菌株鉴定,所以两种方法是相辅相成、互

为补充的。

综上所述,在菌根技术的应用研究中可以用这两种方法进行菌根菌种的示踪试验,在分子水平上证明菌根真菌接种后在林地的竞争性和持久性,为菌根应用技术提供更可靠的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 邵力平,沈瑞祥,张素轩. 真菌分类学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1992
- [2] Beatriz Ruiz-Déz, Rincón Ana M., de Felipe Mar á R., et al. Molecular characterization and evaluation of mycorrhizal capacity of *Suillus* isolates from Central Spain for the selection of fungal inoculants [J]. *Mycorrhiza*, 2006, 16(7): 465 - 474
- [3] 林晓民,李振岐,王少先. 真菌 rDNA 的特点及在外生菌根菌鉴定中的应用 [J]. *西北农业学报*, 2005, 14(2): 120 - 125
- [4] 陈应龙,弓明钦, Bemie De11. 分子生物学技术在菌根研究中的应用及其进展 [J]. *土壤与环境*, 1999, 8(3): 230 - 234
- [5] Manian S, Sreenivasaprasad S, Bending G D. Genetic diversity and interrelationships among common European *Suillus* species based on ribosomal DNA sequences [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2001 (204): 117 - 121
- [6] Horton T R. Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale [J]. *Plant Soil*, 2002 (244): 29 - 39
- [7] Kretzer A, Li Y, Szaro T. Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus* sensu lato: phylogenetic and taxonomic implications [J]. *Mycologia*, 1996 (88): 776 - 785
- [8] Zhou Zhihua, Hogetsu Taizo. Subterranean community structure of ectomycorrhizal fungi under *Suillus grevillei* sporocaps in a *Larix kaempferi* forest [J]. *New Phytologist*, 2002 (154): 529 - 539
- [9] Bonfante P, Lanfranco L, Cometti V. Inter and intraspecific variability in strains of the ectomycorrhizal fungus *Suillus* [J]. *Microb Res*, 1997, 152(3): 287 - 292
- [10] Glen M, Tommerup IC, Bougher N L, et al. Specificity, sensitivity and discrimination of primers for PCR-RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* forests and plantations [J]. *Mycological Research*, 2001 (105): 138 - 149

- [11] 佟丽华, 连 宾. 一株食用外生菌根菌乳牛肝菌的分子鉴定 [J]. 食品科学, 2005, 26(8): 318 - 320
- [12] Colpaert Jan V, Philippe Vandenkoomhuysse, Kristin Adriaensen Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus* [J]. New Phytologist, 2000, 147(2): 367 - 379
- [13] 廖德聪, 陈 强, 李登煜, 等. 四川省雅江松茸菌的分离与系统发育 [J]. 生态学报, 2005, 25(4): 791 - 794
- [14] 马万里. 土壤微生物多样性研究的新方法 [J]. 土壤学报, 2004, 41(1): 103 - 107
- [15] 许美玲, 孙军德, 朱教君, 等. 树木外生菌根真菌多样性研究方法进展 [J]. 土壤通报, 2005, 36(6): 969 - 973
- [16] Wurzbarger N, Hartshorn A S, Hendrick Ectomycorrhizal fungal community structure across a bog-forest ecotone in southeast Alaska [J]. Mycorrhiza, 2004(14): 383 - 389
- [17] Karkouri K El, Selosse M A, Mousain D. Molecular markers detecting an ectomycorrhizal *Suillus collinitus* strain on *Pinus halepensis* roots suggest successful inoculation and persistence in Mediterranean nursery and plantation [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2006, 55(1): 146 - 158
- [18] Graham J H, Miller R M. Mycorrhizas: gene to function [J]. Plant Soil, 2005(274): 79 - 100
- [19] Wurzbarger N, Bidartondo M I, Bledsoe C S Characterization of *Pinus* ectomycorrhizas from mixed conifer and pygmy forests using morphology and molecular methods [J]. Mycorrhiza, 2001, 79(10): 1211 - 1216
- [20] 梁 宇, 郭良栋, 马克平. 菌根真菌在生态系统中的作用 [J]. 植物生态学报, 2002, 26(6): 739 - 745
- [21] HE Yue-Qiu An improved protocol for fungal DNA preparation [J]. 菌物系统, 2000, 19(3): 434
- [22] Akiyoshi Yamada, Rakeo Ogura, Masatake Ohmasa Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by *in vitro* mycorrhizal synthesis . Morphology of mycorrhizas in open-pot soil [J]. Mycorrhiza, 2001(11): 67 - 87

## 《中国木本植物病原总汇》正式出版

《中国木本植物病原总汇》由徐梅卿、何平勋主编,东北林业大学出版社出版。该书编写历时十载,数易其稿,已于 2008 年 10 月正式出版。

《中国木本植物病原总汇》共收录了 1975 ~ 2005 年的木本植物病原物 5 440 个分类单位,其中根肿菌 2 个,卵菌 41 个,真菌 4 655 个,细菌 49 个,难培养原核生物 56 个,病毒 56 个,线虫 328 个,螨类 132 个,寄生植物、藻类 121 个。寄主植物 4 595 个分类单位。全书共分五篇。第一篇,木本植物真核生物病原物。第二篇,木本植物原核生物及其他病原物。本篇完整地列出了各病原物分类单位、真菌不同发育阶段和同种异名的拉丁文名称和中文名;病害类型、寄生部位;病原新种形态特征,新病害症状;寄主植物拉丁文名称和中文名,以及地理分布。第三篇,木本植物病原物分类地位。第四篇,参考文献 1 234 条。第五篇,索引 4 套,包括寄主植物中文名、病原物中文名、寄主植物—病原物拉丁文名称和病原物拉丁文名称。

《中国木本植物病原总汇》是我国迄今为止唯一的一部病原学、木本植物病理学相结合的大型工具书,是 30 年来科研成果的全面总结,学术价值较高,具有较强的综合性、系统性、新颖性、科学性和实用性,可供有关专家、学者、科研人员、农林大专院校师生、植物检疫部门,有关植物保护、果树园艺、园林绿化等生产管理及技术推广部门的科技人员参考和应用。

该书共 1724 页,16 开本(精装),书号: ISBN978 - 7 - 81076 - 148 - 2,定价: 360 元。

联系人:徐梅卿 中国林科院林业所 北京市海淀区香山路 100091

电话: 010 - 62889680, 13810934299 (徐启聪), xumq@caf.ac.cn

姜俊清 东北林业大学出版社 哈尔滨市香坊区和兴路 26 号 150040

电话: 0451 - 89701363, 15945191363, 89033986@163.com

(林讯)