

doi:10.11937/bfyy.20171417

## 硬叶兜兰菌根真菌的分类鉴定

田 凡<sup>1</sup>, 廖小锋<sup>2</sup>, 王莲辉<sup>1</sup>, 朱国胜<sup>3</sup>, 桂 阳<sup>3</sup>, 白新祥<sup>4</sup>

(1. 贵州省林业科学研究院, 贵州 贵阳 550005; 2. 贵州科学院 山地资源研究所, 贵州 贵阳 550001;

3. 贵州农业科学院 现代中药材研究所, 贵州 贵阳 550006; 4. 贵州大学 林学院, 贵州 贵阳 550025)

**摘 要:**以硬叶兜兰菌根真菌为研究对象, 采用传统形态学结合 rDNA-ITS 区的 PCR 扩增、测序, 采用 NCBI BLAST 在线软件对 ITS 区序列进行了分析, 对硬叶兜兰菌根真菌进行分类鉴定。结果表明: 对 29 株菌根真菌进行 rDNA-ITS 序列分析共鉴定出 23 个属, 为瘤菌根菌属、胶膜菌属、丝核菌属、镰刀菌属、栓菌属、附毛菌属、拟迷孔菌属、小脆柄菇属、拟层孔菌属、毛壳属、侧耳属、轮枝菌属、弯孢聚壳属等, 分离菌株最多的是瘤菌根菌属和胶膜菌属, 分别占分离总数的 16% 和 19%; 鉴定到 1 个科, 为胶膜菌科; 12 株优势菌根具有不同的宏观和微观形态, 其均未有分生孢子, 菌丝分枝点附近形成一个隔及细胞双核, 11 株菌株具念珠状细胞, 大多数具有香味。

**关键词:**硬叶兜兰; 菌根真菌; 丝核菌; 序列分析; 鉴定

**中图分类号:**S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)24-0116-07

1840 年, LINK<sup>[1]</sup> 首先发现兰科 (Orchidaceae) 植物根内有内生真菌 (Endophytic fungi) 生长, 以后不断有真菌与兰科植物根系共生的报道。自 20 世纪初 BERNARD 和 BURGEFF 真正揭开兰科菌根之谜后, 有关菌根真菌的研究得到广泛开展。国内外研究表明, 兰科植物的菌根真菌主要是丝核菌类真菌。最早报道的是 BERNARD<sup>[2]</sup> 从兰科植物中分离获得 3 种共生丝核菌, 分别为 *Rhizoctonia mucoroides*、*R. repens* 和 *R. lanugi-*

*nosa*。然而, 兰科菌根真菌分类研究的一个重大突破是 MOORE<sup>[3]</sup> 在兰科广义的共生丝核菌属基础上增加了 3 个新属, 即角菌根菌属 (*Ceratohiza*)、瘤菌根菌属 (*Epulorhiza*) 和念珠菌根菌属 (*Moniliopsis*), 对应的有性世代分别是: 角担菌属 (*Ceratobasidium*)、胶膜菌属 (*Tulasnella*) 和蜡壳菌属 (*Sebacina*)、瓜亡革菌属 (*Thanatephorus*)。随着兰科植物菌根真菌研究的发展, 还有大量的无性型为丝核菌属真菌的有性种未被鉴定, 这表明丝核菌的分类鉴定还有很多问题需要解决<sup>[4]</sup>。

硬叶兜兰 (*Paphiopedilum micranthum*) 花奇色美, 十分珍贵, 属“野生动植物濒危物种国际贸易公约” (CITES) 附录 I 的保护对象。因贵州特殊的地理环境, 为硬叶兜兰的生长提供了有利条件, 其主要分布于贵州东北部至西南部<sup>[5]</sup>。但由于过度采集及生境破坏等原因, 近十几年来野生硬叶兜兰的数量急剧减少, 分布区逐渐萎缩, 已经濒临灭绝。硬叶兜兰具有极高的观赏和生物学研究价值, 对于开展其植物系统发育研究具有重要的学术意义。

