

松口蘑(*Tricholoma matsutake*) 菌塘土壤可培养细菌多样性*

姜 华^{1,2} 何承刚² 于富强^{1**} 刘培贵¹ 赵文青¹

(¹中国科学院昆明植物研究所生物多样性与生物地理学重点实验室, 昆明 650201; ²云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201)

摘 要 松口蘑(*Tricholoma matsutake*) 也称松茸, 是具有重要经济和药用价值的野生食用菌, 菌塘是其子实体发生发育的场所。本文采用土壤平板稀释技术研究了云南省 6 份松口蘑菌塘土壤可培养细菌, 共获得了 178 条细菌的 16S rDNA 碱基序列, 经分析分别属于 4 个门、18 个属、38 个 OTUs, 变形菌门(Proteobacteria) 序列占 58.43%, 厚壁菌门(Firmicutes) 占 26.40%, 拟杆菌门(Bacteroidetes) 占 10.67%, 放线菌门(Actinobacteria) 占 4.49%, 其中厚壁菌门的芽孢杆菌属(*Bacillus*) 占 24.72%, 变形菌门的伯克氏菌属(*Burkholderia*) 占 21.34%, 假单胞菌属(*Pseudomonas*) 占 11.24%, 拟杆菌门的金黄杆菌属(*Chryseobacterium*) 占 10.67%。云南松口蘑菌塘土壤可培养细菌的多样性较为丰富。

关键词 松茸; 可培养细菌; 多样性

中图分类号 Q 948 文献标识码 A 文章编号 1000-4890(2015)1-0150-07

Bacterial diversity cultured from shiros of *Tricholoma matsutake*. JIANG Hua^{1,2}, HE Cheng-gang², YU Fu-qiang^{1**}, LIU Pei-gui¹, ZHAO Wen-qing¹ (¹Key Laboratory of Biodiversity and Biogeography, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; ²Faculty of Animal Sciences and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(1): 150–156.

Abstract: Matsutake (*Tricholoma matsutake*) is an important wild edible mushroom with important economic and medicinal value. The sporocarps often occur and develop in shiros. In this study, soils from six shiros of *T. matsutake* were collected in Yunnan Province and soil dilution plating was used to determine the diversity of bacterial species represented in these samples. Sequencing of 16S rDNA generated 178 sequences from cultured bacteria, representing 38 operational taxonomic units (OTUs) of 4 phyla and 18 genera. The majority of sequences belonged to Proteobacteria (58.43%), Firmicutes (26.40%), Bacteroidetes (10.67%), and Actinobacteria (4.49%). Further analysis revealed that bacteria cultured from these soils were species of *Bacillus* (Firmicutes, 24.72%), *Burkholderia* (Proteobacteria, 21.34%), *Pseudomonas* (Proteobacteria, 11.24%), and *Chryseobacterium* (Bacteroidetes, 10.67%). Therefore, the diversity of cultured bacteria from the shiros of matsutake in Yunnan Province was abundant.

Key words: matsutake; culturable bacteria; diversity.

DOI:10.13292/j.1000-4890.2015.0022

松口蘑(*Tricholoma matsutake*) 也称松茸, 是一种具有重要经济和药用价值的野生食用菌, 能与松科(Pinaceae) 和壳斗科(Fagaceae) 的一些植物形成

共生关系(Masui, 1927)。松口蘑菌塘(菌窝) 是宿主营养根与菌丝形成菌根的主要场所, 也是菌丝体进行生长、分化的主要区域, 同时又是子实体发生和发育的场所。真菌能否顺利的侵染植物的根并形成菌根, 不仅取决于其周围的非生物因素, 也取决于其根际微生物。根际中的有些微生物能够促进菌根的形成, 这些能够促进菌根形成的细菌称为菌根促生

* 国家自然科学基金项目(31370070 和 31270075)、NSFC-云南联合基金(U1202262)、云南省科技阶新 3 号省国际合作专项(2009AC013) 和“西部之光”人才培养项目“松口蘑菌塘微生物及其应用技术研究”资助。

