

金线莲菌根真菌的分离和鉴定

朱丹 陈卫国 杜婵娟 付岗 黄兴振 付书婕 赵有林 蒋伟哲

【摘要】 目的 分离及鉴定野生金线莲根内菌根真菌。**方法** 采用平皿点种法进行金线莲菌根真菌的分离,提取菌株的总 DNA,采用丝状真菌 ITS 通用引物对其 rDNA 相应区段进行 PCR 扩增,产物经纯化后测序。**结果** 结合各菌株的形态特征和 ITS 区域基因序列特征,将 A12 菌株、5 号菌株、2 号菌株、6 号菌株、A46 菌株和 A55 菌株鉴定为丝核菌 (*Rhizoctonia* sp.), 其有性态为 *Thanatephorus* sp. 或 *Ceratobasidium* sp.。**结论** 通过对金线莲菌根真菌的分离鉴定,有望将其应用到金线莲及兰科其它濒危药用植物繁殖中去。

【关键词】 金线莲; 菌根真菌; 分离; 鉴定

【中图分类号】 Q 939.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.04.001

Isolation and Identification of mycorrhizal fungus from *Anoectochilus roxburghii* ZHU Dan, CHEN Wei-guo, DU Chan-juan, et al. Pharmaceutical College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China
Corresponding author: JIANG Wei-zhe, E-mail: jiangweizhe6812@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective Isolation and identification the mycorrhizal fungi from natural *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. **Method** To isolate the mycorrhizal fungi from natural *A. roxburghii* (Wall.) Lindl. by plate cultivation. Total DNA of fungi were extracted and amplified by using universal primers ITS1 and ITS4, products were purified and sequenced. **Result** Based on the morphological characteristics of the various strains and the ITS region gene sequence, strain A12, strain 5, strain 2, strain 6, strain A46 and strain A55 were identified as *Rhizoctonia* sp. and their sexual state is *Thanatephorus* sp. or *Ceratobasidium* sp. **Conclusion** Through the isolation and identification the mycorrhizal fungi from natural *A. roxburghii* (Wall.) Lindl., it is possible to apply them in the cultivation of medicinal plants (Orchidaceae) and other endangered medicinal plants.

【Key words】 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.; Mycorrhizal fungus; Isolation; Identification

金线莲 [*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.] 为兰科的药用植物,生长在土壤腐殖质较多、光线较弱、相对湿度大的阔叶林中^[1],具有保肝、防癌、抗氧化、抗炎等多种药理作用^[2]。近年来,因其生长环境遭到严重破坏,野生资源被过度采挖,加之具有繁殖率低、生长缓慢等特点,使得金线莲野生资源濒临灭绝^[3]。在野生状态下,所有兰科植物都

与真菌共生^[4-5],野生金线莲亦与内生真菌形成菌根共生关系,筛选促进金线莲生长发育的益生菌,研究它们的相互作用具有重大的理论意义。本课题组在广西桂林等地采集野生金线莲,并从该植物根中分离出多株菌根真菌,研究发现,这些真菌可以增加植物芽和根的数量,促进金线莲试管苗的生长。为了进一步研究菌根真菌对金线莲生长发育的影响,课题组对金线莲菌根真菌进行分离,并采用分子技术结合形态学特征对分离物进行鉴定,为下一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌根真菌的分离和形态学观察

采集野生金线莲植株,取其根部用无菌水冲洗

作者单位:530021 南宁,广西医科大学药学院(朱丹、黄兴振、付书婕、蒋伟哲);广西国有维都林场(陈卫国、赵有林);广西农业科学院微生物研究所(杜婵娟、付岗)

作者简介:朱丹(1980-),博士,讲师。研究方向:生药学、中药药理学。E-mail:englishzhudan030@sina.com

通讯作者:蒋伟哲(1968-),博士,博士生导师。研究方向:新药研究与开发。E-mail:jiangweizhe6812@yahoo.com.cn

干净,切成 0.5~1 cm 小段,75% 乙醇表面消毒 3~5 秒,无菌水冲洗净消毒液后,再用 0.1% HgCl_2 表面消毒 6~8 分钟,无菌水冲洗后将根段接种于 PDA 平皿内,25℃ 恒温培养,待从根内长出真菌菌丝后,挑取尖端菌丝纯化培养。将纯化的 6 株真菌菌株(编号分别为 2、5、6、A12、A46、A55)在 PDA 培养基(马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 17 g、水 1000 ml)平板上于 28℃ 恒温下黑暗培养,每天观察菌落的形态特征和颜色变化,并于显微镜下进行形态学观察、鉴定。

