

## 树枫杜鹃菌根真菌分离与鉴定

刘振华<sup>1</sup>, 姚娜<sup>1</sup>, 杨凯<sup>2</sup>, 王涛<sup>1</sup>, 李振坚<sup>1</sup>, 李潞滨<sup>1\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091;

2. 北京农学院农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206)

关键词: 树枫杜鹃; 菌根真菌; 18S rDNA; *Meliniomyces variabilis*

中图分类号: S685.21; S718.81

文献标识码: A

## Isolation and Identification for Symbiotic Mycorrhizal Fungi of *Rhododendron changii*

LIU Zhen-hua<sup>1</sup>, YAO Na<sup>1</sup>, YANG Kai<sup>2</sup>, WANG Tao<sup>1</sup>, LI Zhen-jian<sup>1</sup>, LI Lu-bin<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. Beijing Key Laboratory for Agricultural Application and New Technique, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China)

**Abstract:** *Rhododendron changii* is a monotypic species in China. This study isolated and obtained 10 same mycorrhizal fungi strains from *Rhododendron changii* and identified them by traditional classification method of morphology in conjunction with 18S rDNA sequence analysis. The results of identification suggest that this mycorrhizal fungi is *Meliniomyces variabilis*' sibling species.

**Key words:** *Rhododendron changii*; mycorrhizal fungi; 18S rDNA; *Meliniomyces variabilis*

杜鹃花科(Ericaceae)植物约75属,1350余种,主产南非和中国西南及西部,我国产20属,约800余种。杜鹃花属(*Rhododendron*)是杜鹃花科植物中最大的一个属,我国约产600余种,全国均有分布,尤其以四川、云南和贵州的种类最多<sup>[1]</sup>。杜鹃花为我国的十大传统名花之一,是世界著名的观赏花卉。

大多数杜鹃花科植物的根系与一些真菌在自然条件下能够形成内生菌根结构,即杜鹃花类菌根(*Ericoid mycorrhizas*, ERM)。杜鹃花类菌根真菌在生态系统中起重要的作用,它能够降解有机物,增强植物对逆境因子的抗性和促进植物矿质营养的吸收。1974年,Read等<sup>[2]</sup>从杜鹃花植物中分离出第1株杜鹃花类菌根真菌 *Pezizella ericae* Read,并对其结构和功能进行了研究,之后许多学者对杜鹃花类菌

根真菌进行了相关研究。很多类型的真菌从不同的杜鹃花科植物根系中分离出来<sup>[3-8]</sup>。传统的鉴定方法是通过对菌落培养特征及菌体的光学显微结构特征来鉴定,但是由于大多数菌根真菌培养过程中不产生孢子,所以给鉴定带来了很大的困难<sup>[9-10]</sup>。随着GenBank数据库的建立和生物信息学的发展,促进了分子生物学方法在微生物种群的多样性、环境与种群进化的关系和微生物系统分类和发育等方面的应用,应用18S rDNA等序列分析进行真核生物的系统发育、分类鉴定和多样性研究已经成为一种有效并且快速的方法<sup>[11-12]</sup>,但该方法尚未用于杜鹃花菌根真菌研究中。本研究对中国特有种树枫杜鹃菌根真菌进行18S rDNA分类鉴定,将对今后杜鹃花科植物的菌根研究提供参考,并且对杜鹃花科植物的栽培与应用发挥重要作用。

收稿日期: 2010-06-30

基金项目: 中央级公益性科研院所专项资金项目(No. RIF2010-16)

作者简介: 刘振华, 硕士研究生. 主要研究方向: 园林植物与观赏园艺. 电话: 010-62888687 Email: liuzhenhuas@163.com

\* 通讯作者: 李潞滨, 博士, 研究员. 主要研究方向: 园林植物遗传育种. 电话: 010-62888687 Email: lilubin@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试菌株,均分离自重庆市金佛山自然保护区自然生境下的树枫杜鹃 (*Rhododendron changii* (Fang) Fang)。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌根真菌分离及培养** 2009年3月在重庆市金佛山自然保护区采集3株树枫杜鹃,保留根部土壤带回实验室,取健壮的根用软刷洗去泥土,流水冲洗过夜。用剪刀把根剪成3~4 cm,用70%的乙醇消毒30 s再放入HgCl(0.1%)消毒10 min,用无菌水冲洗4~5次,用灭菌的滤纸将根上的水吸干,将根切成约0.5 cm的根段,接种于PDA培养基上,每个培养皿中放4个根段,25℃下培养。待菌丝从根横切面发出,用灭菌后的竹签挑取真菌菌丝,转接于新的PDA培养基上,继续培养,转接数次直至获得纯化菌株。

