

樟子松 2 种块菌属外生菌根形态描述和分子鉴定

张文泉¹, 罗国涛¹, 闫伟²

(1. 凯里学院, 贵州 凯里, 556011; 2. 内蒙古农业大学 林学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要: 利用外部形态和解剖结构特征进行对比, 选出樟子松 *Pinus sylvestris* var. *mongolica* 2 个类似块菌属 *Tuber* 的外生菌根类型, 再采用 CTAB 法对其进行基因组 DNA 提取, 并利用真菌特有引物 ITS1F 和 ITS4, 在 PCR 基础上对其 rDNA 的 ITS 区段进行碱基序列测定, 并与 GenBank 数据库中已知的相关序列进行 Blast 比对得出: 类型 1, 类型 2 均为块菌属的外生菌根, 类型 1 可鉴定到种, 为辽东块菌 *Tuber liaotungense*。

关键词: 外生菌根; 形态特征; 分子鉴定; 樟子松; 块菌

中图分类号: S791.253 文献标识码: A 文章编号: 1001-3776(2018)01-0006-05

Morphology and Identification of Truffles in the Soil of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* Forest

ZHANG Wen-quan¹, LUO Guo-tao¹, YAN Wei²

(1. Kaili University of Guizhou, Kaili 556011, China; 2. College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China)

Abstract: In May and October of 2014 and 2015, collections of soil sample were implemented under *Pinus sylvestris* var. *mongolica* forests in 6 forest farms in the Nei Monggol Autonomous Region. Roots with mycorrhiza were selected from soil sample and two types of truffle were described and identified. The extraction of genomic DNA of two truffles by CTAB method, and on the basis of PCR, ITS regions of DNA of the macrofungi were amplified and sequenced by using the special pairs of primers ITS1F/ITS4. Their sequences were compared with those registered in GenBank database. They were belonged to *Tuber*, and one of them was *T. liaotungense*。

Key words: ectomycorrhizae; morphological features; molecular identification; *Pinus sylvestris* var. *mongolica*; truffles

块菌 (Truffles) 是一类地下真菌, 其许多种类具有极高的经济价值, 是大型真菌中最为珍稀名贵的食用真菌之一, 含有丰富的营养物质及多种易被人体吸收的氨基酸和无机盐, 如黑孢块菌 *Tuber melanosporum* 和意大利白块菌 *T. magnatum*, 与鱼子酱、鹅肝酱同被称为三大珍品。国外对块菌的研究有近 200 a 历史, 1985 我国的刘波首次对太原块菌 *T. taiyuanense* 进行报道^[1]。有人对我国的块菌资源开展了大量的研究。至今已报道的中国块菌有近 30 种, 主要分布于我国的国块菌主要分布在四川和云南, 此外西藏、新疆、山西、辽宁、吉林、福建、湖南、湖北、甘肃、北京、河北、台湾均有分布, 主要集中在 100°~105° E, 25°~30° N 这一条带上^[2-4]。

樟子松 *Pinus sylvestris* var. *mongolica* 适应性强, 抗寒、抗旱、耐贫瘠, 防风固沙作用显著, 在我国北方地

收稿日期: 2017-06-03; 修回日期: 2017-12-01

基金项目: 贵州省科技厅基础研究项目 (黔科合基础 [2018] 1139 号); 贵州省科技厅基础研究项目 (黔科合基础 [2017] 1165 号); 贵州省科技厅联合基金项目 (黔科合 LH 字 [2014] 7241 号); 贵州省科技厅联合基金项目 (黔科合 LH 字 [2015] 7752 号); 凯里学院博士专项课题 (凯院合 BS201339 号)

作者简介: 张文泉, 副教授, 从事林木生物技术方面的研究; E-mail: zwq840209@yeah.net。通信作者: 闫伟, 教授, 博士研究生导师, 从事林木菌根生物技术方面的研究; E-mail: weiyanyan@imau.edu.cn。