** 通讯作者 E-mail: fqyu@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2013-05-13 接受日期: 2014-08-29

菌(mycorrhization helper bacteria ,MHBs) (Duponnois *et al.* ,1991) 。松口蘑与其共生树种菌根的形成及其子实体的发育与菌塘土壤微生物也同样存在着千丝万缕的联系。以往对松口蘑菌塘微生物的研究主要集中在真菌方面,研究发现,深紫被孢霉(*Mortierella vinacea*)是松口蘑菌窝中的优势微生物类群(傅伟杰,1996;杨民和等,1997);Vaario(2011)等研究表明,松口蘑菌塘内真菌中担子菌(Basidiomycota)占58.8%,子囊菌(Ascomycota)占21.6%,接合菌(Zygomycota)占9.8%,未知真菌占9.8%。一直以来,许多学者都认为菌塘土壤中细菌和放线菌极少(Ohara *et al.* ,1967;杨民和等,1997;刘培贵等,1999)。张俊(2010)对松茸发生地0~40 cm土层内微生物的研究表明,0~20 cm土层内的可培养细菌数远远大于20~40 cm土层内的数目。魏铁铮(2001)研究吉林长白山松口蘑未发生地、发生地和上一年发生地的土壤微生物发现,在10 cm土壤中,发生过松口蘑和正在发生松口蘑的采样点细菌、真菌和放线菌的数量明显少于未发生松口蘑菌丝的地点。Kataoka等(2012)采用土壤平板稀释技术在松树与松口蘑共生的菌根区检测到少量可培养细菌,而采用PCR-DGGE的方法却检测到了大量的未培养细菌。近年来,由于全球气候变迁、适宜松口蘑发生的森林植被环境日趋减少、过度采集以及不合理的采集方法等诸多因素使得国内外松口蘑的产量逐年减少,价格日益增高。云南地区的松口蘑产量也呈现了逐年下降的趋势,而价格却不断上涨,这就加重了掠夺式、地毯式的采摘,松口蘑资源受到了严重破坏。松口蘑作为国家二级保护植物正面临着濒危的境地,形势十分严峻。因此,对松口蘑发生地生境及其与其他微生物之间作用关系进行研究,为人工栽培松茸提供基础知识显得尤为重要。本研究以云南松口蘑菌塘内土壤为对象,采用牛肉膏蛋白胨培养基对其中可能存在的细菌进行培养,探讨菌塘内可培养细菌的种类与群落组成,阐明松口蘑菌塘土壤可培养

细菌的多样性,为分离和筛选出促进松口蘑菌塘及子实体形成的可培养细菌提供一定理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

分别于2010、2011和2012年在云南省剑川县石宝山石龙村、洱源县乔后乡河西村、德钦县霞若村、维西县塔城社塔城村、云南省剑川县庆华村和楚雄南华县五街镇芹菜塘村采集松口蘑菌塘土壤共6份(表1)。

1.2 土样采集方法

在野外发现松口蘑后,采其正下方10 cm深处的菌塘土样。首先用灭菌且锋利的小刀轻轻拨开松口蘑菌塘表面的土壤,用灭菌的镊子将菌塘的土壤夹起放入灭菌的15 mL的离心管内盖好盖子,迅速放入冰盒内。注明采集的时间、地点、海拔,同时记录菌塘附近植被及其树种情况。土样尽快带回实验室在4℃冰箱中保存,并迅速进行后续研究分析。

1.3 土壤微生物的分离纯化

采用牛肉膏蛋白胨培养基,28℃条件下培养3 d。观察记载和描述、拍照可培养细菌菌落特征,菌落分别计数,并用灭菌的牙签逐个单菌落轻轻挑取,接种在装有液体培养液的离心管,在26℃条件下培养。

1.4 可培养微生物的分子鉴定

用细菌的16S rDNA通用引物对分离后的菌液进行扩增,反映16S rDNA序列的V₃变异区域上游引物(27F):5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'(20-mer)和下游引物(1492R):5'-TAC CTT GTT ACA ACT T-3'(16-mer)。PCR扩增反应体系为,10×PCR buffer (without MgCl₂) 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹) 2.5 μL,上游引物(10 pmol·L⁻¹) 1.0 μL,下游引物(10 pmol·L⁻¹) 1.0 μL, dNTPs (每种10 mmol·L⁻¹) 0.5 μL, Tag 酶(5 U·μL⁻¹) 0.3 μL,用ddH₂O补足25 μL。PCR反应条件为:变性条件

