

# 一种外生菌根真菌的鉴定及系统进化分析

李发虎<sup>1</sup>, 贾建国<sup>2</sup>, 樊永军<sup>3\*</sup>

(1. 内蒙古农业大学 职业技术学院, 内蒙古 包头 010018; 2. 包头市园林科技研究所, 内蒙古 包头 014010;  
3. 包头师范学院, 内蒙古 包头 014030)

**摘要:**利用形态学、解剖学和分子生物学方法对采自内蒙古大兴安岭地区 1 株外生菌根进行了分类鉴定, 运用 Mega5.1 软件采用 Neighbor-Joining 法构建了系统进化树, 分析了其进化关系及进化地位, 结果表明, 该外生菌根真菌隶属于丝膜菌科(Cortinariaceae)丝膜菌属(*Cortinarius*)皮革黄丝膜菌(*Cortinarius malachius* (Fr. : Fr.) Fr.)种, 其子实体或可食。并初步确定为内蒙古新记录种。

**关键词:**兴安落叶松; 外生菌根; ITS; 物种鉴定; 系统地位

**中图分类号:** S714.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-7461(2017)03-0162-03

## Species Identification and Analysis of Phylogenetic Position for An Ectomycorrhizal Fungus

LI Fa-hu<sup>1</sup>, JIA Jian-guo<sup>2</sup>, FAN Yong-jun<sup>3\*</sup>

(1. Vocational and Technical College, Inner Mongolia Agricultural University, Baotou, Inner Mongolia 010018, China;  
2. Baotou Research Institute of Landscape Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014030, China;  
3. Biology Science and Technological Department, Baotou Teacher College, Inner Mongolia 014030, China)

**Abstract:** An ectomycorrhizal(EM) fungus associated with *Larix gmelinii* at Daxinganling area was investigated by using morphological, anatomical and molecular methods. The phylogenetic trees were constructed by neighbor-joining method, and genetic distance were analyzed by Mega5.1 software. EM fungus was identified as *Cortinarius malachius* (Fr. : Fr.) Fr., which belonged to the family Cortinariaceae and the genus *Cortinarius*. And the fruiting body was edible. It could be preliminarily determined as a new record from Inner Mongolia area.

**Key words:** *Larix gmelinii*; ectomycorrhizae; EM; ITS; Species identification; phylogeny

外生菌根(ectomycorrhizal, EM)是森林生态系统中的重要组分, EM 真菌可与壳斗科(Fagaceae)、松科(Pinaceae)、桦木科(Betulaceae)、杨柳科(Salicaceae)和龙脑香科(Dipterocarpaceae)等高等植物(约 7 700 种)形成菌根<sup>[1]</sup>, EM 真菌具有丰富的物种多样性, 据保守估计, 全球约有 20 000~25 000 种<sup>[2]</sup>, 其中我国已报道 40 科、80 属、500 余种<sup>[3]</sup>。根据已知真菌物种数量约占自然界中存在数量的 5% 推算<sup>[4]</sup>, 自然界中还有大量的 EM 真菌物种有待发现。随着分子生物学技术的广泛应用, 基因内转录

间隔区 ITS (internal transcribed spacer)序列具有进化速度快, 在真菌的属间和种间存在巨大的变异等特点被广泛用于种一级水平的分类研究中<sup>[5-7]</sup>。

本研究采用传统方法和分子生物学技术相结合, 对分布于内蒙古东部大兴安岭地区的优势树种兴安落叶松共生的一株外生菌根进行分类鉴定, 确定其分类地位, 为探索不同外生菌根真菌与不同宿主植物间的共生机理, 筛选适应不同土壤和环境状况的优良外生菌根真菌, 提高宿主成活率、抗逆性等方面发挥更大的作用。

收稿日期: 2016-09-28    修回日期: 2017-01-03

基金项目: 国家自然科学基金(31260132、31460188); 内蒙古自然科学基金(2016MS0301)。

作者简介: 李发虎, 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 真菌多样性。E-mail: lifafahu@163.com

\* 通信作者: 樊永军, 男, 博士, 教授, 研究方向: 菌根应用技术。E-mail: fanyj1975@163.com

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

菌根样品来源于兴安落叶松,2014 年 9 月采集于内蒙古大兴安岭森林生态系统国家野外科学观测研究站试验区(50°49′—50°51′N,121°30′—121°31′E′)内,海拔 800~1 100 m,这是我国寒温带地区唯一的国家级森林生态系统定位研究站,位于根河林业局潮查林场境内,地处大兴安岭西北坡,属于中山地带,生境兴安落叶松林+苔藓。