区广泛分布。由于樟子松适应性强而且较速生, 目前是我国北方地区主要的造林树种之一^[5-6]。对内蒙古樟子松外生菌根真菌多样性的调查中发现^[7-8], 与樟子松共生的外生菌根真菌中有典型的 *Tuber* 属真菌 2 种块菌, 对其类型进行了描述和分子鉴定, 为樟子松优良乡土菌种筛选提供理论基础, 同时又丰富了我国北方地区块菌菌根真菌资源多样性。

1 试验材料与方法

1.1 材料

采集地点为内蒙古自治区呼伦贝尔大兴安岭林场莫尔道嘎林业站及红花尔基林业站、乌兰察布市凉城林场、赤峰市黄岗梁林场、鄂尔多斯市伊金霍洛旗林场、辽宁章古台林场, 每个林场作为一个采集地。在以上采集地的樟子松天然林或人工纯林群落中距樟子松主干 0.5 ~ 1.0 m 范围内, 取长 × 宽 × 深为 20 cm × 20 cm × 30 cm 带根土样, 每一采集地随机采集 9 个样品, 每一样品的采集地间隔 10 m 以上, 采集时间分别为 2014, 2015 年的 5 月与 10 月, 每个采集地都采样 2 次辽东块菌。所采集的样品分别采用密封塑料袋分装, 样品取回后与密封塑料袋一起置于 4℃ 冰箱内保存。

1.2 样品处理

样品取回后尽早取样, 最迟 5 d 内处理完毕, 将土样浸泡于水中 2 ~ 3 h 后倒入土筛中流水冲洗, 将洗净后的根样剪成小段, 置于培养皿中, 采用体视显微镜观察, 挑选出有菌根的根段。

1.3 形态分类

根据菌根表面特征对菌根进行初步分类, 分类的依据为颜色、外延菌丝、有无根状菌索、菌核、囊状体等特征, 并采用 Olympus SZX10 体视显微镜拍照, 记录其显著特征。

对初步分类后的每一菌根类别的菌套进行剥离、制片。在 Olympus BX41 光学显微镜下对每一菌根类别的菌套特征、外延菌丝特征、菌索特征进行观察并详细记录。

结合菌根的外部形态特征和菌套的解剖结构特征, 将菌根分成不同的形态类型, 将每一种形态类型的菌根选取新鲜、幼嫩、纯净的同一分支系统菌根一部分采用 1/2 FAA 固定液, 用于形态观察, 另一部分置于 CTAB 缓冲液中保存, 用于分子生物学鉴定。菌根系统形态分类和描述参照 Agerer^[9-10]。

1.4 分子鉴定

1.4.1 DNA 的提取 采用 CTAB 法^[7]提取 DNA。

1.4.2 PCR 扩增 PCR 反应体系 (50 ul) 中: Template 2 ul; ITS1s, ITS4 引物各 2 ul, 2 × Master Mixture 25 ul, 不足部分用 ddH₂O 补足, PCR 扩增反应在 Eppendorf Masetercycler PCR 仪上进行, 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 40 s, 56℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 60 s, 35 个循环, 72℃ 平展 10 min, PCR 产物的纯化和测序交由生工生物工程公司。序列的编辑用 Bioedit 完成。在 GenBank (NCBI) 将编辑的菌根 rDNA ITS 序列进行比对分析, 根据序列的相似度来确定菌根真菌的分类关系。