表1 菌塘土壤样品信息

Table 1 Information of soil samples in shiros

土壤编号	采集地	采集时间	海拔(m)	植被类型
JT ₁	剑川县石宝山石龙村	2010-08-11	2580	云南松、栎、野胡椒
JT ₂	洱源县乔后乡河西村	2010-08-12	2140	云南松、栎、野胡椒
JT ₃	德钦县霞若村	2010-09-19	2866	高山松、杜鹃
JT ₄	维西县塔城社塔城村	2010-09-20	2119	云南松、栎、被毛小杜鹃
JT ₅	剑川县庆华村	2011-09-20	2900	云南松、杜鹃
JT ₆	楚雄南华县五街镇芹菜塘村	2012-09-20	2450	云南松、杜鹃

为 94 °C 3 min; 94 °C 40 s, 52 °C 50 s 和 72 °C 2 min, 35 个循环; 最后在 72 °C 下延伸 10 min。将经过琼脂糖凝胶电泳检测在 1.6 kb 处有条带的 PCR 扩增产物送到上海生工生物工程公司进行双向测序, 所得序列用 Contig Express 完成序列的拼接和编辑, 序列通过 NCBI 上的 Blast 功能, 与序列比对结果共同构建系统发育树, 从而达到鉴定菌落的目的。用 BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999) 对序列进行比对和自动排序, 并进行必要的手工排序调整并保存为 fasta 格式, 然后用 MEGA 4.0 软件转存为 meg 格式, 用 MEGA 4.0 软件中的 Neighbor-joining 方法按照 JC (Jukes-cantor) 单参数距离模型来估算遗传距离并进行系统进化分析 (Saitou *et al.*, 1987; Tamura *et al.*, 2007) 构建系统进化树, 迭代运算 1000 次, 并选择 2 条嗜火液菌 *Aquifex pyrophilus* (M83548) 和 (NR029172) 的 16S rDNA 序列作为外类群。

1.5 数据分析

用 SPSS 13.0 进行单因子方差分析 (one-way ANOVA) 和 Duncan 描述法分析数据, 差异显著性 ($\alpha = 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 松口蘑菌塘可培养细菌菌落形态特征和数量

根据细菌选择菌落数在 20 ~ 200 的培养皿原则进行计数, 细菌培养后最终确定的培养浓度为 10^{-5} 。由表 2 可知, 细菌的菌落直径为 0.05 ~ 1.4 cm, 形状多数为圆形、扁平或突起, 边缘光滑或波形, 颜色为中间白边缘粉、全粉、全白或乳白色, 表面粗糙或光滑, 不透明。松口蘑菌塘细菌菌落的变化范围为 $20.0 \times 10^5 \sim 127.0 \times 10^5 \cdot \text{g}^{-1}$ 鲜土, 洱源县乔后乡、剑川县石宝山和楚雄南华县的细菌菌落数显著高于德钦县霞若村 ($P < 0.05$); 德钦县霞若村细菌菌落数显著高于维西县塔城社和剑川县庆华村 ($P < 0.05$)。

2.2 松口蘑菌塘可培养细菌的种类和数量

通过对不同松口蘑菌塘可培养细菌的 16S rDNA 全序列用引物 27F/1492R 扩增, 共获得了 178 条细菌的碱基序列, 通过 NCBI 上的 Blast 比对, 具体信息如下。