1.2 分子生物学特征测定

1.2.1 基因组 DNA 的提取 收集 PDA 平板上的菌丝体,采用 SDS-CTAB 法分别提取各菌株的基因组 DNA。具体操作如下:取 0.1 g 新鲜菌丝体,在液氮中研磨成粉末,迅速转入 1.5 ml 的离心管中,加入 750 μl 提取缓冲液,置 65℃ 水浴 30 分钟;室温下 12 000 r/min 离心 10 分钟,取上清液,加入 1/10 的 3 mol/L KAc,冰浴 20 分钟;室温下 12 000 r/min 离心 10 分钟,取上清液,加入等体积的异丙醇,冰浴 20 分钟;12 000 r/min 离心 10~20 分钟;弃上清,加入 400 μl ddH_2O 及 5 μl RNAase,37℃ 水浴 1 小时;加入等体积的酚/氯仿(1:1)颠倒混匀 40 次;室温下 12 000 r/min 离心 10 分钟,取上清液,再加入 1/10 KAc,冰浴 20 分钟(重复 1 次);用 2 倍体积无水乙醇沉淀 20 分钟,12 000 r/min 离心 10 分钟;用 -20℃ 预冷的 75% 乙醇洗涤沉淀 3 次,室温干燥 5~10 分钟后加入 TE 溶液溶解沉淀。

1.2.2 PCR 扩增及纯化测序 以各菌株基因组 DNA 为模板,扩增 ITS 区的保守区段,选用真菌通用引物 ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') 和 ITS4 (5' - TCCTCCG CTTATTGATATGC - 3') 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为 20 μl ,其中含 10 $\times$ PCR buffer 2 μl ,dNTP 0.5 μl ,ITS1 0.6 μl ,ITS4 0.6 μl ,无菌超纯水 15.1 μl ,模板 DNA 1 μl ,Taq 酶 0.2 μl 。反应程序为:94℃ 预变性 3 分钟;94℃ 变性 55 秒,56℃ 退火 50 秒,72℃ 延伸 1 分钟,32 个循环;72℃ 延伸 7 分钟。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳,以 DNA Marker DL2000 作为分子量标准,稳压 120 V 下电泳 30 分钟。电泳结果用紫外检测仪观察,置于图像处理仪中处理并保存。目的片段用 UNIQ-10 柱式胶回收试剂盒回收纯化,纯化样品进行基因序列测定。

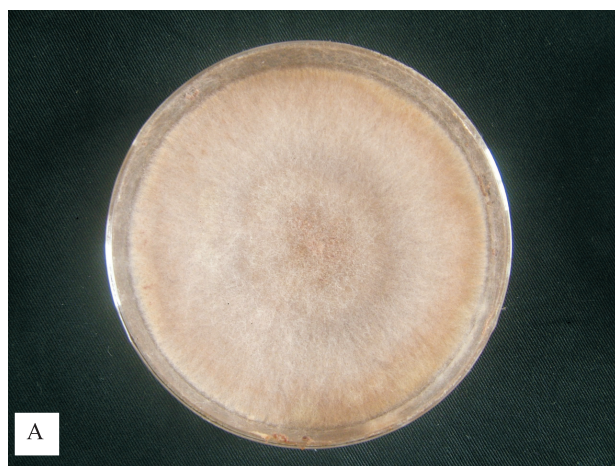
1.2.3 数据分析 序列经 BioEdit 软件分析和手工校正后,用 NCBI 的 BLAST 程序将测得序列与 Gen-