2 结果与分析

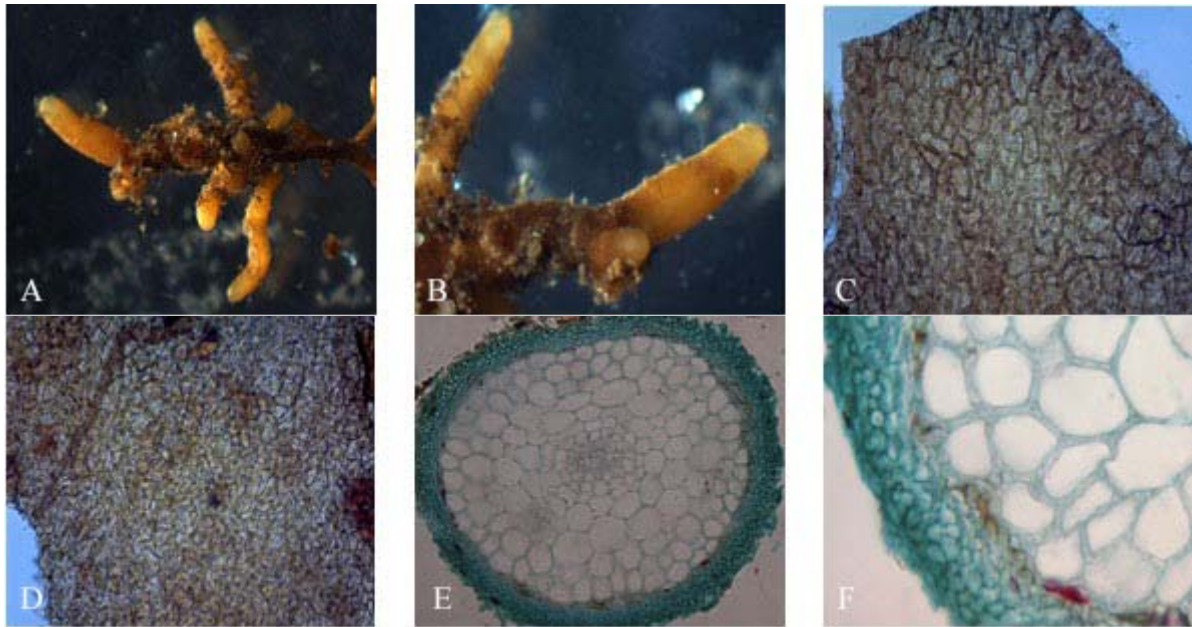
2.1 形态和解剖结构特征

通过外生菌根的形态比较观察, 发现樟子松的外生菌根中有 2 个类型的形态结构与块菌属相似, 对这 2 个块菌属的樟子松外生菌根形态和解剖结构特征描述如下。

类型 1。

菌根系统为单轴或羽状分支, 分支 1 ~ 2 级, 亲水。未分支的末端细尖状, 末端未见明显膨大, 长 1 ~ 2 mm, 直径 0.7 mm, 幼时为浅褐色, 老时颜色略有加深, 为黄褐色。未分支末端有少量稀疏的外延菌丝, 外延菌丝较短, 无根状菌索, 无囊状体, 无菌核 (图 1A, 图 1B)。