由表 3 可知, 剑川石宝山松口蘑菌塘获得可培养细菌序列 36 条经分析分别属于 3 个门, 9 个属, 共 14 个 OTUs。其中变形菌门的 *Burkholderia phenazinium* 是剑川石宝山松口蘑菌塘可培养细菌的优势类群。洱源县乔后乡松口蘑菌塘共获得可培养细菌共 18 条序列经分析, 分别属于 2 个门, 3 个属, 共 7 个 OTUs, 其中厚壁菌门的 *Bacillus cereus* 是洱源县乔后乡松口蘑菌塘可培养细菌的优势类群。德钦县霞若松口蘑菌塘共获得可培养细菌序列 62 条经分析分别属于 3 个门, 8 个属, 共 13 个 OTUs。其中拟杆菌门的 *Chryseobacterium soldanellicola* 是德钦县霞若松口蘑菌塘可培养细菌的优势类群。维西县塔城松口蘑菌塘共获得可培养细菌序列 19 条经分析分别属于 3 个门, 3 个属, 共 8 个 OTUs, 其中厚壁菌门的 *Bacillus cereus* 菌是维西县塔城松口蘑菌塘可培养细菌的优势类群。剑川庆华村松口蘑菌塘共获得可培养细菌序列 16 条经分析分别属于 3 个门, 4 个属, 共 8 个 OTUs, 其中变形菌门的 *Burkholderia glathei* 是剑川县庆华松口蘑菌塘可培养细菌的优势类群。楚雄南华县松口蘑菌塘共获得可培养细菌序列 27 条经分析分别属于 3 个门, 9 个属, 共 13 个 OTUs, 其中变形菌门 Proteobacteria 是楚雄南华松口蘑菌塘可培养细菌的优势类群。通过对 6 个菌塘 178 个细菌隶属属的情况进行分析得知, 厚壁菌门的芽孢杆菌属 *Bacillus* 占 24.72%, 变形菌门的伯克氏菌属 *Burkholderia* 占 21.34% 和假单胞菌属 *Pseudomonas* 占 11.24% 及拟杆菌门的金黄杆菌属 *Chryseobacterium* 占 10.67%。说明厚壁菌门的 *Bacillus* 和变形菌门的

表 2 不同地区松口蘑菌塘可培养细菌菌落形态特征和数量

Table 2 Colony morphology and number of culturable bacteria in different shiros of matsutake

土样编号	菌落直径 (cm)	形状	边缘	颜色	表面	透明度	细菌数量 ($10^5 \cdot \text{g}^{-1}$ 鲜土)
JT ₁	0.3 ~ 1.0	圆形、扁平或突起	光滑或波形	中间白边缘粉或全粉或全白	粗糙或光滑	不透明	107.0 a
JT ₂	0.2 ~ 1.1	圆形、扁平或突起	光滑或波形	中间白边缘粉或全粉或全白或灰白	光滑或粗糙	不透明	127.0 a
JT ₃	0.2 ~ 1.0	圆形或放射状、扁平或突起	光滑或波形	全粉或全白或灰白	粗糙	不透明	79.3 b
JT ₄	0.6 ~ 1.4	圆形或菜花样、扁平	波形	白色	粗糙	不透明	26.0 c
JT ₅	0.05 ~ 0.3	圆形、扁平	光滑	乳白色	光滑	不透明	20.0 c
JT ₆	0.05 ~ 0.6	圆形、扁平	光滑	乳白色	光滑	不透明	100.7 a

同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

表 3 不同菌塘土壤可培养细菌信息、数量及其 OTUs

Table 3 Information, bacterial number and OTUs of culturable bacteria in different shiros

