

玉米根围土壤中腐霉菌的分离鉴定 及核糖体 DNA-ITS 序列分析

柴兆祥^{1,2,3,4}, 李金花^{1,2}, 楼兵干⁵, 李唯^{6*}, 甘辉林¹, 郭成¹, 赵玲¹, 董迪¹

(1. 甘肃农业大学草业学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 3. 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 4. 中一美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070; 5. 浙江大学生物技术研究所, 浙江 杭州 310029; 6. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:从兰州地区的红古、七里河等地采集玉米根围土壤标样, 诱饵法与组织分离法相结合分离纯化到 23 株腐霉菌株, 通过形态特征、培养特性、生长速度和对温度适应范围的研究, 结合 rDNA-ITS 序列分析, 将分离到的腐霉菌株鉴定为硬腐霉、终极腐霉和一个腐霉待定种。这是首次报道在我国分离到硬腐霉, 为我国新记录种; 终极腐霉也系首次在甘肃从玉米根围土壤中分离到。统计表明, 3 种腐霉菌种在兰州地区玉米根围土壤中的分离频率不同, 终极腐霉出现次数最多, 为优势种群, 分离频率为 60.9%; 其次为腐霉待定种, 分离频率为 26.1%; 而硬腐霉分离频率最低, 为 13.0%。

关键词:玉米; 根围土壤; 腐霉; 鉴定; 核糖体 DNA-ITS

中图分类号:S435.131 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-5759(2009)03-0126-10

* 腐霉菌是一类低等卵菌, 属于腐霉属 (*Pythium*)、腐霉科 (Pythiaceae)、霜霉目 (Perenosporales)、卵菌纲 (Oomycetes)、藻物界 (Chromista)。腐霉遍布全世界, 多栖息于土壤、水体和植物残体上。自从 1858 年建立腐霉属以来, 迄今为止, 全世界报道的腐霉种超过 200 多种^[1], 我国报道的腐霉种类近 60 种^[2]。甘肃地域广阔, 气候多样, 土壤类型复杂, 但有关甘肃腐霉的研究资料少见, 在有关文献中仅记载瓜果腐霉 (*P. aphanidermatum*)、德巴利腐霉 (*P. debaryanum*) 和终极腐霉 (*P. ultimum*) 等 3 个种和 2 个待定种 (*Pythium* sp.)^[3,4]。由于腐霉种类多, 形态多样, 特别是有些腐霉的鉴定特征不易形成, 因此在以形态学为主的分类鉴定技术基础上, 利用分子生物学技术辅助鉴别腐霉很有必要。以核糖体 DNA-ITS 序列分析为手段的分子技术已广泛应用于亲缘关系较近分类群的系统发育研究^[5], 这为腐霉菌的鉴定提供了重要依据。

耕作层及植物根围土壤中具有丰富的腐霉种类, 一些腐霉菌可作为医药及化学工业生产菌, 有些具有生防作用, 但多数腐霉菌却是重要的植物病原菌, 当条件适合时常侵染植物引起病害, 造成种子腐烂、幼苗猝倒、根茎部腐烂和幼嫩多汁的组织及贮藏器官毁坏, 导致经济植物的巨大损失^[6,7]。国内外报道的腐霉种大部分也来自土壤^[8]。据报道, 在我国的土壤中以菜园土壤中的腐霉最为丰富, 其次是大田土、水畔土和陵园土, 草丘土最差^[8]。

玉米 (*Zea mays*) 是我国重要的粮、饲、药兼用作物, 是当今大力发展畜牧业、解决我国粮食供需矛盾、实现粮、饲有效性供给的较好途径^[9]。前人从病理学的角度对由腐霉单独或复合侵染引起的玉米病害已有一些研究报告^[10~16], 但对玉米根围腐霉菌的种群和分布未见有报道。自 1904 年提出根际 (rhizosphere) 概念以来, 根际微域环境的研究越来越得到重视, 成为土壤学最活跃、最敏感的研究领域^[17]。本研究通过对兰州地区玉米根围土壤中的腐霉菌进行分离鉴定, 明确兰州地区玉米根围土壤中腐霉的种类及其形态特征, 为进一步探讨甘肃省的腐霉资源、深入分析玉米根围腐霉与玉米病害的关系和降低粮、饲、药作物安全风险等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 土样采集