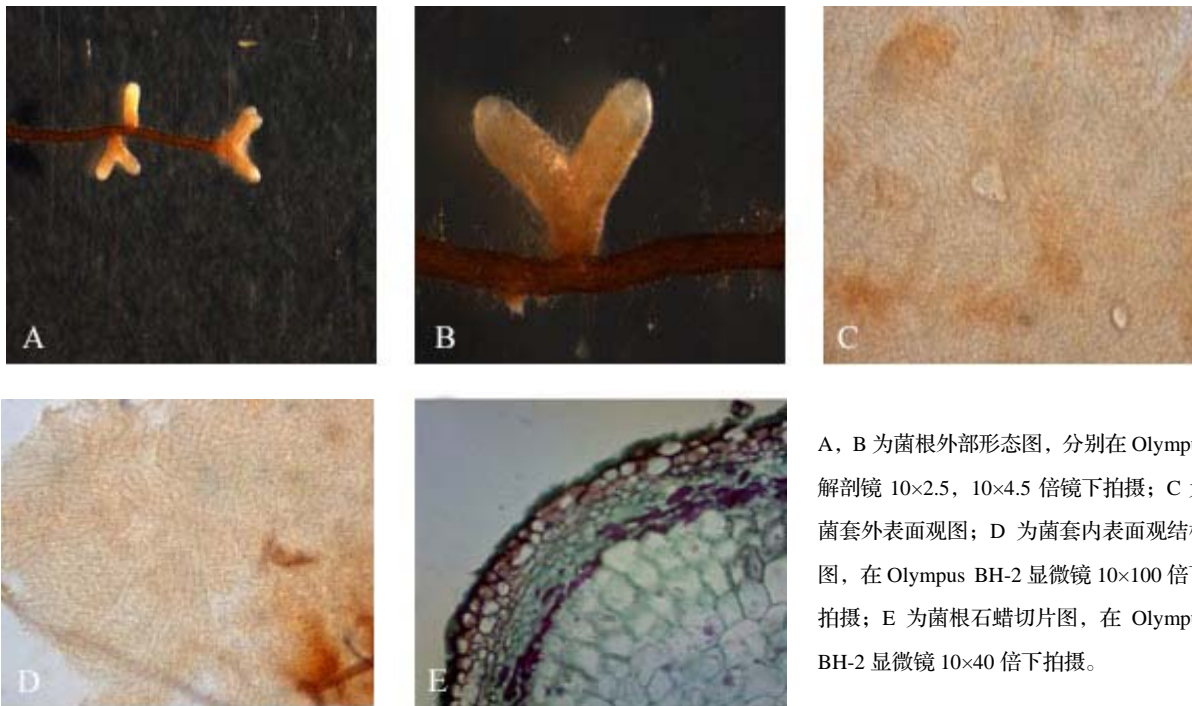
外层菌套为拟薄壁组织, 菌套类型为 M 型^[9-10], 菌丝细胞的细胞壁较薄, 菌丝有隔, 无锁状联合, 菌丝互相连接呈表皮细胞状, 菌丝表面较光滑, 弯曲分支形成网状。内层菌套与外层菌套一致 (图 1C, 图 1D)。菌套 7~8 μm 厚, 由椭圆形细胞规则排列组成, 哈蒂氏网伸入皮层细胞 2~3 层 (图 1E, 图 1F)。



A, B 为菌根外部形态图, 分别在 Olympus 解剖镜 10×4.5, 10×6.0 倍镜下拍摄; C, D 为菌套解剖结构图, 在 Olympus BH-2 显微镜 10×100 下拍摄; E 为菌根横切面图, 在 Olympus BH-2 显微镜 10×40, 10×100 倍下拍摄。

图 1 类型 1 菌根外部形态和解剖结构图

Figure 1 External morphology and anatomical features of type 1



A, B 为菌根外部形态图, 分别在 Olympus 解剖镜 10×2.5, 10×4.5 倍镜下拍摄; C 为菌套外表面观图; D 为菌套内表面观结构图, 在 Olympus BH-2 显微镜 10×100 倍下拍摄; E 为菌根石蜡切片图, 在 Olympus BH-2 显微镜 10×40 倍下拍摄。

图 2 类型 2 菌根外部形态和解剖结构图

Figure 2 External morphology and anatomical features of type 2

类型 2。

菌根系统为二叉分支, 分支 1~2 级, 亲水。菌根的末端圆棒状, 末端可见明显膨大, 长 1.0~1.5 mm, 直径为 1 mm, 幼嫩时为浅黄色, 老时为黄白色, 由菌根基部至顶端颜色逐渐变淡, 菌根顶端透明, 发亮。菌根末端有少量绒毛状的外延菌丝, 外延菌丝稀疏, 较细, 无根状菌索, 无囊状体, 无菌核 (图 2A, 图 2B)。