参考物种(登录号)	JT ₁	JT ₂	JT ₃	JT ₄	JT ₅	JT ₆
<i>Agrobacterium radiobacter</i> (NR074504)	0	0	0	0	0	1
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> (FR828329)	0	0	0	0	0	1
<i>Bacillus cereus</i> (KF475854)	2	6	6	4	3	2
<i>Bacillus thuringiensis</i> (KF527200)	5	2	4	6	1	2
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (KF475870)	0	1	0	0	0	0
<i>Brachybacterium nesterenkoi</i> (NR026270)	0	0	0	0	1	0
<i>Burkholderia sediminicola</i> (JX010976)	0	0	2	1	0	3
<i>Burkholderia fungorum</i> (HM113360)	1	5	0	0	3	0
<i>Burkholderia phenazinium</i> (AY154372)	8	2	0	2	0	0
<i>Burkholderia bryophila</i> (NR042593)	0	0	0	3	0	0
<i>Burkholderia glathei</i> (HQ851074)	0	0	0	1	5	3
<i>Burkholderia phytofirmans</i> (NR102845)	0	0	0	1	0	0
<i>Burkholderia sordidicola</i> (DQ256491)	0	0	0	0	1	0
<i>Burkholderia</i> sp. (DQ777734)	1	0	0	0	1	0
<i>Dyella</i> sp. (JF309147)	0	0	0	0	0	1
<i>Chryseobacterium soldanellicola</i> (AB681270)	2	0	11	0	0	0
<i>Chryseobacterium</i> sp. (JQ977154. 1)	0	0	4	0	0	0
<i>Chryseobacterium jejuense</i> (AB682422)	2	0	0	0	0	0
<i>Cupriavidus basilensis</i> (GU171379)	0	0	1	0	0	0
<i>Ewingella americana</i> (DQ383802)	5	0	0	0	0	0
<i>Herbaspirillum rhizosphaerae</i> (NR043621)	2	0	0	0	0	1
<i>Janthinobacterium agaricidamnorum</i> (AB681849)	0	0	7	0	0	0
<i>Inquilinus ginsengisoli</i> (GU201848)	0	0	0	0	0	2
<i>Kocuria rosea</i> (JN192402)	0	0	0	1	0	0
<i>Luteibacter rhizovicinus</i> (NR042197)	0	0	0	0	0	3
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (GQ279292)	0	0	0	0	0	3
<i>Luteibacter</i> sp. (FJ786052)	1	1	0	0	0	0
<i>Novosphingobium rosa</i> (AB680810)	3	0	5	0	0	0
<i>Pandoraea norimbergensis</i> (AY268174. 1)	0	0	6	0	0	0
<i>Pandoraea pnomenusa</i> (AY268168)	1	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas auricularis</i> (AB681727. 1)	0	0	1	0	0	0
<i>Pseudomonas tolaasii</i> (AB681971)	2	0	3	0	0	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (KF424274)	1	0	6	0	0	0
<i>Pseudomonas koreensis</i> (KF424274. 1)	0	0	6	0	0	0
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (KC660146)	0	1	0	0	0	0
<i>Streptomyces anulatus</i> (KC814714)	0	0	0	0	1	0
<i>Streptomyces atratus</i> (EU570665)	0	0	0	0	0	3
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> (EU593689)	0	0	0	0	0	1
分离总数	36	18	62	19	16	27
OTUs	14	7	13	8	8	13
厚壁菌门 Firmicutes	7	9	10	10	4	7
变形菌门 Proteobacteria	25	9	37	8	10	15
拟杆菌门 Bacteroidetes	4	0	15	0	0	0
放线菌门 Actinobacteria	0	0	0	1	2	5

Burkholderia 是松口蘑菌塘土壤的优势类群, 而变形菌门的 *Pseudomonas* 及拟杆菌门的 *Chryseobacterium* 是次优势类群, 其他属的可培养细菌在松口蘑菌塘土壤分布较少。

基于 6 个松口蘑菌塘可培养细菌 16S rDNA 序列构建的最大简约数表明(图 1), 以 2 条 *Aq. py-*

rophilus 序列为外类群, JT 代号的样品为松口蘑菌塘可培养细菌 38 个 OTUs 的代表样品, 同时在 NCBI 下载了相应 DNA 序列 38 条, 共 76 条序列很好的聚在了 4 个 Clades 里。Clade 1 属于变形菌门 Proteobacteria, 其中包含了 26 条下载的序列和 26 条本次实验获得的序列。Clade 2 属于厚壁菌门 Firmicutes, 其中包