2007 年 9-10 月, 从兰州地区的红古、七里河等地的玉米栽培地块随机选择 7 块玉米地块作为样地, 每块地

* 收稿日期: 2008-08-16; 改回日期: 2009-01-21

基金项目: 甘肃省科学事业费项目 (甘科计 [2001] 21 号) 和甘肃省教育厅项目 (032-08) 资助。

作者简介: 柴兆祥 (1968-), 男, 甘肃通渭人, 教授, 在职博士。E-mail: chaizx@yeah.net

* 通讯作者。E-mail: liwei@gsau.edu.cn

5 点取样,每取样点沿玉米根围从不同位置用土壤取样器取样 3 次,取土深度 0~20 cm,同一块田 5 点取样后将其混合均匀装入无菌塑料袋,标明编号、地点、采集时间,带回实验室供分离用。

1.2 腐霉菌株的分离、纯化和保存

以月季(*Rosa chinensis*)花瓣为材料,用诱饵法^[18,19]和组织分离法^[19]相结合分离腐霉菌。用作诱饵的月季花瓣室温下保湿 48~72 h 后,将出现病变的月季花瓣在无菌条件下用 70% 酒精消毒 3~5 s,迅速用无菌水冲洗 3~4 次,切取病健交界处的花瓣组织转移到 1/4 PDA 培养基(马铃薯葡萄糖琼脂培养基:马铃薯 60 g、葡萄糖 5 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL)上。待组织周围长出菌丝后,进行编号并挑取菌落边缘菌丝转移到 1/4 PDA 培养基上进行初纯化,初步镜检疑为腐霉的菌株采用单菌丝先端切割的方法获得纯培养,并用于形态鉴定、菌种配合方式观察和 rDNA-ITS 序列分析。所有纯化的菌株于室温条件下在 CMA 培养基(玉米粉琼脂培养基:玉米粉 60 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL)斜面上培养和保存,每 6 个月转管 1 次。

1.3 形态学鉴定方法

以孢子囊、藏卵器、雄器等形态学特征为主要鉴别性状,以菌落特征、日生长速度和温度特性等性状为辅助特征,参考余永年^[7]的《中国真菌志—霜霉目》、张中义等^[6]的《植物病原真菌学》、魏景超^[20]的《真菌鉴定手册》和 van der Plaats-Niterink^[21]的《Monograph of the genus *Pythium*》等腐霉专著中有关腐霉菌的描述和检索表进行形态学鉴定。

1.3.1 腐霉菌培养性状观察 将 CMA、PDA(马铃薯葡萄糖琼脂培养基:马铃薯 250 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL)或 PCA(马铃薯 20 g、胡萝卜 20 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL)上活化的腐霉菌用灭菌打孔器打成直径 5 mm 的菌饼,接种于直径为 90 mm 的 PDA、WA(水琼脂培养基:琼脂 20 g、水 1 000 mL)等培养基平板上,25℃ 黑暗条件培养,记录菌落形态、气生菌丝状况。

1.3.2 腐霉菌形态学特征观察 主要观察记载菌丝的形态、分枝情况,菌丝膨大体的有无、形状,孢子囊的形态、大小、着生方式、层出现象的有无、能否释放游动孢子,藏卵器的形状、着生方式、突起物的有无及其形状,卵孢子的大小、壁的厚度、是否满器,雄器的来源、形状、数目、位置(同丝生、异丝生、下位生)、是否有柄、柄的形态等特征。观察腐霉菌形态用 2 种方法:1)从 PDA、CMA、WA 等培养基上直接挑取培养物制成临时玻片观察;2)切取 2~3 条 CMA 或 PDA 平板上培养 48~72 h 的腐霉菌置于灭菌培养皿(直径 9 cm)中,用煮沸 10 min 后的黑麦草(*Lolium perenne*)叶、胡萝卜(*Daucus carrot*)条、马唐草(*Digitaria sanguinalis*)叶等作诱饵,加入适量无菌水水培或直接在含有腐霉菌的培养皿中加 PS 液(MgSO₄·7H₂O 150 mg、K₂HPO₄·3H₂O 150 mg、KCl 60 mg、Ca(NO₃)₂ 400 mg、蒸馏水 1 000 mL)培养,每天换水或 PS 液以刺激腐霉菌株产生有性器官和其他鉴别特征,并测量大小。

1.3.3 游动孢子的释放 待 1.3.2 中煮沸黑麦草叶诱导腐霉菌形成孢子囊后,置于 5℃ 冰箱中 2~4 h 后,制片观察有无游动孢子释放。

1.3.4 生长温度范围和生长速率的测定 分别设置 0,5,10,15,20,25,30,35 和 40℃ 等 9 个温度梯度,将 CMA 上活化的腐霉菌株平板,用灭菌打孔器打成直径 5 mm 的菌饼,移于直径 9 cm 的 CMA 和 PDA 平板中央,分别置于上述温度范围内的人工气候箱(温度误差范围±1℃)和冰箱(温度误差范围±1℃)内于黑暗条件下培养,24~72 h 后用十字交叉法测定菌落直径,计算菌落净生长直径,确定最低、最适、最高生长温度,每处理 3 次重复;日生长速率以 25℃ 黑暗条件下 CMA 上的菌落净生长量除以天数的值来表示(mm/d)。