**第一作者简介:**田凡 (1985-), 女, 硕士, 工程师, 现主要从事植物生物技术等研究工作。E-mail: tianfan850507@126.com.

**责任作者:**白新祥 (1979-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事观赏植物保育等研究工作。E-mail: xinxiangbai@126.com.

**基金项目:**贵州省农业攻关资助项目 (黔科合支撑 [2017] 2524); 贵州省林业厅青年人才基金资助项目 (黔林科合 J [2013] 2 号); 贵州乡土珍稀花卉研发团队服务企业行动计划资助项目 (黔科合平台人才 [2016] 5711); 贵州省社会发展资助项目 (黔科合 SY 字 [2015] 3019 号)。

**收稿日期:**2017-07-25

近年来,国内外相关学者采用形态与分子相结合的方法对兰科植物内生菌分类鉴定进行了研究。rDNA-ITS 序列分析与传统形态学相结合的方法,已被成功应用于独花兰属、兜兰属和兰属等植物菌根真菌的分类鉴定中<sup>[6-12]</sup>。该研究采用传统形态学与 rDNA-ITS 技术相结合的方法对分离自野生硬叶兜兰的菌根真菌进行分类鉴定,对硬叶兜兰内生菌的认识、研究和开发应用具有现实意义,可为其菌根化育苗提供基础数据和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试真菌菌株是从中国贵州省德江县分布的野生硬叶兜兰根中分离获得的内生菌。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 菌落培养特征及观察

将菌株接到 BDPDA 培养基平板上,24℃恒温培养,每天观察、记录各菌株的菌落特征,包括菌落形状、大小、色泽、生长速度及是否产生色素和香味等情况。

#### 1.2.2 菌株显微结构观察及菌丝细胞核染色计数

将菌丝块接种于 BDPDA 标准培养基平板的中间,用小镊子夹起一块无菌的盖玻片,在距接种点一定距离处以 45°斜插入培养基中,不要插入培养基太深,让菌丝爬到盖玻片约 2/5 时,再用小镊子将盖玻片取出,自然干燥后,将盖玻片转移到干净的滴加有染色液或蒸馏水的载玻片上,显微镜下观察产孢结构等特征。取 BDPDA 培养基上生长旺盛的菌丝,以番红 T-KOH 和考马斯亮蓝染色液染色,显微镜下进行细胞核计数。

#### 1.2.3 菌株生长速度的测定及生长速度曲线的绘制

利用直径 0.5 cm 的打孔器打取菌片,转接至 BDPAD 标准培养基,每个菌株 3 次重复,记录接种时间,然后以菌片中心为圆点,向 8 个方向各画一条线,在每条线与菌片的交点作上标记,24℃恒温培养。第 2 天开始观察,在每条线上标记对应的菌丝生长点,注明时间,然后选择稳定生长的 2~3 个标记,用此区间的长度除以时间(h)计算稳定的生长速度,3 次重复,取平均值即为该菌株

在标准培养基上的生长速度<sup>[13]</sup>。每隔 1~2 d 测量并记录菌落在 8 个方向上的生长直径,以培养时间和菌落直径分别为横坐标和纵坐标,作菌株的生长速度曲线。

#### 1.2.4 菌株 DNA 提取、引物合成及 PCR 扩增

采用 CTAB 改良法提取供试菌株 DNA。引物采用通用引物 ITS1 和 ITS4,由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。正向引物 ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',反向引物 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTAATGATATGC-3'。PCR 反应体积为 25  $\mu$ L,模板小于 1  $\mu$ g,10  $\mu$ M 的正向引物 ITS1 1  $\mu$ L,10  $\mu$ M 的反向引物 ITS4 1  $\mu$ L,10 mM dNTPs Mix 0.5  $\mu$ L,10  $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu$ L,2 U *Taq* DNA Polymerase 0.5  $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 补足 25  $\mu$ L。PCR 反应程序:循环前 94℃变性 3 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 次循环;72℃延伸 5 min。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,在 SYNGENE GBOX 凝胶成像系统中拍照。