## 1.2 方法

1.2.1 菌根的采集 菌根的采集按照 Agerer (1991)方法<sup>[8]</sup>在兴安落叶松纯林群落中,在不同海拔选取 3~5 个样地,在样地内随意选取至少 3 棵树,并从不同方向取 20 cm×20 cm×20 cm 带有细根的土块,装入塑料袋并编号;样品采回后置于 4℃ 冰箱中保鲜待测,时间不超过 1 周。

1.2.2 清洗、处理 从冰箱中取出 1 袋样品,置于筛子中用自来水小心地清洗菌根表面的沙土,洗净后剪成长约 1 cm 的根段,然后将小根段置于体视显微镜下用镊子、细小的毛刷及解剖针进一步清洗。

1.2.3 宏观形态观察 观察指标包括菌根的颜色、形状、分支、外延菌丝及根状菌索的情况、内外菌套结构、透明与否及囊状体等;拍照并记录<sup>[9]</sup>;另保存菌根样品于 CTAB 缓冲液的 Eppendorf 中用于 DNA 提取。

1.2.4 显微结构观察 菌套显微观察:分别用解剖针和镊子剥取菌套内外面,制作临时装片。在

OLYMPUS-BH2 显微镜(奥林巴斯(中国)有限公司)下观察,观察菌套内外表面结构、菌丝结构及外延菌丝和根状菌索的情况等项目,最后拍照并记录。

永久封片制作:采用常规石蜡切片法。

1.2.5 分类 利用显微摄影系统,在 10×40 倍下观察拍照并记录结果,参照 Agerer 体视显微镜菌根图谱和 Haug 菌根图谱进行初步分类鉴定<sup>[10-12]</sup>。

## 1.3 分子鉴定

分子鉴定方法参照樊永军<sup>[13]</sup>等(2011)关于贺兰山地区青海云杉外生菌根形态类型及分子鉴定研究中的方法完成。

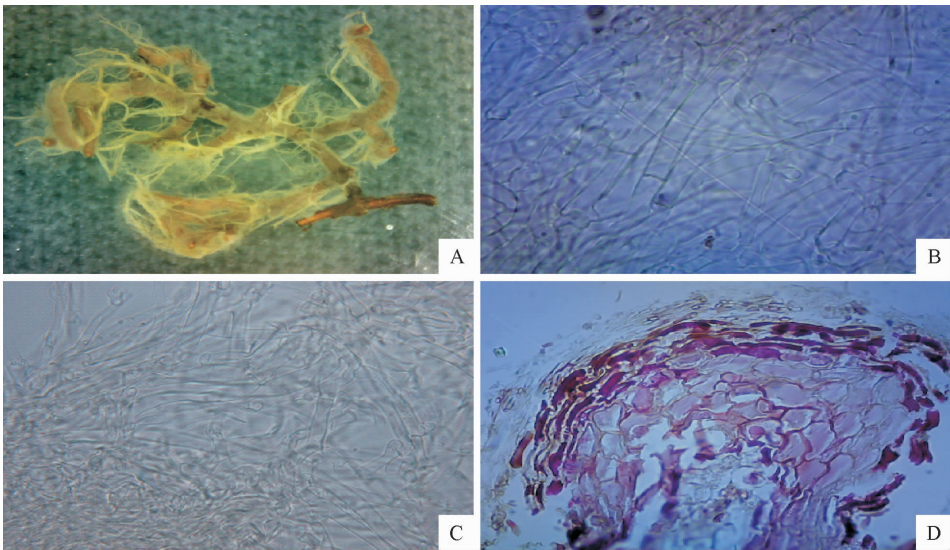
# 2 结果与分析

## 2.1 形态、解剖学特征

2.1.1 形态学特征 菌根系统单轴羽状分支,分支 1~2 级,弯曲到稍扭曲,整体外观呈一扇形,菌根因子长(2)3~8(10) mm,直径 1~2 mm,颜色为肉色,外延菌丝长,白色到淡黄色,根状菌索发达,枝状,分支,在地下分布为网状(图 1,A)。