$$\text{菌落净生长量(mm)} = \text{平均菌落直径(mm)} - \text{菌饼直径(mm)}$$

$$\text{日生长速率(mm/d)} = \text{菌落净生长量(mm)} / \text{天(d)}$$

1.4 核糖体 DNA-ITS 序列分析

在形态学特征观察和鉴定的基础上,将分离到的腐霉菌株初步归为形态特征不同的 3 组,从每组中各选择 1 株代表性菌株,分别为 P13-9D、P16-6C、P16-13C 用于分子鉴定。

1.4.1 菌丝体培养收集 将供试代表性菌株接种在 PDA 培养基上,25℃ 黑暗条件下培养 48~72 h 后,在无菌条件下刮取待测菌株的培养菌丝分别接种至盛有 100 mL PDB 培养液(马铃薯 250 g、葡萄糖 15 g、蒸馏水 1 000

mL, 121℃灭菌 30 min)的锥形瓶中, 28℃、140 r/min 振荡培养 48~72 h, 无菌滤纸过滤后收集菌丝体, 用无菌水冲洗 2 次, 用滤纸压干水分后立即冷冻干燥, 放 -20℃ 保存备用。

1.4.2 ITS1-PCR 扩增和测序 基因组 DNA 的提取与纯化根据修改后的 Paul^[22,23] 的方法进行。通过电泳方法检查 DNA 纯度和定量(与 DNA Maker I 比较)。

PCR 扩增采用真核生物核糖体基因(rDNA)转录间隔区(ITS)通用引物 ITS1 和 ITS4 进行, 引物序列为 ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', 引物由上海生工生物工程技术服务有限责任公司合成。

PCR 反应体系为 10×Taq buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 10 μmol/L 的引物 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.25 μL, 超纯水将反应体系补至 25 μL。

循环参数为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 40 s, 58℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 2 min, 35 轮循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶中电泳分离后, 经 EB 染色, 紫外灯下检测 PCR 扩增物的有效性。

PCR 纯化产物直接进行测序, 序列测定和拼接委托上海生工生物工程技术服务有限责任公司完成。

1.4.3 序列同源性比较和聚类分析 将待测菌株的 ITS 序列与 Genbank 核苷酸数据库中的腐霉菌 ITS 序列进行同源性比较, 采用 DNASTar 软件对所测菌株与 Genbank 中的同源性最高的部分腐霉菌种的 ITS 序列进行聚类分析, 构建同源性树。

2 结果与分析

2.1 玉米根围土壤中腐霉的种类

在室内分离和培养条件一致的情况下, 用诱饵法和组织分离法相结合, 从所采集的玉米根围土壤标样中分离纯化到 23 个腐霉菌株, 经形态学鉴定属于 3 个腐霉菌种, 分别是硬腐霉(*P. scleroteichum*)、终极腐霉(*P. ultmimum*)和一个腐霉待定种(*Pythium* sp.)。这是首次在我国分离到硬腐霉, 为我国新记录种; 首次从甘肃玉米根围土壤中分离到终极腐霉。统计结果表明, 从兰州地区玉米根围土壤中分离到终极腐霉 14 株, 出现次数最多, 为优势种群, 分离频率为 60.9%; 腐霉待定种分离到 6 株, 分离频率为 26.1%; 硬腐霉分离到 3 株, 分离频率最低, 为 13.0%。

2.2 腐霉菌的培养性状及形态特征描述

2.2.1 硬腐霉 在 CMA、PCA 和 PDA 平板培养基上菌落初为白色绒状, 低矮, 后期因形成大量卵孢子, 致使菌落及培养基呈黄褐色; 在 WA 培养基上菌丝稀疏, 可缓慢生长。在 CMA、PCA 和 PDA 平板培养基上卵孢子数量大(图 1)。

菌丝发达, 有不规则分支, 宽 2.39~3.74 μm, 平均 3.31 μm。未见孢子囊形成。

用菌丝先端切割获得的纯菌系在常温下培养极易形成大量有性菌态, 为同宗配合菌。藏卵器光滑、球形, 顶生或间生。藏卵器宽(9.36)13.80~17.87 μm, 平均 14.87 μm; 长(10.93)14.50~18.35(19.77) μm, 平均 15.48 μm。每一藏卵器上的雄器数目为 1~3 个, 多同丝生, 少异丝生, 雄器不分支或分支, 有较长的柄。卵孢子球形 11.83~22.68 μm, 平均 16.97 μm, 不满器。