#### 1.2.5 DNA 测序

对 PCR 产物进行测序(上海生工生物工程技术服务有限公司)。利用 GenBank 通过 BLAST 对测序结果进行比对,鉴定菌根真菌种类。

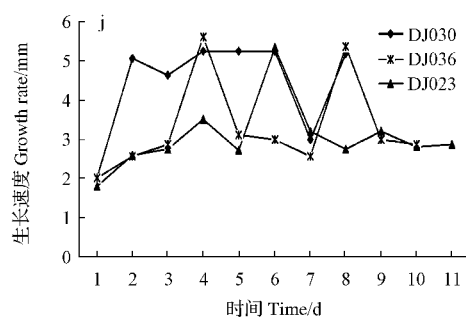
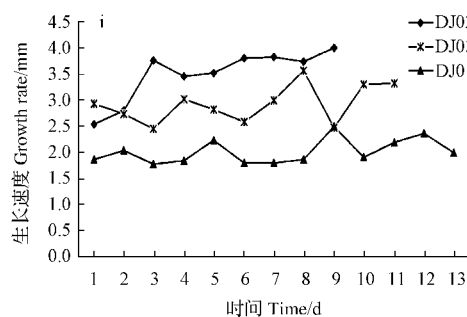
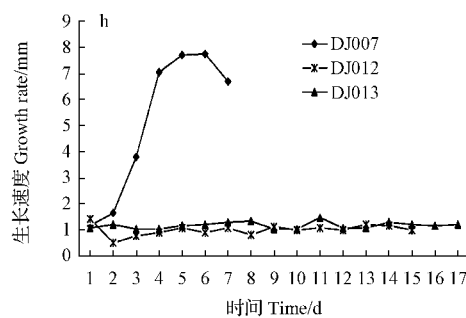
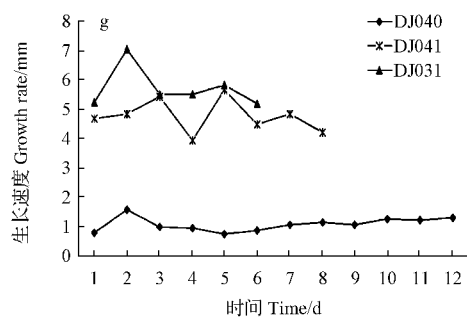
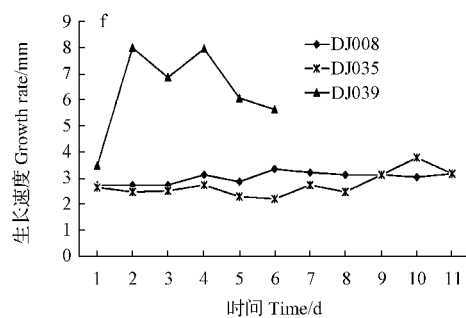
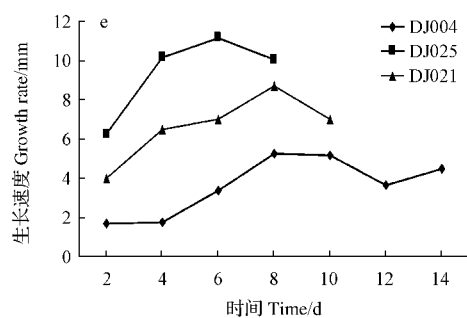
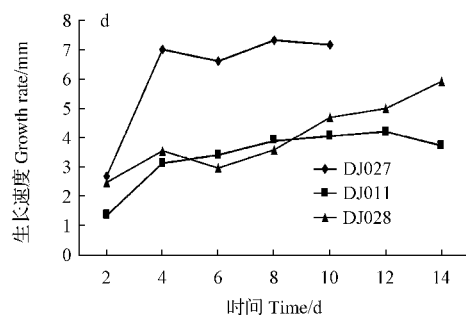
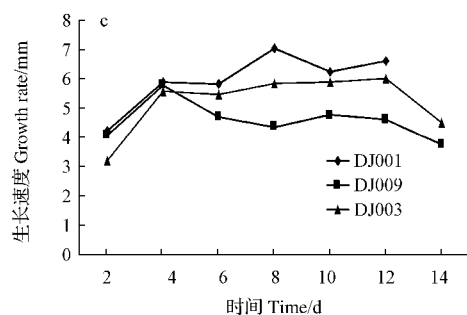
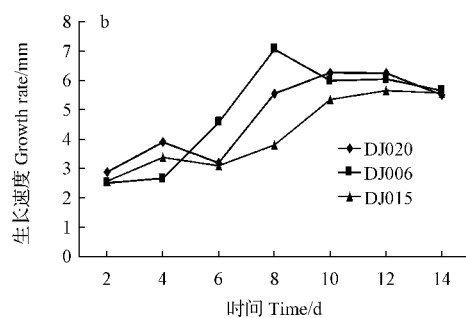
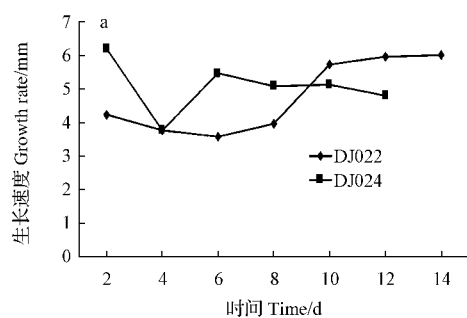
### 1.3 数据分析

