

一株丛枝菌根真菌的形态与分子鉴定

龙良鲲¹, 姚青², 羊宋贞¹, 朱红惠¹

(1 广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070;

2 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:从广东酸性土壤分离得到一种编号为2-1A1的丛枝菌根真菌。其孢子在土壤中单生, 未见孢子果, 椭圆形, 黄色至褐色, 孢子较大(170 μm × 230 μm), 孢壁一层, 厚约11 μm, Melzer's反应为黄色。其形态特征与*Glomus flavisporum*的特征描述相一致。提取其单孢子DNA, Nested PCR扩增其18S rDNA的NS31-AM1区, 经序列测定, 并在GeneBank上比对, 进行系统进化树分析, 结果表明, 2-1A1与*Glomus sp.* (DQ371674)的亲缘关系最近, 序列同源率为98%。分子鉴定的方法只能将其鉴定到球囊霉属*Glomus*。

关键词:球囊霉属; 形态; 18S rDNA; 进化树; 鉴定

中图分类号: Q939.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2006)04-0040-03

Identification of an Arbuscular Mycorrhizal Fungi by the Methods of Morphology and Molecule

LONG Liang-kun¹, YAO Qing², YANG Song-zhen¹, ZHU Hong-hui¹

(1 Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China; 2 College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Spores of an arbuscular mycorrhizal fungal which marked as 2-1A1 were isolated from the acid soil in Guangdong Province. The spores formed singly in soil, no sporocarp, ellipsoid, yellow to brown in color. Spore wall consisted by only one layer and 11 μm thick. Melzer's reaction was yellow. Strain 2-1A1 accorded with *Glomus flavisporum* in morphology. DNA was extracted from a single spore 2-1A1, then the NS31-AM1 region of 18S rDNA was amplified specifically by nested PCR. PCR products was sequenced and the DNA sequence was blasted on GeneBank. Phylogenetic tree revealed that strain 2-1A1 was closely related to *Glomus sp.* (DQ371674), with the similarity of 98%. Strain 2-1A1 was belong to the genus *Glomus sp.* by part of 18S rDNA sequence analysis.

Key words: *Glomus*; morphology; 18S rDNA; phylogenetic tree; identification

丛枝菌根(arbuscular mycorrhizal, AM)真菌是一类能与植物根系形成互惠共生体的微生物, 可侵染90%以上的陆生植物。由于AM真菌能够积极促进宿主植物吸收矿质营养(P, N等), 增强宿主植物对各种生物胁迫(病原菌等)和非生物胁迫(贫瘠、干旱、重金属等)的抗性, 已成为一类重要的微生物资源^[1-2]。AM真菌菌种的分类鉴定是一项重要的基础

工作, 对于认识和保护AM真菌资源具有重要的意义。以往人们多是根据孢子形态、菌丝侵染和产孢方式等特征对AM真菌进行分类鉴定, 但由于同一种AM真菌的孢子形态会因环境条件(地理差异、宿主植物)的不同, 而有较大的差别, 因而易给菌种鉴定工作带来困难或产生分类混乱^[1]。随着分子生物学技术的发展, 各种分子技术已被应用到物种的鉴定

收稿日期: 2006-03-08

作者简介: 龙良鲲(1978—), 男, 助理研究员, 博士研究生; 通讯作者: 朱红惠(1970—), 女, 博士, 副研究员, E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30370033, 30200006); 广东省自然科学基金(E05202480)

一支,在所有的比对结果中,2-1A1 与该菌株的同源序列相似率最高,为 98%。由于 *Glomus flavisporum* 的核酸序列信息未能在 GenBank 中搜寻到,通过现有序列信息的分析,只能将菌株 2-1A1 初步鉴定到 *Glomus* sp. 2-1A1 和 *Gi. margarita* RB 的 NS31-AM1 区域 DNA 序列在 Genbank 中的登陆号分别为 DQ139330 和 DQ187335。

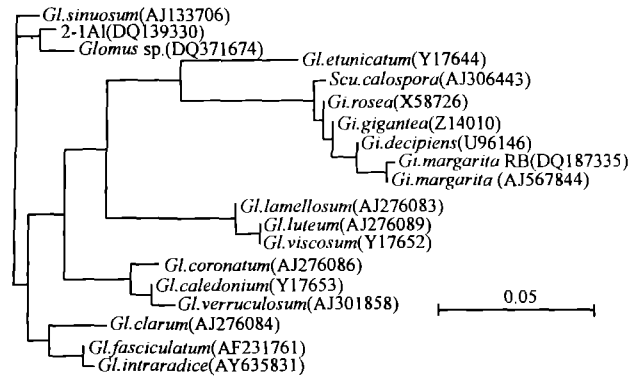


图3 2-1A1、*Gi. margarita* RB 及相关菌株的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 2-1A1, *Gi. margarita* RB and the relative strains