生长温度范围的研究表明, 在 5~35℃ 的温度范围内均能生长, 其中, 最低生长温度 5℃, 适宜生长温度范围为 20~30℃, 最适生长温度为 25℃, 最高生长温度 35℃, 最低和最高生长温度时生长缓慢, 日生长速率分别为 3.39 和 6.71 mm/d, 0 和 40℃ 时未见生长。25℃ 时菌丝在 CMA 上的日平均生长速度为 24.3 mm/d。

2.2.2 终极腐霉 在 CMA 和 PDA 培养基平板上菌丝发达, 棉絮状; 在 PCA 平板上有放射状扩展; 在 WA 培养基上能缓慢生长, 形成稀疏的菌落(图 2)。

菌丝发达, 分枝繁茂、不规则, 宽 3.60~5.96 μm, 平均 4.90 μm。孢子囊形态多样, 球形、近球形或梨形; 孢子囊间生、顶生或切生, 以间生为主, 切生极少。孢子囊宽 11.75~28.37 μm, 平均 22.24 μm; 孢子囊长 15.25~32.06 μm, 平均 28.32 μm。未观察到排孢管。

用菌丝先端切割获得的纯菌系在常温下培养和刺激培养时均可形成有性菌态, 为同宗配合菌。藏卵器球形, 表面光滑, 顶生或间生, 罕切生。藏卵器宽 16.16~28.27 μm, 平均 22.69 μm; 藏卵器长 17.60~29.34 μm, 平均



图 1 硬腐霉形态特征

Fig. 1 Morphology of *P. scleroteichum*

a; 菌丝 Mycelium; b~h: 藏卵器和雄器 Oogonia and antheridia; i: 卵孢子 Oospore

23.69 μm 。雄器囊状、棒状, 弯曲, 每一藏卵器有雄器 1~2 个, 多数 1 个, 多同丝生, 多无柄, 紧靠藏卵器形成, 偶有异丝生; 授精管明显。卵孢子球形, 平滑, 多不满器。卵孢子直径 15.75~21.19 μm , 平均 18.7 μm 。

生长温度范围的研究表明, 在 10~35 $^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内均能生长, 其中, 最低生长温度 5 $^{\circ}\text{C}$, 日生长速率为 10.2 mm/d; 最高生长温度为 35 $^{\circ}\text{C}$, 日生长速率为 9.3 mm/d; 适宜生长温度范围为 20~30 $^{\circ}\text{C}$, 最适生长温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 0 和 40 $^{\circ}\text{C}$ 时未见生长。25 $^{\circ}\text{C}$ 时菌丝在 CMA 上的日平均生长速度为 47.2 mm/d。

2.2.3 腐霉待定种 菌丝宽 2.90~5.58 μm , 平均 4.52 μm , 不规则分枝(图 3)。

孢子囊形态多样, 球形、卵圆形、柠檬形、梨形或椭圆形; 孢子囊多间生, 偶有顶生。各种形状、大小不一的孢子囊常成串组成或大或小的复合体, 能产生游动孢子。

用菌丝先端切割获得的纯菌系在常温下培养时均可形成有性菌态, 为同宗配合菌。藏卵器球形或亚球形, 顶生或间生。藏卵器宽 15.52~32.11 μm , 平均 19.02 μm ; 藏卵器长 16.38~33.65 μm , 平均 20.35 μm 。雄器多为异丝生, 常为 1 个, 棍棒状。卵孢子球形, 满器或不满器。

生长温度范围的研究表明, P16-13C 菌株在 10~35 $^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内均能生长, 其中, 最低生长温度 10 $^{\circ}\text{C}$, 日生长速率为 23.2 mm/d; 最高生长温度为 35 $^{\circ}\text{C}$, 日生长速率为 7.5 mm/d; 适宜生长温度范围为 20~30 $^{\circ}\text{C}$, 最适生长温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 5 和 40 $^{\circ}\text{C}$ 时未见生长。25 $^{\circ}\text{C}$ 时菌丝在 CMA 上的日平均生长速度为 35.7 mm/d。

2.3 核糖体 rDNA-ITS 序列分析结果

2.3.1 腐霉菌株 P16-6C 的 rDNA-ITS 测序结果及同源性比较 在形态鉴定的基础上, 用 ITS1 和 ITS4 为测序引物, PCR 纯化产物直接进行双向测序并拼接输出全序列, 腐霉菌株 P16-6C 获得了 883 bp 的 rDNA ITS 全长序列, 用 Blast 对 P16-6C 的 ITS 序列与 GenBank 中已有的 ITS 序列进行比对, 发现与菌株 P16-6C 的 rDNA-