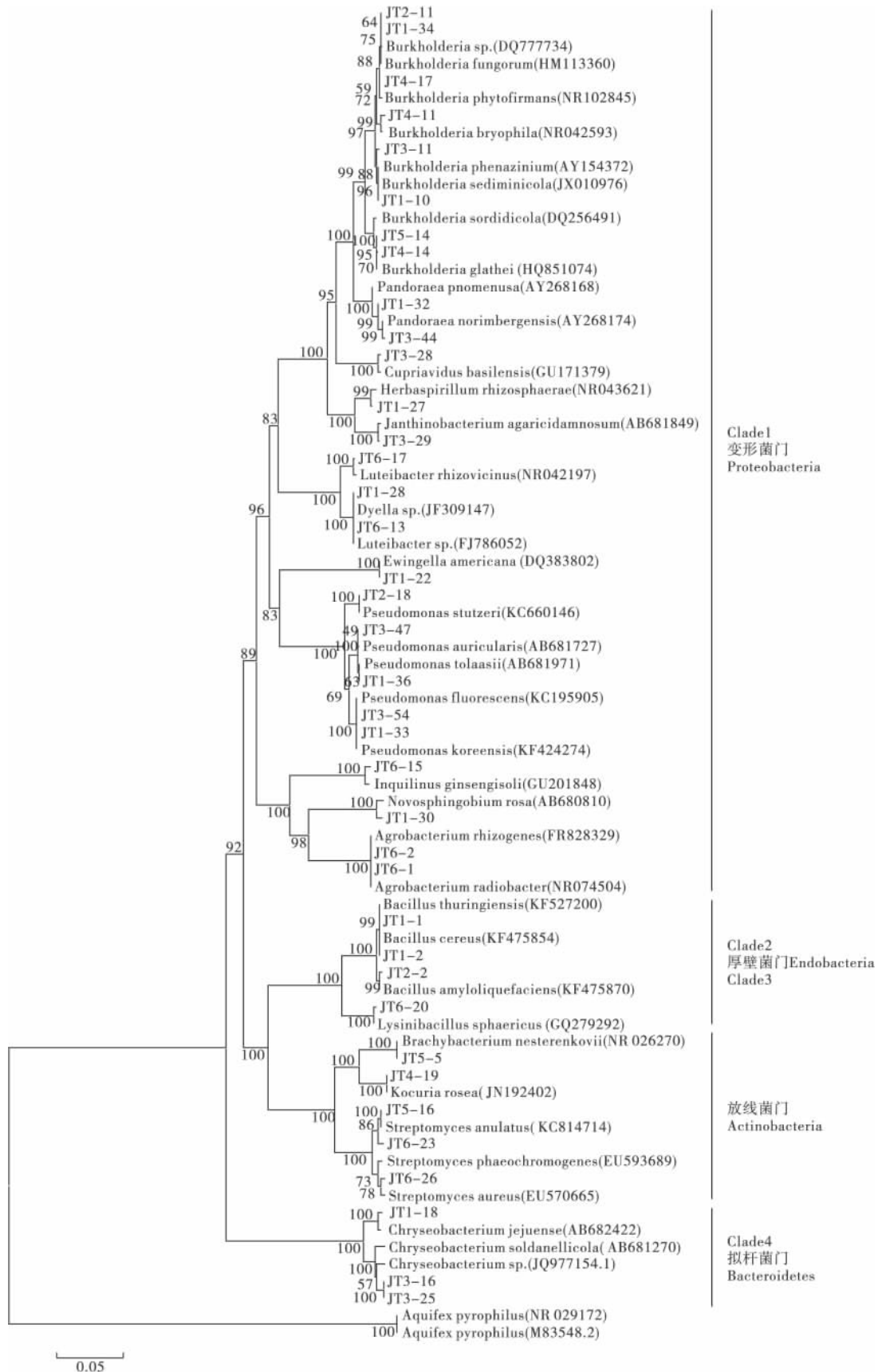


图 1 基于 6 个松口蘑菌塘可培养细菌的 16S rDNA 构建的 Neighbor-joining 进化树

Fig.1 Neighbor-joining tree of culturable bacteria of six shiros based on 16S rDNA gene partial sequences

含了4条下载的序列和4条本次实验获得的序列。Clade 3属于放线菌门 Actinobacteria,其中包含了4条下载的序列和4条本次实验获得的序列。Clade 4属于拟杆菌门 Bacteroidetes 的序列,其中包含了3条下载的序列和3条本次实验获得的序列。

3 讨 论

植物的根与根际微生物之间相互影响。植物是影响根际微生物组成的主要因素,植物根的分泌物会对其周围微生物进行选择并刺激它们的生长(Rovira,1965;李娇等,2014)。真菌能否顺利的侵染植物的根并形成菌根,不仅取决于其周围的非生物因素,如土壤pH值、肥力、湿度和温度,也取决于一些生物因素,如土壤微生物(Slankis,1974)。菌根对其根际微生物有选择和调节的作用,根际中的有些微生物也能够促进菌根的形成和改变菌根菌的基因表达(Becker et al.,1999;Poole et al.,2001)。以往的研究表明,松口蘑菌塘土壤微生物的种类较少,而本研究对云南省6份松口蘑菌塘的178份可培养细菌16S rDNA的序列进行分析,结果表明,本实验分离出的低GC革兰氏阳性细菌厚壁菌门的可培养细菌大多数属于芽孢杆菌属的*B. cereus*和*B. thuringiensis*。而Kataoka等(2012)采用平板稀释方法也分离到了该菌株。研究表明,从波氏块菌中分离到的芽孢杆菌属(*Bacillus*)表现出显著的几丁质化合物降解能力,从而促进孢子的产生和子实体的形成(Barbieri et al.,2000)。另外,从蜡蘑和须腹菌的菌根和菌根根际中分离到的芽孢杆菌亦能促进真菌的生长及其在宿主根部的定殖,还能促进后期菌根的建立和功能关系的运作(Garbaye et al.,1990;Garbaye et al.,1992)。*Bacillus*在其他外生菌根中也被检测到,而且还观察到其有固氮活性(Rangel-Castro et al.,2002)。而芽孢杆菌属对松口蘑菌根的形成及孢子的产生和子实体的形成至今还不清楚,有待进一步研究。同时,本研究也分离到了大量伯克氏菌属的*B. phenazinium*、*B. sediminicola*、*B. bryophila*、*B. fungorum*、*B. glathei*和*B. caledonica*。以往研究发现,有些真菌如小孢根霉菌(*Rhizopus microspores*)的细胞内生活着其共生细菌,现在发现这类共生细菌多数是伯克氏菌(*Burkholderia*)。这类真菌一般需要共生细菌的存在,才能生存下去或者具有某种重要功能。而Kataoka等(2012)采用平