**1.2.2 DNA的提取方法** DNA提取方法参考庄彩云等<sup>[13]</sup>菌根真菌DNA提取方法。

**1.2.3 菌根真菌菌株18S rDNA区段的PCR扩增、产物纯化及测序** 树枫杜鹃菌根真菌菌株的18S rDNA区段PCR扩增:引物为真菌18S rDNA的通用引物:P6(TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA)和P7(5' - TCCGCAGGTTACCTACGGA)<sup>[14]</sup>。PCR反应体系:10×PCR Buffer,5 μL;10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP,1 μL;25 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 3 μL;DNA模板,2 μL;引物,1 μL;rTaq酶,0.5 μL;加ddH<sub>2</sub>O至50 μL。PCR反应循环参数为:预变性94℃,2 min;变性94℃,40 s;退火58℃,40 s;延伸72℃,90 s;30个反应循环;延伸72℃,10 min。PCR产物经纯化后与pMD-18T(TaKaRa)载体连接,转化大肠杆菌DH5α,选取阳性克隆送由北京宝锐通生物科技公司测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌根真菌分离及培养

本试验从根段中分离出生长较缓慢菌株10株,从菌落特征上观察属于同一种菌,挑取分离获得菌根真菌,接种于PDA培养基上。观察具有以下菌落及培养特征(图1):菌落呈灰黑色,绒毛状,菌落边缘灰白色、菌落圆形具放射状皱褶。生长较缓慢,培养30 d菌落直径约为2~3 cm,未见产生分生孢子。2005年,Hambleton等<sup>[15]</sup>分离到*Meliniomyces*

*variabilis* Hambleton & Sigler, sp. Nov,该菌株在常温下生长缓慢,在PDA培养基上培养35 d菌落直径约4~5.5 cm,菌落灰白色到深灰色,菌落形成环纹,菌落较平坦或者中间稍微凸起,有放射状皱褶,很难产生孢子。本试验所获得的菌株与Hambleton等<sup>[15]</sup>分离得到的菌株形态上基本一致,初步认为所得菌株为*Meliniomyces variabilis* Hambleton & Sigler, sp. Nov或其近缘种。

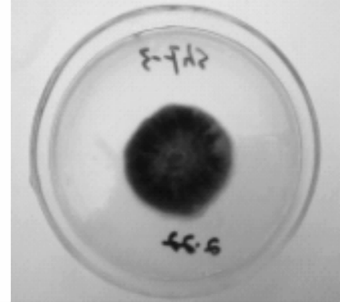


图1 树枫杜鹃菌根真菌菌落特征

### 2.2 菌根真菌DNA提取及PCR结果

DNA样品在1%的琼脂糖凝胶上进行电泳,溴化乙啶染色,紫外灯下观察。DNA提取结果(图2)表明:得到了比较完整且量较大的基因组DNA。PCR产物电泳结果见图3,PCR产物片段单一,长度约1 000 bp。

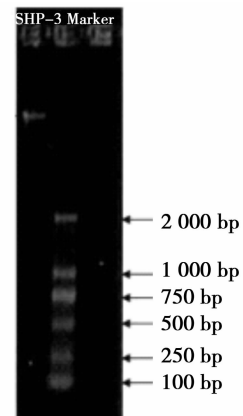


图2 真菌DNA电泳检测结果

序列提交至GenBank进行Blast同源比对,结果见表1。

表1 菌根真菌18S rDNA序列Blast比对结果

菌株号	Genebank 登录号	Genebank 中最相近菌	相近菌株	
			Genebank 登录号	相似度/%
SHF-3	GU206875	<i>Meliniomyces variabilis</i>	AY838785	99
SHF-3	GU206875	<i>Meliniomyces variabilis</i>	AY838789	99
SHF-3	GU206875	<i>Meliniomyces variabilis</i>	AY762619	99
SHF-3	GU206875	<i>Hymenoscyphus ericae</i>	AY524847	98