采用 Excel 2007 软件对试验数据进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株生长速度及生长速度曲线

真菌的生长速度是真菌的重要生物学特性之一。对试验分离出的 41 株菌根真菌进行生长速率测定,结果见图 1。可知,不同的菌种在相同的培养基及培养条件下,具有不同的生长速度,并且各菌株在不同的时间段里,生长速度也不稳定,并未随着培养时间的延长而匀速增长,可能与菌种自身生长机制和培养条件的差异性有关。其中菌株 DJYYDL012、DJYYDL013 和 DJYYDL040 生长极其缓慢,DJYYDL001 和 DJYYDL002 具有大致相同的生长速度,且生长速度过快。通过生长速度的初步筛选,将 41 株菌根真菌筛选为 29 株具有不同生长速度的菌根真菌。



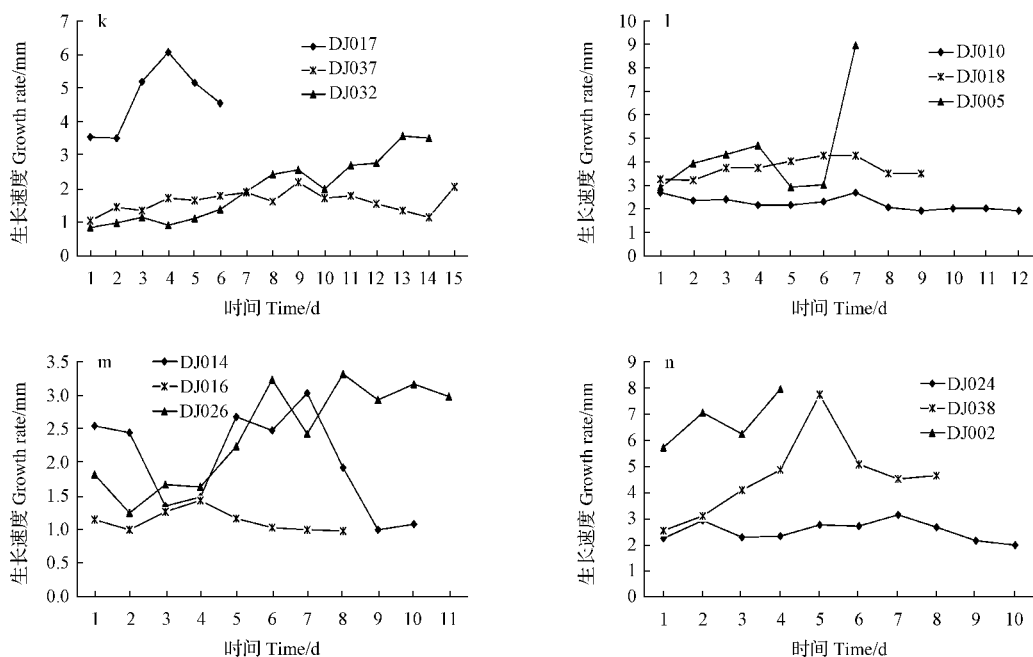


图 1 菌株生长速度曲线

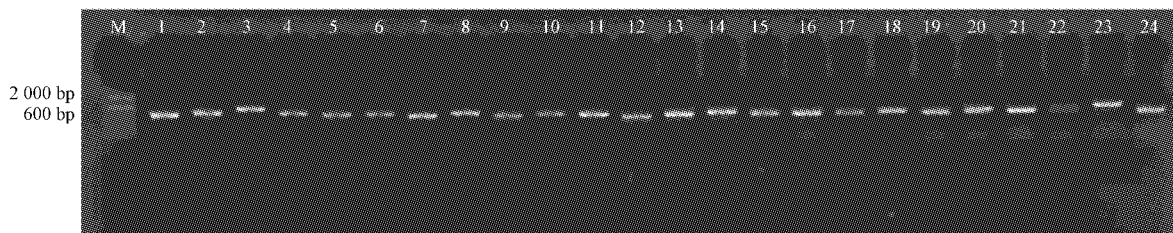
Fig. 1 Growth rate curve of strains

## 2.2 菌株 rDNA-ITS 区段的 PCR 扩增

由图 2 可知,利用引物 ITS1 和 ITS4 扩增 DJYYDL 菌株的 rDNA-ITS 区段,获得约 600 bp 的产物(图 2)。

## 2.3 菌株 rDNA-ITS 区段测序结果

对 DJYYDL 菌株的 PCR 产物进行测序,经测序后获得 29 条不同的 rDNA 序列。以 DJYYDL020 菌株为例,测序结果见表 1。



注:M, DNA Marker; 1~24, 菌株 DNA。

Note: M, DNA Marker; 1-24, DNA of strain.

图 2 菌株 rDNA-ITS 区段的 PCR 产物

Fig. 2 PCR production of rDNA-ITS section

## 2.4 菌株 rDNA-ITS 序列比对结果

由表 2 可知,29 株菌株类型具有 95% 以上的相似序列,其中确定至种名的有 9 种,仅确定至属名的有 23 种,不能确定种属的有 6 种。分离菌株最多的是瘤菌根菌属和胶膜菌属,分别占分离总数的 16% 和 19%。通过分子鉴定,所分离的菌株为瘤菌根菌属(*Epulorhiza*)、胶膜菌属(*Tulas-*