板稀释方法也分离到了细菌*B. phenazinium*、*B. glathei*及大部分的*Burkholderia* sp.。但伯克氏菌(*Burkholderia*)对松口蘑(*T. matsutake*)菌塘形成作用至今还不清楚,有待进一步研究。同时本实验也分离出了假单胞菌属(*Pseudomonas*),在对波氏块菌的研究中,这些功能被认为能够刺激波氏块菌孢子的形成和菌丝的生长,而且还能促进子实体的形态建成(Bedini et al.,1999;Barbieri et al.,2000,2007;Sbrana et al.,2002)。在其他一些外生真菌中,如在双色蜡蘑的菌根中,鸡油菌(*Cantharellus cibarius*)的子实体中,均发现了假单胞菌的存在,且这些假单胞菌具有分解海藻糖的能力,以促进菌根及子实体的生长(Danell et al.,1993;Frey et al.,1997)。但假单胞菌属*Pseudomonas*对松口蘑(*T. matsutake*)菌塘内菌根的形成及子实体生长的作用至今还未见报道。拟杆菌门的金黄杆菌属*Chryseobacterium*作为一种新分离到可培养细菌,在此前真菌研究相关的细菌多样性中均未见报道。

本研究中,从楚雄州南华的松口蘑菌塘土壤内分离出根瘤菌*Agrobacterium radiobacter*和*A. rhizogenes*各1株,而其他菌塘均未见其分布,说明根瘤菌在松口蘑菌塘土壤分布极少。作为高GC含量的革兰氏阳性放线菌而言,在本实验所分离到的细菌中,仅有3.4%属于这个门链霉菌属*Streptomyces*和库克菌属*Kocuria*,Vaario等(2011)和Kataoka等(2012)在松口蘑菌塘中也检测到了*Streptomyces*和其他放线菌,但库克菌属*Kocuria*却是本研究中首次分离出的菌株。Vaario等(2011)在松口蘑菌塘微生物的研究中发现,放线菌与松口蘑的数量呈负相关,同时认为*Streptomyces*是菌塘土壤的优势类群,本研究中,放线菌也极少见,采用高氏1号培养基分离培养时,几次试验并未培养出放线菌,在牛肉膏蛋白胨培养基上却分离出*Streptomyces*属6株可培养细菌。Kataoka等(2012)同时还检测到了*Rhizobium*、*Paenibacillus*和*Arthrobacter*等细菌,而本试验却未分离到以上的菌株。Kataoka等(2012)研究松口蘑的主要共生树种是日本红松(*Pinus densiflora*),而本研究松口蘑的主要共生树种是云南松和高山松,可能是因为地上植被的不同导致了松口蘑菌塘可培养细菌出现了差异。

致 谢 英文摘要由新西兰皇家农业研究中心 Kim Richardson 研究员修改,在此表示感谢!