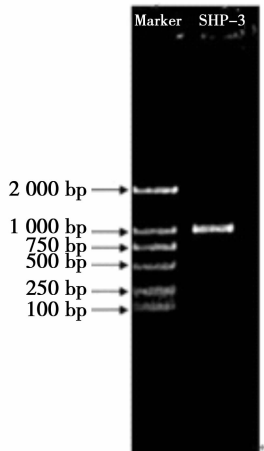


图3 菌株 rDNA 18S 区段 PCR 产物电泳结果

杜鹃花菌根真菌 SHF-3 与 rDNA ITS 序列聚类结果见图 4。

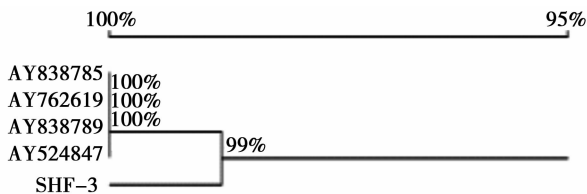


图4 菌根真菌 rDNA ITS 序列聚类图

### 3 结论与讨论

试验获得的 18S rDNA 序列 Blast 比对结果表明: 所获菌株 18S rDNA 序列与 GenBank 中 *Meliniomyces variabilis* (AY838789)、*Meliniomyces variabilis* (AY762619) *Meliniomyces variabilis* (AY 838785) 的同源性均高达 99%; 与 *Hymenoscyphus ericae* (AY524847) 同源性也高达 98%; Hambleton 等<sup>[15]</sup> 从 Ericaceae 中分离出 *Meliniomyces variabilis* 菌株, 研究表明 *Meliniomyces variabilis* 与 *Hymenoscyphus ericae* 亲缘关系十分相近。从图 4 可以看出: *Hymenoscyphus ericae* (AY524847) 与 *Meliniomyces variabilis* 的 3 个菌株完全聚为一类, 这也说明了他们之间的亲缘关系十分的密切, 但本试验所获得的菌株在菌落形态上与 *Meliniomyces variabilis* 最为相似, 18S rDNA 序列同源性也比 *Hymenoscyphus ericae* 略高; 所以本试验所分离的菌株为 *Meliniomyces variabilis* 或其近缘种。

本试验表明: 应用 18S rDNA 序列分析作为一种重要的分子生物学研究手段, 应用于杜鹃花科菌根真菌的分类鉴定研究中显示出较好的适用性, 这说明将形态学方法与 18S rDNA 序列分析等分子生物学手段结合, 将能提高杜鹃花科植物菌根真菌甚至

其它类型菌根真菌鉴定研究的科学性和准确性。

### 参考文献:

- [1] 陈有民. 园林树木学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1990: 619 - 620
- [2] Read D J. *Pezizella ericae* sp. nov. the perfect state of a typical mycorrhizal endophyte of ericaceae [J]. Transactions of the British Mycological Society, 1974, 63: 381 - 382
- [3] Mclean C, Lawrie A C. Patterns of root colonization in epacridaceous plants collected from different sites [J]. Annals of Botany, 1996, 77: 405 - 411
- [4] Monreal M, Berch S M, Berbee M. Molecular diversity of ericoid mycorrhizal fungi [J]. Canadian Journal of Botany, 1999, 77: 1580 - 1594
- [5] Sharples J M, Chambers S M, Meharg A A, et al. Genetic diversity of root-associated fungal endophytes from *Calluna vulgaris* at contrasting field sites [J]. New Phytologist, 2000, 148: 153 - 162
- [6] Tamara R, Allen T R, Millar T, et al. Culturing and direct DNA extraction find different from the same ericoid mycorrhizal roots [J]. New Phytologist, 2003, 160: 255 - 272
- [7] Pearson V, Read D J. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. I. The isolation of the endophyte and synthesis of mycorrhizas in aseptic cultures [J]. New Phytologist, 1973, 72: 371 - 379
- [8] Hambleton S, Egger K N, Currah R S. The genus *Oidiodendron*: species delimitation and phylogenetic relationships based on nuclear ribosomal DNA analysis [J]. Mycologia, 1998(b), 90: 854 - 869
- [9] Duclos J L, Fortin J A. Effect of glucose and active charcoal on in vitro synthesis of ericoid mycorrhiza with *Vaccinium* spp [J]. New Phytologist, 1983, 94: 95 - 102
- [10] Perotto S, Actis-perino E, Perugini J, et al. Molecular diversity of fungi from ericoid mycorrhizal roots [J]. Molecular Ecology, 1996, 5: 123 - 131
- [11] Rogers J E, Leblond J D, Moncreiff C A. Phylogenetic relationship of *Alexandrium monilatum* (Dinophyceae) to other *Alexandrium* species based on 18S ribosomal RNA gene sequences [J]. Harmful Algae, 2006(5): 275 - 280
- [12] He J, Xu Z, Hughes J. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 247: 91 - 100
- [13] 庄彩云, 李潞滨, 胡陶, 等. 适用于 rDNA ITS 分析的兰属植物菌根真菌培养及 DNA 提取方法 [J]. 北京农学院学报, 2007, 22(3): 4 - 6
- [14] White T J, Bruns T, Lee S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M] // Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J. In PCR Protocols. San Diego, Calif, Academic Press, 1990: 315 - 322
- [15] Hambleton S, Sigler L. *Meliniomyces*, a new anamorph genus for root-associated fungi with phylogenetic affinities *Rhizoscyphus ericae* (= *Hymenoscyphus ericae*), Leotiomyces [J]. Studies in Mycology, 2005, 53: 1 - 27