*nella*)、丝核菌属(*Rhizoctonia*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、栓菌属(*Trametes*)、附毛菌属(*Trichaptum*)、拟迷孔菌属(*Daedaleopsis*)、小脆柄菇属(*Psathyrella*)、拟层孔菌属(*Fomitopsis*)、毛壳属(*Chaetomium*)、侧耳属(*Pleurotus*)、轮枝菌属(*Lecanicillium*)、弯孢聚壳属(*Eutypella*)、*Peniophorella*。

表 1 DJYYDL020 菌株序列  
Table 1 Region sequences of DJYYDL020 strain

序号 No.	rDNA-ITS 序列 rDNA-ITS sequences					
1	ggtttccgta	ggigaacctg	cggaaggatc	atagtaatcg	tctttgacgt	tacgtttccg
61	ttcgtctcgc	ggacgttaag	gcgctctggt	cgaggataaa	cgacccctct	gaccgaggta
121	aagccgtctc	cctgtgttac	ctctttgccg	aggcacacgt	taaagatcgt	tccggttgt
181	gagttctaac	cagttgtaac	acttttacia	ccggtagcgc	tggatccctt	ggcacgtcat
241	tcgatgaaga	ccgttgcaaa	ttcgataaaa	gtgatgtgat	gcgcaagtc	accactata
301	cgtgaatcat	cgagttgttg	aacgcaccgc	accgcgcct	aacccggctg	cggtatgccc
361	ctttgagcgt	cattgtatcc	cttcgggagt	cttttcgtta	agacccgagt	tcggagtctt
421	cggtcttcgg	atcgtgttct	ctcagatcgc	tcgcgccgat	cgccctgatg	gtcgtcttaa
481	tgccctaagcg	tggagtcctt	cggagccgaa	acgcgcttga	ccgggtgttg	agcccgcttc
541	accaagtccg	cagttctgayg	tggcggtact	acaacgcatg	acctcatggt	ggtaggacaa
601	cccgc					