Bank 中已有菌株的 ITS 序列进行同源性比对,采用 MAGA (3.1) 软件进行系统发育树的构建。

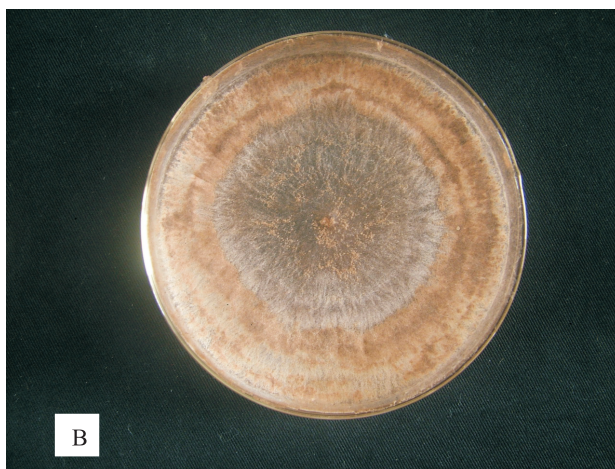
2 结果

2.1 形态学特征观察结果

各菌株在 PDA 培养基上生长,菌落初期灰白色,渐变为淡褐色,平整,生长速度快,气生菌丝繁茂,28℃ 下培养 3 天后,直径可达 80 mm,7 天即可产生菌核(见图 1)。菌丝初期灰白色,渐变为淡褐色,直径 12~14 μm ;菌丝分支处有缢缩,近分支处形成隔膜。菌核由菌丝纠集生成,褐色,内外颜色一致,表面粗糙,大小均一,可聚集联结;无性态不产生孢子(见图 2)。