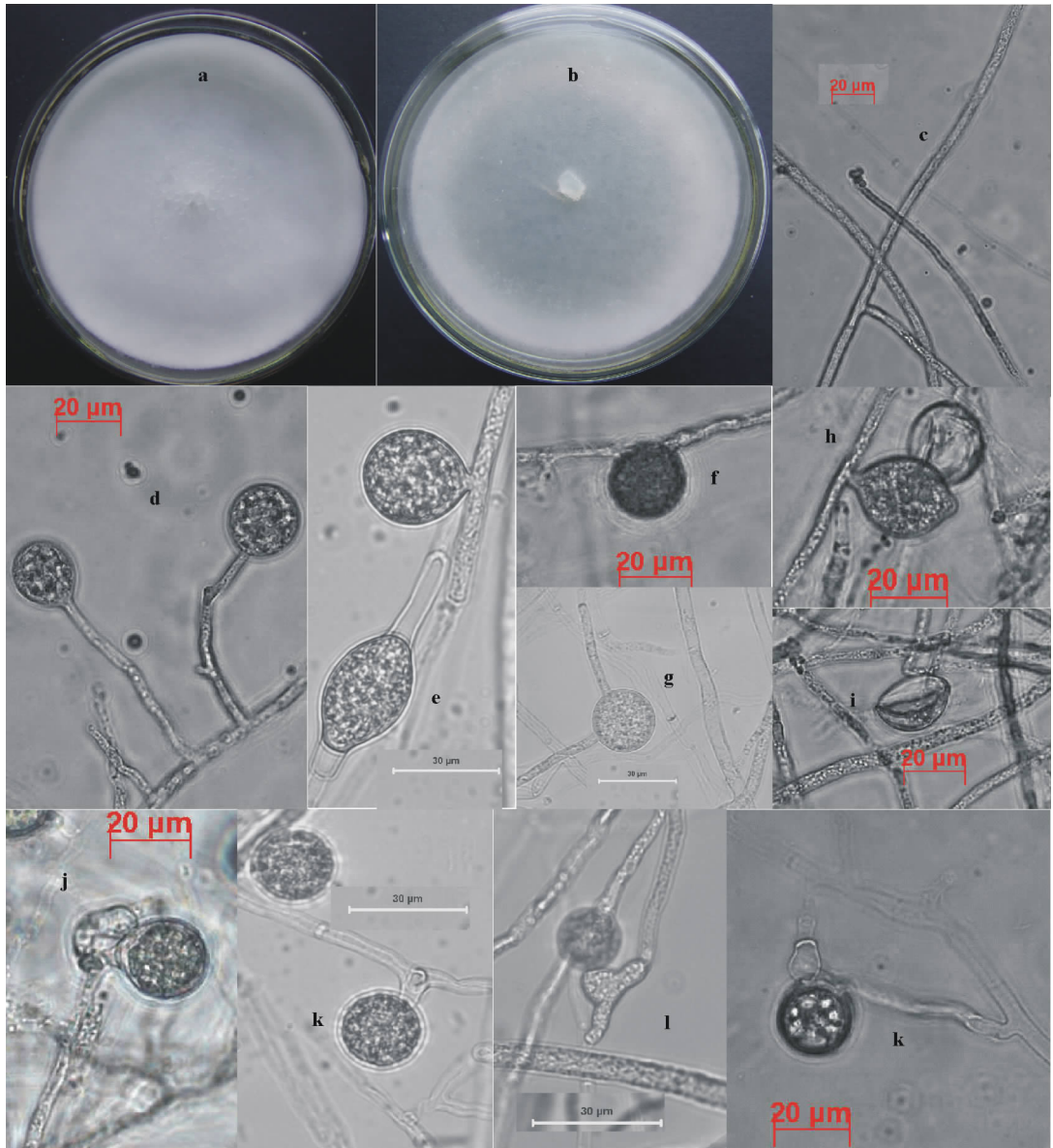


图 2 终极腐霉形态特征

Fig. 2 Morphology of *P. ultimum*

a: 在 PDA 上的菌落 Colony on PDA; b: 在 CMA 上的菌落 Colony on CMA; c: 菌丝体 Mycelium;
d~i: 孢子囊 Sporangia; j~k: 藏卵器和雄器 Oogonia and antheridia

ITS 序列相似的菌株均为腐霉。用 DNASTar 软件对所测菌株与 Genbank 中的同源性较高的部分腐霉种的 ITS 序列进行聚类分析, Neighbor-joining 法构建系统发育树, 结果表明, 菌株 P16-6C 的序列与 Genbank 上登记的菌株 AB248912(硬腐霉)和 AY598680(硬腐霉)的遗传距离最近, 在同一进化水平上(图 4)。根据形态学上未观察到孢子囊的特征和该菌有性态的特点, 参考分子鉴定结果, 认为菌株 P16-6C 应为硬腐霉。