表 2 BLAST 分析结果  
Table 2 Results of the BLAST analysis

菌株 Strain	ITS 区长度 ITS region length/bp	GenBank 登录号 GenBank accession number	种名、菌株或序列名称 Fungal strains or sequence name	相似度 Similarity degree/%	分值 Scores/分
DJ017	595	HQ891292	<i>Trametes hirsuta</i> strain SYBC-18	98	1 070
DJ013	608	HQ633048	<i>Epulorhiza</i> sp. cmU-STE 004	96	1 020
DJ004	899	EU484271	<i>Trichaptum abietinum</i>	97	1 256
DJ035	606	AY373281	<i>Tulasnella</i> sp. 140	98	1 066
DJ021	681	EU661889	<i>Daedaleopsis rubescens</i>	98	1 194
DJ011	679	EU520251	<i>Psathyrella candolleana</i>	97	1 171
DJ027	677	AB176575	Mycorrhizal basidiomycete of <i>Epipogium roseum</i>	99	1 206
DJ030	645	HQ248222	<i>Fomitopsis ostrei formis</i>	99	1 125
DJ016	575	EU686845	<i>Fungal endophyte</i>	98	955
DJ007	580	HM486432	<i>Eutypella</i> sp. 7-24	98	1 009
DJ009	536	HM365261	<i>Chaetomium bostrychodes</i>	98	953
DJ019	554	FJ613194	<i>Epulorhiza</i> sp. YK-2009	96	1 002
DJ023	610	AJ242904	<i>Rhizoctonia</i> sp. TC2	98	1 079
DJ032	908	EU484271	<i>Trichaptum abietinum</i>	96	1 260
DJ015	612	AY373281	<i>Tulasnella</i> sp. 140	97	1 079
DJ028	609	AY373288	<i>Tulasnella</i> sp. 238	98	1 081
DJ029	677	AB470847	<i>Psathyrella candolleana</i>	98	1 179
DJ002	602	HQ891292	<i>Trametes hirsuta</i>	99	1 088
DJ003	680	EU520251	<i>Psathyrella candolleana</i> isolate NW550	98	1 175
DJ025	630	EF174448	<i>Phlebiopsis gigantea</i>	98	1 020
DJ024	610	AY373287	<i>Tulasnella</i> sp. 233	98	1 062
DJ022	611	AY634122	Uncultured <i>Tulasnellaceae</i>	99	1 070
DJ010	567	AB378527	<i>Lecanicillium</i> sp. KYK00325	98	1 000
DJ005	662	AY854081	<i>Peniophorella praetermissa</i>	97	1 083
DJ014	614	EU909268	Uncultured <i>Tulasnella mycobiont</i> of <i>Aneura pinguis</i>	98	1 066
DJ006	653	EU424299	<i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	98	1 168
DJ040	985	AJ313448	<i>Epulorhiza</i> sp. Onv4. 2	96	1 006
DJ037	720	AJ313442	<i>Epulorhiza</i> sp. Am8	95	1 002
DJ020	612	EU909272	Uncultured <i>Tulasnella mycobiont</i> of <i>Riccardia multifida</i>	98	1 020

2.5 优势菌株菌落及显微结构特征

将分离最多的优势菌株进行形态鉴定,得到 12 株菌株的菌落及显微结构特征对比结果。参考 OGOSHI 确定的丝核菌概念,丝核菌类真菌主

要包括以下特征:细嫩菌丝隔的远侧端附件形成一个分枝;分枝处缢缩,并在分枝点附近形成一个隔;具有桶孔隔膜;不形成分生孢子、根状菌索和不具有锁状联合;具念珠状细胞<sup>[14]</sup>。由表 3 可

知,12 株优势菌株均未有分生孢子、菌丝分枝点附近形成一个隔和菌丝细胞双核,11 株菌具念珠状细胞,大多数具有香味,根据以上特征与朱国胜<sup>[13]</sup>的分类鉴定结果对比,11 株菌株确定为胶

膜菌科(Tulasnellaceae)的瘤菌根菌属和胶膜菌属,1 株为无孢科(Agonomycetaceae)的丝核菌属,其中瘤菌根菌属和胶膜菌属占所试验菌株比例分别为 33%和 50%。

表 3  
Table 3 12 株菌株的菌落及显微结构特征  
Colony and microstructure characteristics of 12 strains