2.1.2 组织学特征 菌套内外层都为密丝组织,菌丝缠绕相对疏松,单个菌丝细,壁薄,透明,细胞质均匀,有隔,锁状联合明显,不分支或分支很少,细胞锁状联合处菌丝膨大呈关节状,关节处表面观似有一骸骨状结构存在(图 1,B、C)。

横切面:平面观为密丝组织,菌套不分层,厚度 18~25 μm,丹宁层较厚,厚度 20~30 μm,染色较深呈间断状,菌丝弯曲穿梭与丹宁层间断处,哈蒂氏网深入皮层细胞 3~4 层,菌丝细胞为圆形(图 1,D)。



注:A:外生菌根外部形态结构图(×45),B:外生菌根外菌套解剖结构图(×400),C:外生菌根内菌套解剖结构图(×400),D:兴安落叶松外生菌根横切面图(×400)。

图 1 外生菌根解剖结构

Fig. 1 Anatomical feature of ectomycorrhizal

2.2 序列分析和系统进化树构建

将测序所得的 ITS 序列(约 500~750 bp) 利用 Bioedit 和 ClustalX 软件软件进行剪切和比对并合并,认为相似度 $\geq 97\%$ 的序列为相同序列。通过在 NCBI 上 GenBank 数据库中进行 Blast 序列比对,并下载高同源性序列及其相关信息分析,最后用 MEGA 6.1 中的邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树<sup>[14]</sup>。选取 11 个与本试验样品相似性较高的 ITS 区段序列,进行系统进化树的构建。其中,外类群(OUTGROUP)引至隶属于丝膜菌科(Cortinariaceae)丝盖伞属(*Inocybe*)的 1 个种(表 1)。

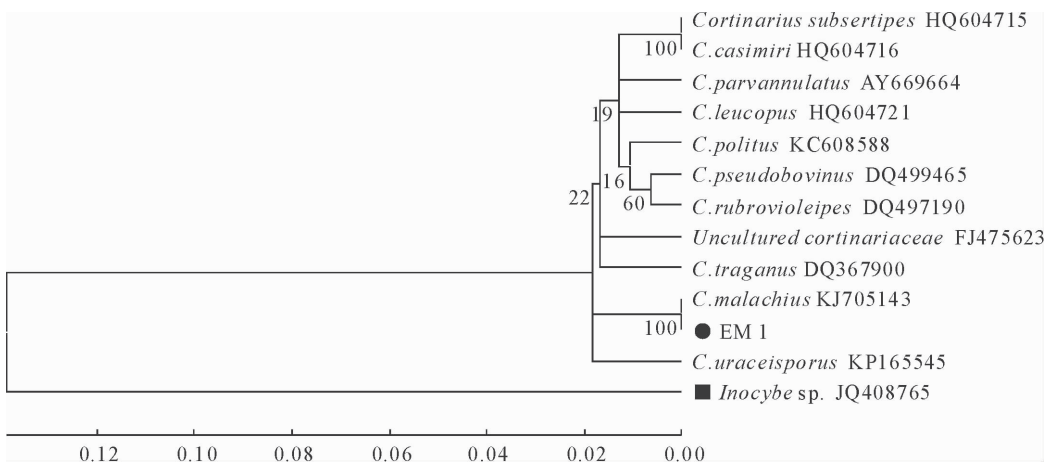
从进化树上可以看出,基本可分为 3 大枝。其中以本试验样品外生菌根 1(EM1)为 1 枝;外类群为 1 枝;剩余为 1 枝,但又有其小分枝。本研究样品 EM1 与 Genbank 编号为 gi | 661919314 | gb | KJ705143.1 | 皮革黄丝膜菌(*Cortinarius malachius* (Fr.:Fr.)Fr.)单独聚为 1 枝,2 者的亲缘关系非