2.3.2 腐霉菌株 P13-9D 的 rDNA-ITS 测序结果及同源性比较 在形态鉴定的基础上, 用 ITS1 和 ITS4 为测序引物, PCR 纯化产物直接进行双向测序并拼接输出全序列, 腐霉菌株 P13-9D 获得了 929 bp 的 rDNA ITS 全长序列, 用 Blast 对 P13-9D 的 ITS 序列与 GenBank 中已有的 ITS 序列进行比对, 发现与菌株 P13-9D 的 rDNA ITS 序列相似的菌株都是腐霉。用 DNASTar 软件对所测菌株与 Genbank 中的同源性较高的部分腐霉种的 ITS 序列进行分析, Neighbor-joining 法建立系统发育树, 结果表明菌株 P13-9D 的序列与 AF452158(终极腐霉)的同源性最高, 且位于系统发育树的同一分支(图 5), 支持率高, 据此认为菌株 P13-9D 的分子鉴定结果为终极腐霉, 这和形态学鉴定的结果相一致(图 5)。

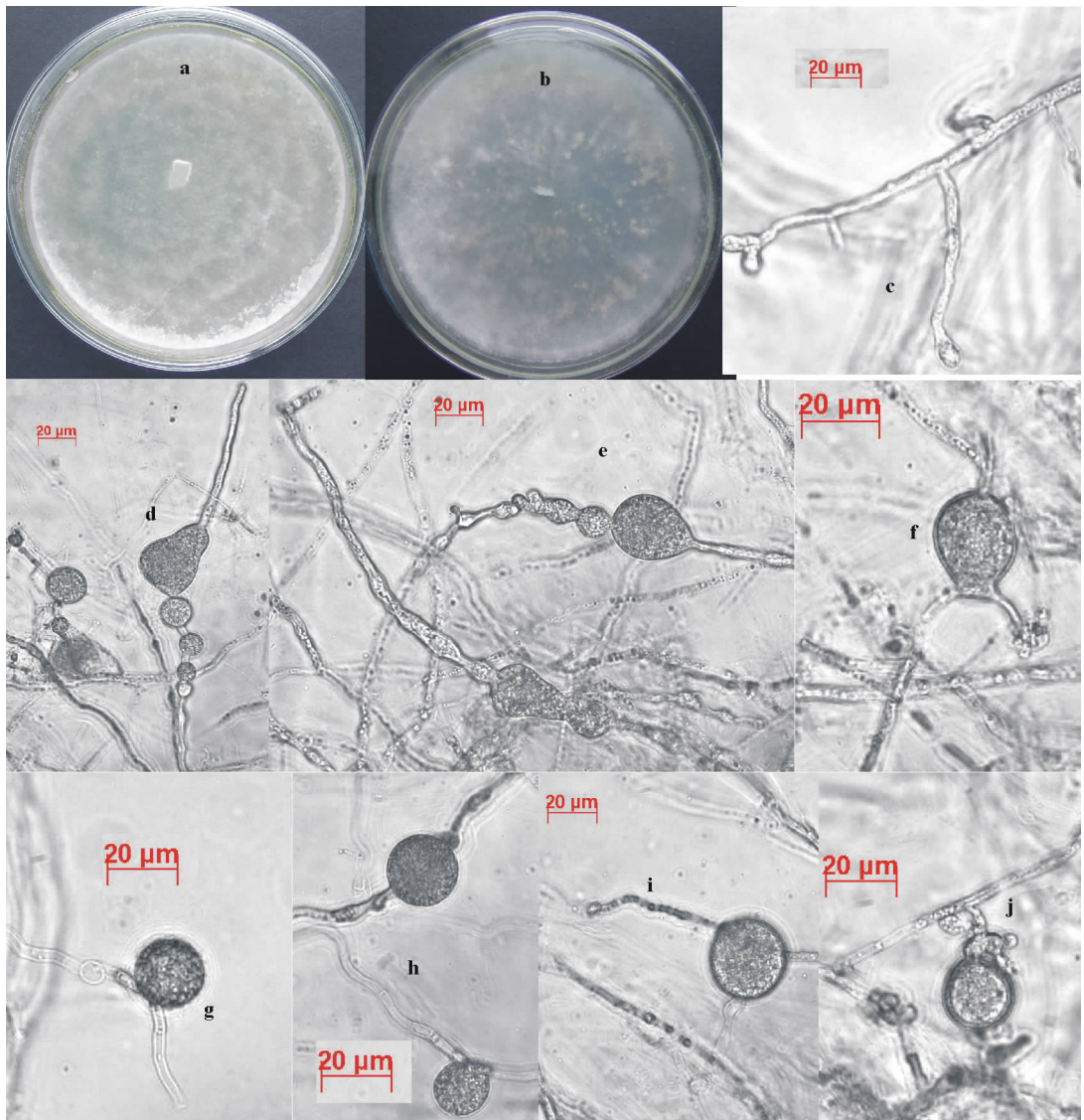


图 3 腐霉待定种形态特征

Fig. 3 Morphology of *P.* sp.