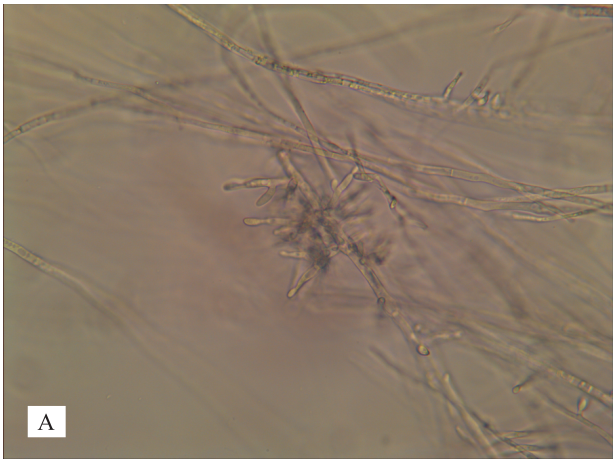


A 金钱莲菌根真菌早期菌落

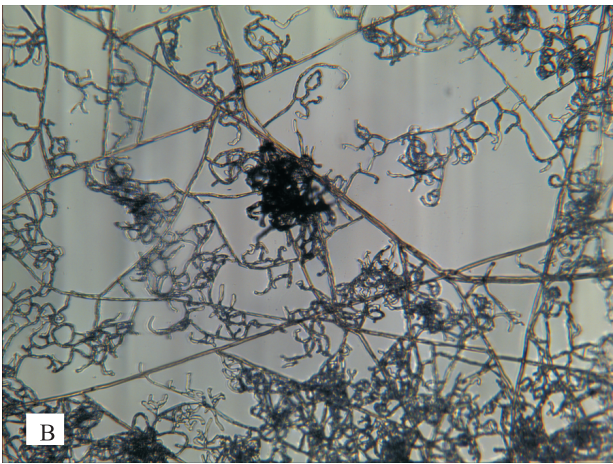


B 金钱莲菌根真菌后期菌落

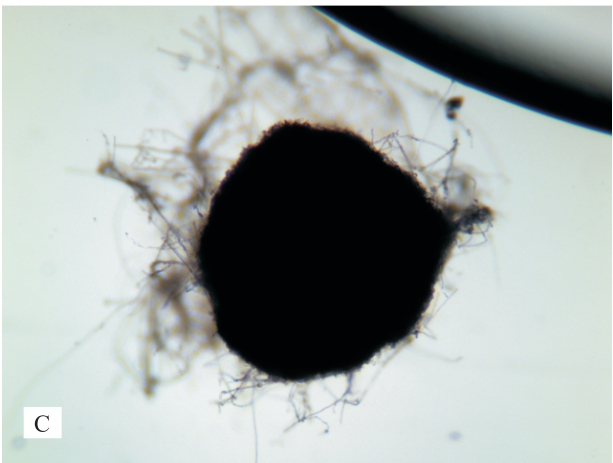
图 1 金钱莲根真菌菌落特征



A 幼嫩菌丝



B 老熟菌丝



C 菌核

图2 金线莲菌根真菌菌株的显微形态

2.2 ITS 序列分析及种类鉴定

各菌株的基因组 DNA 经 PCR 扩增,回收后,通过序列测定得到分别为 668bps ~ 686bps 的各菌株的 ITS 碱基序列,见表 1。

表 1 菌株 rDNA ITS 区序列测定结果

菌株	序列长度 (bps)	GenBank 登录号
A12	678	KC782850
2 号	668	KC782851
5 号	669	KC782852
6 号	670	KC782853
A46	677	KC782854
A55	686	KC782855

2.3 基于 ITS 序列的同源性比较

在 GenBank 中与已有的相关菌株的 ITS 序列进行同源性比较,用 MAGA (3.1) 软件将以上菌株与来自 GenBank 的 27 株真菌一起构建基于 ITS 序列的系统发育树。发育树的构建,以亲缘关系相对较远的低等真菌 (*Pythium* sp.) 为外群,见图 3。结果显示 A12 菌株与 5 号菌株出现在同一最小分支,说明这两菌株的亲缘关系最近;2 号菌株与 6 号菌株出现在同一最小分支,说明这两菌株的亲缘关系最近;A46 菌株和 A55 菌株与前述 4 株真菌的亲缘关系相对较远,但仍同处于同一较小分支内。所得菌株均与 *Thanatephorus* sp. 及 *Rhizoctonia* sp. 具有较高的同源性。结合各菌株的形态特征和 ITS 区域基因序列特征,将 A12 菌株、5 号菌株、2 号菌株、6 号菌株、A46 菌株和 A55 菌株鉴定为丝核菌 (*Rhizoctonia* sp.), 其有性态为 *Thanatephorus* sp. 或 *Ceratobasidium* sp. 。

3 讨论

丝核菌 (*Rhizoctonia* sp.) 属的有些成员是农作物的病原菌,如立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 能引起棉花的立枯病^[6] 和水稻、玉米的纹枯病^[7]。也有报道某些种类的丝核菌可与兰科植物共生,利于植株的生长^[8]。本研究获得的 6 株丝核菌从金线莲根部分离,可促进金线莲的生长发育,对其他兰科植物是否具有促生作用,还有待进一步研究。