常近,支持率达 100%。与外类群(*Inocybe* sp.)相距较远。由此可确定本研究菌株为皮革黄丝膜菌(图 2)。

表 1 ITS 区段 DNA 序列 FJ803942 BLAST 比对结果  
Table 1 DNA sequence BLAST results of the ITS region of DNA

| 最相近 BLAST 比对                            | 相似率/%       |
|---|-------------|
| <i>Cortinarius malachius</i> KJ705143.1 | 570/571(99) |
| <i>C. politus</i> KC608588.1            | 598/614(97) |
| <i>C. subseritipes</i> HQ604715.1       | 596/624(96) |
| <i>C. casimiri</i> HQ604716.1           | 608/634(96) |
| <i>C. parvannulatus</i> AY669664.1      | 600/627(96) |
| <i>C. leucopus</i> HQ604721.1           | 597/623(96) |
| <i>C. pseudobovinus</i> DQ499465.1      | 599/623(96) |
| <i>C. rubrovioleipes</i> DQ497190.1     | 599/622(96) |
| <i>C. traganus</i> DQ367900.1           | 603/628(96) |
| <i>C. uraceisporus</i> KP165545.1       | 600/623(96) |
| Uncultured cortinariaceae FJ475623.1    | 605/638(95) |

注:FJ803942 序列长度 619 bp。



注:利用邻接法所构建的进化树,以丝盖伞菌(*Inocybe* sp.)为外类群,分枝上的数值为支持率(%). EM1:外生菌根 1 种。

图 2 样品系统聚类分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of EM1

3 结论与讨论

外生菌根菌是高等真菌与树木的根系所形成的共生体。目前,皮革黄丝膜菌(*Cortinarius malachius* (Fr.:Fr.) Fr.)仅在王海燕<sup>[16]</sup>等在甘肃大型真菌新纪录种中有报道,报道此种为甘肃省新纪录种,并说明其属于外生菌根真菌,而且在青海地区也有分布。刘世好<sup>[17]</sup>等在高望界自然保护区冬季大型真菌资源考察初报中报道此种为湖南省新纪录种,并阐明皮革黄丝膜菌是树木外生菌根真菌之一。但该菌在内蒙古地区未见相关报道,本研究通过对该种的形态学与分子生物学研究初步鉴定为皮革黄丝膜菌,并认为内蒙古新纪录种且为外生菌根真菌。但由于受采集外生菌根土样的季节影响,未

采集到此种的子实体,有待今后进一步调查研究。

参考文献:

[1] SMITH S E, READ D J. Mycorrhizal symbiosis[M]. 3rd. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2008.

[2] RINALDI A C, COMMANDINI O, KUYPER T W. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff [J]. Fungal Diversity, 2009, 33: 1-45.

[3] 郭良栋. 中国微生物物种多样性研究进展[J]. 生物多样性, 2012, 20(5): 572-580.

GUO L D. Progress of microbial species diversity research in China [J]. Biodiversity Science, 2012, 20(5): 572-580. (in Chinese)

[4] HAWKSWORTH D L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited [J]. Mycological Research, 2001, 105(12): 1422-1432.

Wang H S,Li S H,Guo J W,*et al.* Retrieval of the leaf area density of Magnolia woody canopy with terrestrial Laser-scanning data [J]. Journal of Remote Sensing,2016,20(4): 570-578. (in Chinese)

[16] 仓山区统计局. 仓山统计年鉴 2011[M]. 北京:中国统计出版社,2012:163-252.

[17] 陈景玲,王静,王谦,等. 植物冠层分析仪测定荆条孤立冠层叶面积指数和透光率的分析[J]. 中国农业气象,2014,35(4): 373-379.

CHEN J L,WANG J,WANG Q,*et al.* LAI and light transmittance measurement of isolated *Vitex* shrub using LAI-2200 PCA[J]. Chinese Journal of Agrometeorology,2014,35(4):373-379. (in Chinese)

[18] 王洪蜀. 基于地基激光雷达数据的单木与阔叶林叶面积密度反演[D]. 成都:电子科技大学,2015.

[19] LESA P,WAYNE T. Algorithm for finding all k nearest neighbors[J]. Computer-Aided Design,2002,34:167-172.

[20] 吕娅,万程辉. 三维激光扫描地形点云的分层去噪方法[J]. 测绘科学技术学报,2014,31(5):501-504.

LV Y,WAN C H. A denoising method by Layering for Terrain point cloud from 3D laser scanner[J]. Journal of Geomat-ics Science & Technology,2014,31(5):501-504. (in Chinese)

[21] 尤号田,邢艳秋,王铮,等. 点云密度对激光雷达估计森林样方平均树高的影响[J]. 东北林业大学学报,2014,15(2):173-188.