a: 在 PDA 上的菌落 Colony on PDA; b: 在 CMA 上的菌落 Colony on CMA; c: 菌丝体 Mycelium;
d~f: 孢子囊 Sporangia; g~h: 藏卵器 Oogonia; i~j: 藏卵器和雄器 Oogonia and antheridia

2.3.3 腐霉菌株 P16-13C 的 rDNA-ITS1 测序结果及同源性比较 在形态鉴定的基础上,测定了 P16-13C 菌株的 rDNA ITS1 序列,序列长度为 805 bp。用 Blast 对 P16-13C 菌株的 ITS1 序列与 GenBank 中已有的 ITS 序列进行比对,发现 P16-13C 与 GenBank 中登记的棘腐霉(*P. acanthicum*)、孤雌腐霉(*P. amasculinum*)、寡雄腐霉(*P. oligandrum*)、*P. ornamentatum*、缠器腐霉(*P. periplocum*)等 5 个腐霉种的相似性较高,都在 96% 以上。用 DNASTar 软件对所测菌株与 Genbank 中的同源性高的部分腐霉种的 ITS 序列进行聚类分析,Neighbor-joining 法构建系统发育树,发现菌株 P16-13C 与 GenBank 中登记的 AY598670(缠器腐霉)和 AJ233455(缠器腐霉)的遗传距离较其他种要较近(图 6)。

3 讨论

根际微生物是土壤生命系统的重要组成部分,是根际微环境与土壤有机物质循环和转换的枢纽,对植物的生长发育起着重要作用^[24]。土壤环境因子与微生物互相制约共同作用^[25],同时土壤微生物群落多样性与覆盖于土壤上的植物群落多样性呈正相关^[26]。本研究通过对玉米根围土壤中的腐霉种进行分离和鉴定,获得的 23 株腐霉菌株经鉴定分别为硬腐霉、一个腐霉待定种和终极腐霉,其分离频率依次为 13.0%,26.1%和 60.9%,说明终

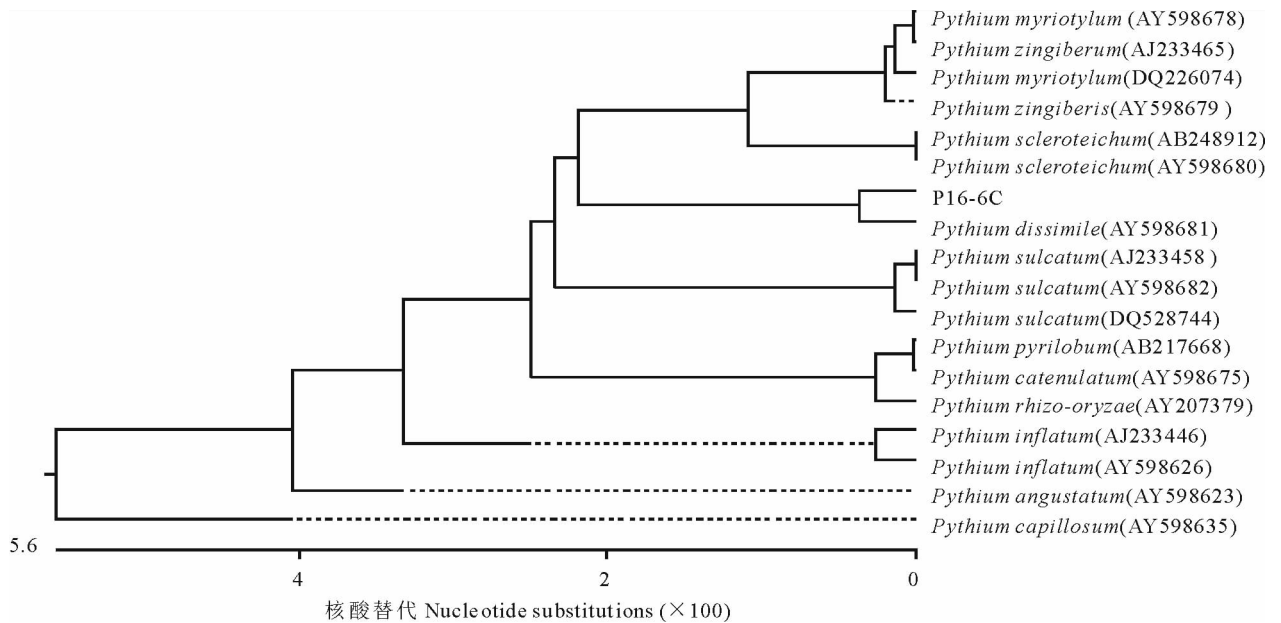


图 4 菌株 P16-6C 与 GenBank 中同源性较高的腐霉菌株的 rDNA-ITS 序列的聚类分析树状图

Fig. 4 Homology tree using ITS sequences of P16-6C strain and other *Pythium* strains from GenBank