外层菌套为拟薄壁组织, 菌套类型为 Q 型, 菌丝细胞无规则膨大, 排列整齐, 紧密, 菌丝细胞的细胞质均匀, 细胞壁较薄, 弯曲后相互缠绕形成网纹状, 内层菌套为密丝组织, 菌套类型为 E 型, 菌丝细胞细胞壁薄, 菌丝分支较多, 且膨大, 卷曲盘绕, 比外层菌套的菌丝缠绕更紧密, 形成网眼状 (图 2C, 图 2D)。平面观哈蒂氏网呈网状, 菌丝有隔, 无锁状联合, 菌丝细胞呈圆形, 哈蒂氏网深入到整个外皮层细胞, 达内皮层细胞的外层 (图 2E)。

2.2 分子鉴定

将类型 1, 类型 2 所测的 DNA 序列在 NCBI 中进行比对, 在可比较的碱基范围内进行 DNA 序列同源性比较时, 自动滤除了低复杂性序列 (Low-complexity sequence) 和未命名的序列, BLAST 查询的结果表明: 类型 1 与编号为 gi|323903052|gb| GU979037.1|的辽东块菌 *T. liaotongense* ITS 区段 DNA 序列同源性为 500/504 (99%), 两者相比较的 score 值为 905 bits, 空位值 Gaps=3/504 (1%), E 值为 0.0。因此确定类型 1 为此种。

类型 2 与编号为 gi|315666394|gb| HM485403.1|的卡斯蒂利亚块菌 *T. castilloi* ITS 区段 DNA 序列同源性为 518/553 (94%)。两者相比较的 score 值为 815 bits, 空位值 Gaps=14/553 (0%), E 值为 0.0。BLAST 查询结果中列出的 100 个 E 值为 0.0 的主要同源序列中所有都属于 *Tuber* 属, 所以可确定类型 2 为块菌属的一个种。

3 结论与讨论

从菌根的外部形态观察得知: 类型 1 与类型 2 两个类型菌根的颜色均比较浅, 其中类型 2 菌根顶端呈透明状; 菌根系统的分支不多, 均只是在菌根表面有少量的外延菌丝而且比较稀疏。从解剖结构上可知: 类型 1 与类型 2 两个类型菌根的外层菌套均为拟薄壁组织, 菌丝细胞的细胞壁较薄, 两个类型的菌丝均有隔, 无锁状联合, 内外层菌套的菌丝均出现不同程度的弯曲, 形成网纹状。类型 1 与类型 2 在形态和解剖结构特征上与之前在白桦 *Betula platyphylla* 上发现的菌根 *Tuberaceae* sp.^[11] 十分相似, 具有块菌属外生菌根区别于其他属外生菌根的典型外部形态特征及解剖结构特点, 初步可确定为块菌属的外生菌根。

进一步进行分子鉴定可知: 类型 1, 类型 2 均为块菌属的外生菌根真菌, 类型 1 可鉴定到种, 为辽东块菌。

目前, 对块菌的研究主要集中在系统分类学、生态学、生物化学及人工栽培等方面, 因块菌属子囊果生于地下, 采集困难, 大多数种类的地理分布尚不明确, 该属大多数种类的遗传多样性研究还存在一定的困难, 此方面的研究鲜见报道^[12-16]。本文通过分子鉴定后对与樟子松共生的 2 种块菌类型外生菌根的外部形态及解剖结构进行了描述, 既扩大了樟子松外生菌根类型的多样性, 为樟子松优良乡土菌种筛选提供理论基础, 又为块菌属外生菌根的鉴定及块菌属种类的遗传多样性分析提供依据, 并丰富了我国北方地区块菌菌根真菌资源多样性。