3 讨论与结论

AM 真菌的分类鉴定是一项基础而重要的工作,对于收集、保护及利用这类微生物资源具有重要的意义。AM 真菌与宿主植物严格共生,不能独立完成生活周期,目前还不能对其进行纯培养。因此,AM 真菌的鉴定只能以自然环境中获取的孢子,或借助宿主扩繁得到的纯菌,进行形态学和相应的组织化学反应鉴定。该法不仅操作繁琐,鉴定结果也常因环境因素的影响,而难以稳定。近年来,随着分子生物学的迅猛发展,从基因水平上认识和鉴定物种成为可能,并具有传统鉴定技术不可比拟的优越性。国外已将 PCR、DNA 限制性长度多态性 (RFLP)、随机引物扩增多态性 (RAPD) 等技术成功应用于 AM 真菌的种群分析中^[3-5]。NS31-AM1 区域是真核生物 18S rDNA 的一部分,其片段较小(约 550 bp),又是 AM 真菌菌种的种间可变区域,可以作为菌种鉴定的依据之一。Ma 等^[8]曾有过较成功的报道。本文对 *Gi. margarita* RB 的分子鉴定结果也验证了这一方法的可行性。

基于形态学特征等,将 AM 真菌 2-1A1 鉴定为 *Glomus flavisporum*。同时通过 NS31-AM1 区的序列分析对其进行了分子鉴定。结果显示,与其亲缘关系最近的菌株为未确定种名的 *Glomus* sp. (DQ371674),同时 *Glomus flavisporum* 的相关基因信息未能在 GenBank 中搜寻到,因而该法只能将其鉴定到球囊霉属 *Glomus*。目前,AM 真菌进行分子鉴定的困难之处在

于其基因信息数据库还不完善,许多菌种,尤其是标准菌株的基因信息未能进入数据库。AM 真菌基因数据库发展缓慢与该类真菌不能纯培养有极大的关系。目前,只能通过从土壤中获取 AM 菌孢子,并通过繁琐的单孢接种、宿主培养、收集孢子,最终获得纯净的株系后,才能得到其 DNA 信息。此外,有报道显示,在 AM 真菌孢子、菌丝的表面及内部存活大量的细菌及其他种类的真菌等^[9],这些微生物也给予其核酸信息的准确收集带来干扰。为了使 AM 真菌分子鉴定途径更加可行,一方面要加快 AM 真菌的营养生理研究,争取早日实现其纯培养,另一方面要通过现有的途径全面收集 AM 菌种资源的 DNA 信息,比较分析种群间基因差异,为分子鉴定提供理论基础。

致谢:感谢广东省微生物所陈美标、黄浩等帮助采土样及挑取孢子!

参考文献:

- [1] 刘润进, 李晓林. 丛枝菌根及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 1-198.
- [2] KOIDE R T, MOSSE B. A history of research on arbuscular mycorrhiza[J]. Mycorrhiza, 2004, 14: 145-163.
- [3] OBA H, TAWARAYA K, SAITO M, et al. Semi-quantitative analysis of arbuscular mycorrhizal colonization of onion roots inoculated with single or mixed species based upon PCR-RFLP[J]. Soil Sci Plant Nutr, 2002, 48: 51-56.
- [4] REDECKER D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots[J]. Mycorrhiza, 2000, 10: 73-80.
- [5] YOKOYAMA K, TATEISHI T, MARUMOTO T, et al. A molecular marker diagnostic of a specific isolate of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* [J]. FEMS microbiology letters, 2002, 212: 171-175.
- [6] SCHENCK N C, PEREZ Y. Manual for the Identification of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi[M]. 2nd ed. Gainesville: INVAM University of Florida, 1988: 1-139.
- [7] 龙良鲲, 羊宋贞, 姚青, 等. AM 真菌 DNA 的提取与 PCR-DGGE 分析[J]. 菌物学报, 2005, 24(4): 564-569.
- [8] MA W K, SICILIANO S D, GERMIDA J J. A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37: 1-9.
- [9] MOHAMED H, DIRK R, JEAN A, et al. Identification and isolation of two ascomycete fungi from spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4567-4573.

【责任编辑 李晓卉】