YOU H T,XING Y Q,WANG Z,*et al.* Effects of LiDAR point density on tree height estimation in plots level[J]. Journal of Northeast Forestry University,2014,15(2):173-188. (in Chinese)

[22] 苏伟,郭皓,赵冬玲,等. 基于地基激光雷达的玉米真实叶面积提取方法研究[J]. 农业机械学报,2016,47(7):345-353.

SU W,GUO H,ZHAO D L,*et al.* Estimation of actual leaf area of maize based on terrestrial laser scanning[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery,2016,47(7):345-353. (in Chinese)

[23] 尤号田,邢艳秋,王铮,等. 利用 LiDAR 离散点云估测针叶林叶面积指数[J]. 西北林学院学报,2014,29(3):41-47.

YOU H T,XING Y Q,WANG Z,*et al.* Estimation of the leaf area index of coniferous forests using LiDAR discrete point cloud[J]. Journal of Northwest Forestry University,2014,29(3):41-47. (in Chinese)

(上接第 164 页)

[5] GARDES M,BRUNS T D. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views[J]. Canadian Journal of Botany,1996,74(10): 1572-1583.

[6] SMITH E,VEENMAN C,BAAR J. Molecular analysis of ectomycorrhizal basidiomycete communities in a *Pinus sylvestris* L. stand reveals long-term increased diversity after removal of litter and humus layers [J]. Fems Microbiology Ecology,2003,45(1):49-57.

[7] HORTON T R,BRUNS T D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology:peeking into the black-box [J]. Molecular Ecology,2001,10(8):1855-1871.

[8] AGERER R. Characterization of ectomycorrhiza[M]//NORRIS J R,READ D A,VARMA A K. Techniques for the study of mycorrhiza. Methods Microbiol. San Diego,USA:Academic,1991. 25-73

[9] 宋彦君,季志平,吕平会,等. 镇安板栗外生菌根真菌多样性研究[J]. 西北林学院学报,2016,31(4):188-194.

SONG Y J,JI Z P,LYU P H,*et al.* Community structure of ectomycorrhizal fungi associated with *Castanea mollissima* in Zhen'an County[J]. Journal of Northwest Forestry University,2016,31(4):188-194. (in Chinese)

[10] AGERER R,DAIELSON R M,EGLI S. *et al.* Discriptions of ectomycorrhizae. methods in microbiology//NORRIS J R,READ D A,VARMA A K. Techniques for the study of mycorrhiza. Newyork,USA:Academic Press,1996,5:23-183

[11] AGERER R. Colour atlas of ectomycorrhizae:1<sup>st</sup>—13<sup>th</sup> delivery[M]. Schwäbisch Gmünd:Einhorn-Verlag,2006.

[12] HAUG I,PRITSCH K. Ectomycorrhizal types of spruee(*Picea abies* CL. karst. )in the blank forest. a microscopical atlas [M]. Tubingen,Germany:Kernforschungszentrum Karlsruhe,1992,71-89.

[13] 樊永军,闫伟,王黎元. 贺兰山地区青海云杉外生菌根形态类型及分子鉴定研究[J]. 林业科学,2011,47(6):108-113.

FAN Y J,YAN W,WANG L Y. Study on morphological type and molecular identification of ectomycorrhizae on *Picea crassifolia* at Helan Mountain[J]. Scientia Silvae Sinicae,2011,47(6):108-113. (in Chinese)

[14] 杨韧,张好强,唐明. 陕北地区油松根际真菌资源初步调查及其与土壤理化性质的关系[J]. 西北林学院学报,2016,31(5): 203-210.

YANG R,ZHANG H Q,TANG M. A survey of root fungal resources of *Pinus tabulaeformis* and its relationship with soil physicochemical properties in northern Shaanxi[J]. Journal of Northwest Forestry University,2016,31(5):203-210. (in Chinese)

[15] 王海燕,张如力,刘秀生,等. 甘肃大型真菌新记录[J]. 西北植物学报,2010,30(6):1279-1287.

WANG H Y,ZHANG R L,LIU X S,*et al.* Newly recorded macrofungi in Gansu Province[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2010,30(6):1279-1287. (in Chinese)

[16] 刘世好,卢立,但新球. 高望界自然保护区冬季大型真菌资源考察初报[J]. 湖南林业科技,2006,33(4):24-26.