块菌属分类鉴定大多是依据其子囊果的形态特征进行区分, 但许多形态相似的或相近的种的区分成为难题, 能否通过其所形成的外生菌根的特征及提取 DNA 依靠分子生物学等现代研究手段来寻找更多更可靠的分类证据? 新近的报道指出: 我国的块菌属资源丰富, 而且独特, 尚存在着大量的新分类群未被发现^[17-19], 诸多已知的种类通过研究与比对虽与欧洲及北美地区的某些种类极其相似, 但其分布范围却不尽相同, 如: 樊永军等^[20]人在贺兰山发现冬块菌 *Tuber brumale* 在内蒙古地区的新记录种。因此, 针对我国块菌属系统完整的分类描述及大量的资源调查工作还有待进一步加强。

参考文献:

- [1] 刘波. 中国地下真菌新种和新记录[J]. 真菌学报, 1985, 4: 84-89.
- [2] CHEN J, GUO S X, LIU P G. Species recognition and cryptic species in the *Tuber indicum* complex[J]. PLoS One, 2011, 6 (1): 1-10.

- [3] 陈应龙, 弓明钦. 块菌资源多样性及其地理分布[J]. 中国食用菌, 2000, 19 (6) : 25 – 26
- [4] 万山平, 郑毅, 刘培贵, 等. 攀枝花块菌-华山松菌根际土壤可培养细菌的多样性研究[J]. 植物分类与资源学报, 2015, 37 (6) : 861 – 870.
- [5] 张文泉, 闫伟. 樟子松愈伤组织诱导及植株再生的初步研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32 (11) : 37 – 41.
- [6] 张文泉, 闫伟. 外生菌根菌对樟子松苗木生长的影响[J]. 西北植物学报, 2013, 33 (5) : 0998 – 1003.
- [7] 张文泉. 樟子松外生菌根真菌多样性及菌根生物技术研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013: 78 – 80. .
- [8] 魏杰, 张文泉, 闫伟. 樟子松 4 种深色外生菌根研究[J]. 干旱区资源与环境, 2015, 29 (4) : 178 – 183
- [9] AGERER R. Characterization of ectomycorrhizae. In: Norris J R, Read D A, Varma A K (eds). Techniques for the Study of Mycorrhiza. Methods in microbiology[M]. Academic Press, London, 1991: 25 – 73.
- [10] AGERER R. DAIELSON R M. EGLIS. *et al.* (eds) Discriptions of ectomycorrhizae[J]. Nova Hedwigia, 1996, 23 – 183.
- [11] 樊永军, 闫伟. 内蒙古地区白桦外生菌根形态类型及分子鉴定[J]. 西北植物学报, 2013, 33 (11) : 2209 – 2215.
- [12] 王福强, 张世奇. 块菌的国内外研究及其有效活性成分的应用[J]. 农产品加工, 2011, 1 (1) : 63 – 67.
- [13] 刘培贵, 王云, 王向华, 等. 中国块菌要览及其保护策略[J]. 菌物研究, 2011, 9 (4) : 232 – 243.
- [14] 徐阿生, 郑维列. 中国块菌属真菌研究述评[J]. 林业科学研究, 2003, 16: 73 – 85.
- [15] 陈应龙, 弓明钦. 块菌资源多样性及其地理分布[J]. 中国食用菌, 2000, 19 (5) : 6 – 7.
- [16] 陈娟, 邓晓娟, 陈吉岳, 等. 中国块菌属多样性[J]. 菌物研究, 2011, 4: 244 – 245.
- [17] 任德军. 中国块菌属 (*Tuber*) 系统学研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2003: 9 – 11. .
- [18] 方明. 15 个块菌菌株的形态学与分子生物学鉴定[D]. 长春: 吉林大学, 2006: 24 – 26.
- [19] 李淑超, 乔鹏, 刘思思, 等. 块菌属分子系统学及菌根共生机制研究进展[J]. 菌物学报, 2017, 36 (2) : 131 – 144
- [20] 樊永军, 赵艳玲, 陈秀莉, 等. 2 种块菌的物种分子鉴定与系统地位分析[J]. 西北植物学报, 2016, 36 (8) : 1560 – 1565.