菌株 Strain	菌落形态 Colony morphology	菌落颜色 Colony color	香味 Aroma	菌丝结构 Mycelial structure	分生孢子 Conidi- ophore	菌丝分枝点附近形成隔 Form a partition near a branching point of mycelium	菌丝细胞核 Hyphal nucleus
DJ013	菌丝绒绒状,边缘不整齐	乳白色	有	念珠状细胞椭圆形及短圆柱状	无	有	双核
DJ035	细绒状菌丝,具同心环,边缘不整齐	淡褐色	无	念珠状细胞长椭圆形	无	有	双核
DJ019	绒毛状菌丝,边缘不整齐	雪白色	有	无念珠状细胞	无	有	双核
DJ023	平滑较稀薄,具同心环,边缘整齐	深褐色	无	念珠状细胞长椭圆形	无	有	双核
DJ015	细绒状菌丝,边缘不规则	浅褐色	有	念珠状细胞椭圆形及短圆柱状	无	有	双核
DJ028	细绒状菌丝,不规则锯齿状	乳白色	有	念珠状细胞椭圆形或球形	无	有	双核
DJ024	细绒状菌丝,边缘不规则树枝状	浅褐色	有	念珠状细胞长椭圆形	无	有	双核
DJ022	表面光滑,边缘不规则	浅褐色	有	念珠状细胞长椭圆形	无	有	双核
DJ014	细绒状菌丝,边缘整齐或不规则锯齿状	浅褐色	有	念珠状细胞椭圆形及短圆柱状	无	有	双核
DJ040	菌丝绒绒状,边缘不整齐锯齿状	乳白色	有	念珠状细胞球形或少数椭圆形	无	有	双核
DJ037	绒白色菌丝,边缘不整齐	乳白色	有	念珠状细胞球形或椭圆形	无	有	双核
DJ020	细绒状菌丝,边缘不规则具树枝状	浅褐色	有	念珠状细胞椭圆形及短圆柱状	无	有	双核

3 结论与讨论

该研究结果发现,瘤菌根菌属和胶膜菌属为硬叶兜兰菌根的主要内生菌,这与 ATHIPUNY-AKOM<sup>[15]</sup>对兜兰属内生菌鉴定研究结果一致。LI 等<sup>[16]</sup>利用分子系统学方法,研究发现兜兰属菌根真菌都属于胶膜菌科(Tulasnellaceae)真菌。但该试验得出,胶膜菌科菌种只为硬叶兜兰的优势均菌种,具体分类还有待进一步研究。该研究结果得出硬叶兜兰内生菌分属于 15 个属,这里不排除分离时杂菌的存在,在以后的研究中如何高效准确分离硬叶兜兰内生菌,才是解决硬叶兜兰多样性与专一性问题的关键所在,而尚鲜见关于兰科植物菌根真菌多样性及专一性的基础性系统研究报道。

形态学方法在已被普遍认同的兰科植物内生菌丝核菌类真菌的进一步细化分属鉴定中具有较大的局限性,近年来国内外越来越多地将分子技术运用于兰科内生菌分类鉴定的研究<sup>[17-18]</sup>。该研究结果只能将大部分的菌株鉴定到属,说明 rDNA-ITS 序列分析也具有一定的局限性。一方面基因库中有关兰科菌根真菌序列的资料较少,因此采用分子手段进行鉴定也比较困

难;另一方面,在进行比对分析时,核酸序列数据库中较多的相似序列会给比对分析工作带来困难。随着 GenBank 的不断丰富,相似序列还会更多,最好再结合使用其它序列比对分析工具才可能使鉴定工作更加准确<sup>[19]</sup>。

参考文献

[1] LINK H F. Icones selectae anatomico-botanicae, Fasc. II. Ausgewählte Anatomisch botanische Abbildungen[M]. Berlin: Lüde-ritz, 1840.

[2] BERNARD N. Lager mination des orchidées[J]. Comptes Rendus de Académie des Sciences, 1903, 138: 483-485.

[3] MOORE R T. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi; *Ascorhitionia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen[J]. Nov, Moniliosis, and *Rhizoctonia*, Mycotaxon, 1987(29): 91-99.

[4] BARUCH S, LEE B, AKIRA O. Identification of *Rhizoctonia* species[M]. Brittonia: APS, 1991.

[5] 刘仲健, 陈心启, 陈利君, 等. 中国兜兰属植物[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 41-47.

[6] 李潞滨, 胡陶, 唐征. 我国部分兰属植物菌根真菌 rDNA-ITS 序列分析[J]. 林业科学, 2008, 44(2): 160-164.