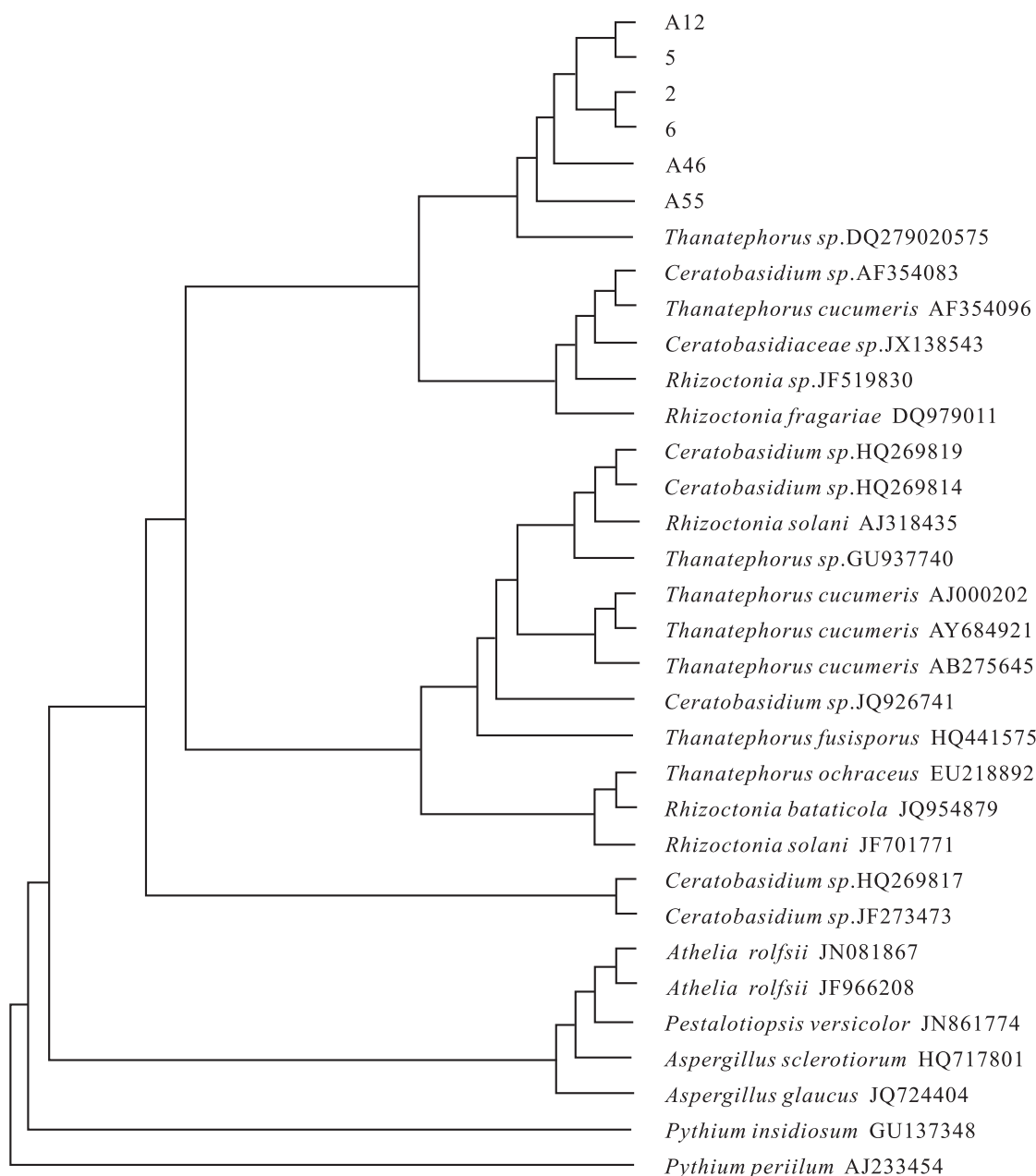


图3 基于 ITS 序列同源性的各菌株的系统发育树

参 考 文 献

- [1] 谭小明,郭顺星,周雅琴,等. 广西金线莲内生真菌的分离及抗菌活性研究[J]. 中国药理学杂志,2010,45(3):178-181.
- [2] Huang L, Chen T, Ye Z, et al. Use of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-ion trap mass spectrometry for identification of oleanolic acid and ursolic acid in Anoectochilus roxburghii (wall.) Lindl[J]. J Mass Spectrom, 2007, 42(7): 910-917.
- [3] 王雅俊,孟志霞,于雪梅,等. 促进福建金线莲生长发育的内生真菌筛选研究[J]. 中国药理学杂志,2009,44(13):976-979.
- [4] 郭顺星,陈晓梅,于雪梅. 金线莲菌根真菌的分离及其生物活性研究[J]. 中国药理学杂志,2000,35(7):443-445.
- [5] Lítalová K and Balá M. Carbon nutrition of mature green orchid Serapias strictiflora and its mycorrhizal fungus Epulorhiza sp[J]. Biol Plant,2010, 54: 97-104.
- [6] 王伟娟,鹿秀云,李宝庆,等. 河北省棉花立枯丝核菌菌株融合群及其致病性研究[J]. 华北农学报,2010,25(增刊):274-278.
- [7] 冯典兴,郑爱萍,王世全,等. 四川省不同寄主立枯丝核菌的遗传分化和致病力研究[J]. 植物病理学报,2005,35(6):520-525.
- [8] 伍建榕,韩素芬,朱有勇,等. 春兰与丝核菌共生菌根及结构研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2005,29(4):105-108.

(收稿日期:2013-02-21)

(本文编辑:秦楠)