参考文献

- 傅伟杰, 许广波, 刘继生, 等. 1996. 长白山区松口蘑分布及生态研究. *食用菌学报*, **3**(3): 46–50.
- 李 娇, 蒋先敏, 尹华军, 等. 2014. 不同林龄云杉人工林的根系分泌物与土壤微生物. *应用生态学报*, **25**(2): 325–332.
- 刘培贵, 袁明生, 王向华, 等. 1999. 松茸群生物资源及其合理利用与有效保护. *自然资源学报*, **14**(3): 245–252.
- 魏铁铮. 2001. 松口蘑纯培养及其发生地土壤微生态研究(硕士学位论文). 吉林延吉: 延边大学.
- 杨民和, 杨新美, 陈立国. 1997. 松茸与宿主根际微生物相互关系的研究. *江西农业大学学报*, **14**(4): 76–79.
- 张 俊. 2010. 四川省雅江县松茸生长地土壤微生物多样性研究(硕士学位论文). 成都: 四川农业大学.
- Barbieri E, Guidi C, Bertaux J, et al. 2007. Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation. *Environmental Microbiology*, **9**: 2234–2246.
- Barbieri E, Potenza L, Rossi I, et al. 2000. Phylogenetic characterisation and in situ detection of a Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides phylogroup bacterium in *Tuber borchii* Vittad. ectomycorrhizal mycelium. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 5035–5042.
- Becker DM, Bagley ST, Podila GK. 1999. Effects of mycorrhizal-associated *Streptomyces* on growth of *Laccaria bicolor*, *Cenococcum geophilum*, and *Armillaria* species and on gene expression in *Laccaria bicolor*. *Mycologia*, **91**: 33–40.
- Bedini S, Bagnoli G, Sbrana C, et al. 1999. Pseudomonads isolated from within fruit bodies of *T. borchii* are capable of producing biological control or phytostimulatory compounds in pure culture. *Symbiosis*, **26**: 223–236.
- Danell E, Alström S, Ternström A. 1993. Pseudomonas fluorescens in association with fruit bodies of the ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycological Research*, **97**: 1148–1152.
- Duponnois R, Garbaye J. 1991. Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir – *Laccaria laccata* symbiosis: Effects in aseptic and in glasshouse conditions. *Annals of Forest Science*, **48**: 239–251.
- Frey P, Frey-Klett P, Garbaye J, et al. 1997. Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas fir – *Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 1852–1860.
- Garbaye J, Duponnois R, Wahl JL. 1990. The bacteria associated with *Laccaria laccata* ectomycorrhizas or sporocarps: Effect on symbiosis establishment on Douglas fir. *Symbiosis*, **9**: 267–273.
- Garbaye J, Duponnois R. 1992. Specificity and function of mycorrhization helper bacteria (MHB) associated with the *Pseudotsuga menziesii* – *Laccaria laccata* symbiosis. *Symbiosis*, **14**: 335–344.
- Hall TA. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95–98.
- Kataoka R, Siddiqui ZA, Kikuchi J, et al. 2012. Detecting nonculturable bacteria in the active mycorrhizal zone of the pine mushroom *Tricholoma matsutake*. *Journal of Microbiology*, **50**: 199–206.
- Masui K. 1927. A study of the ectotrophic mycorrhizas of woody plants. *Memoirs of the College of Science, Kyoto Imperial University, Series B: Biology*, **3**: 149–279.
- Ohara H, Hamada H. 1967. Disappearance of bacteria from the zone of active mycorrhizas in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Singer. *Nature*, **213**: 528–529.
- Poole EJ, Bending GD, Whipps JM, et al. 2001. Bacteria associated with *Pinus sylvestris* – *Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation in vitro. *New Phytologist*, **151**: 743–751.
- Rangel-Castro JI, Danell E, Pfeffer PE. 2002. A ¹³C NMR study of exudation and storage of carbohydrates and amino acids in the ectomycorrhizal edible mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycologia*, **94**: 190–199.
- Rovira AD. 1965. Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, **19**: 241–266.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**: 406–425.
- Sbrana C, Agnolucci M, Bedini S, et al. 2002. Diversity of culturable bacterial populations associated to *Tuber borchii* ectomycorrhizas and their activity on *T. borchii* mycelial growth. *FEMS Microbiology Letters*, **211**: 195–201.
- Slankis V. 1974. Soil factors influencing formation of mycorrhizae. *Annual Review of Phytopathology*, **12**: 437–457.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1596–1599.
- Vaario LM, Hannu FH, Peter SP, et al. 2011. *Tricholoma matsutake* dominates diverse microbial communities in different forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 8523–8531.

作者简介 姜 华,女,1976年生,主要从事土壤微生物多样性研究。E-mail: jianghua15@163.com
责任编辑 魏中青