[7] 罗玉容. 硬叶兜兰菌根真菌的观察、分离和鉴定[D]. 南京: 华南农业大学, 2008.

[8] 张兰, 武静宇, 李潞滨. 独花兰菌根真菌的分离及 rDNA-ITS 序列在其分类鉴定中的应用[J]. 生态科学, 2009, 28(3): 226-230.

- [9] 段春芳,李枝林,杨根华. 云南几种兰花菌根真菌的分离鉴定[J]. 西南农业学报, 2010, 23(3): 756-759.
- [10] SUREEPORN N, SAWITREE S, LEKA M. Isolation and identification of *Rhizoctonia*-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium*, and *Cymbidium*, collected in Chiang Rai and Chiang Mai Provinces of Thailand[J]. Mycorrhiza, 2010(20): 459-471.
- [11] 朱鑫敏,胡虹,李树云,等. 内生真菌与两种兜兰共培养过程中的相互作用[J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(2): 171-178.
- [12] 孙晓颖. 五种野生兜兰植物菌根真菌多样性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2014.
- [13] 朱国胜. 贵州特色药用兰科植物杜鹃兰和独蒜兰共生真菌研究与应用[D]. 南京: 华中农业大学, 2009.
- [14] OGOSHI A. Grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn and their perfect stages[J]. Plant Protec Res, 1975(8): 93-103.
- [15] ATHIPUNYAKOM P, MANOCH L, PILUEK C. Isolation and identification of mycorrhizal fungi from eleven terrestrial orchids[J]. Kasetsart Journal (Natural Science), 1988, 38: 216-228.
- [16] LI Y, YANG Z L, LI S Y, et al. Mycorrhizal specificity, preference, and plasticity of six slipper orchids from South Western China[J]. Mycorrhiza, 2010(20): 559-568.
- [17] KRISTIANSEN K A, TAYLOR D L. Identification of mycorrhizal fungi from single pelotons of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences[J]. Mol Ecol, 2001, 10(8): 2089-2093.
- [18] MCKENDRICK S L, LEAKE J R, TAYLOR D L. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. [J]. New Phytologist, 2002, 154(1): 233-247.
- [19] 燕用,李卫平,高雯洁. rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 58-61.

## Classification and Identification of Mycorrhizal Fungi of *Paphiopedilum micranthum*

TIAN Fan<sup>1</sup>, LIAO Xiaofeng<sup>2</sup>, WANG Lianhui<sup>1</sup>, ZHU Guosheng<sup>3</sup>, GUI Yang<sup>3</sup>, BAI Xinxiang<sup>4</sup>

(1. Guizhou Forestry Academy, Guiyang, Guizhou 550005; 2. Institute of Mountain Resources, Guizhou Academy of Sciences, Guiyang, Guizhou 550001; 3. Institute of Morden Chinese Medical Materials, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang, Guizhou 550006; 4. College of Forestry, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025)

**Abstract:** Classification and identification of mycorrhizal were associated with *Paphiopedilum micranthum*, the method of morphological was combined with the ITS gene fragments were PCR amplified and sequenced, the rDNA ITS regions were analyzed by means of the software of NCBI BLAST. The results showed that the 29 strains with different micro- and macro-morphological. Secondly, rDNA-ITS sequence analysis of 29 predo minant strains. The fungi were identified into 23 genus and 1 family, 23 strains belong to *Epulorhiza*, *Tulasnella*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Trametes*, *Trichaptum*, *Daedaleopsis*, *Psathyrella*, *Fomitopsi*, *Chaetomium*, *Pleurotus*, *Lecanicillium*, *Eutypella*, *Lecanicillium*, *Peniophorella*, which their frequency were 16% and 19%. Only one family belonged to Tulasnellaceae. 12 strains of dominant mycorrhiza had different microcosmic and macroscopic, none of them had conidiophore, near the hyphal branching-points formed of septum and conjugate nuclei, 11 strains mycorrhiza with intestiniform cells, the most of mycorrhiza had a distinct aroma.

**Keywords:** *Paphiopedilum micranthum*; mycorrhizal fungi; *Rhizoctonia*; rDNA ITS analysis; identification