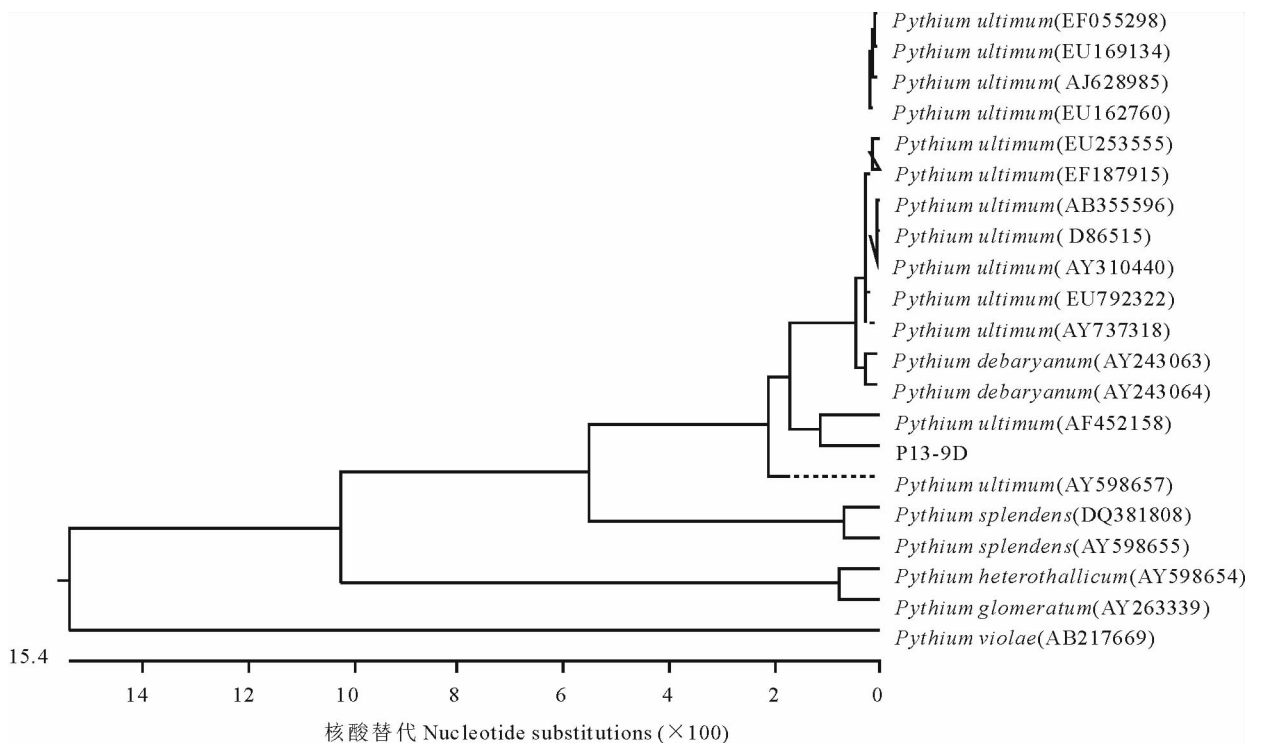


图 5 菌株 P13-9D 与 GenBank 中同源性较高的腐霉菌株的 rDNA-ITS 序列的聚类分析树状图

Fig. 5 Homology tree using ITS sequences of P13-9D strain and other *Pythium* strains from GenBank

极腐霉为玉米根围土壤中的优势种群。由于土样采集时间是在 2007 年的 9—10 月,所以研究结果反映出这一时间段兰州地区玉米根围土壤中的腐霉菌种群及其比例。

国内外学者从病理学的角度对由腐霉单独或复合侵染引起的玉米病害已有研究报道,但有关玉米根围腐霉菌的种群生态和分布未见报道。本研究以月季花瓣为材料,利用诱饵法与组织分离法相结合分离玉米根围土壤中的腐霉菌,结果表明分离效果较好。利用此方法分离到的腐霉菌中,硬腐霉系首次在我国分离到,为我国新记

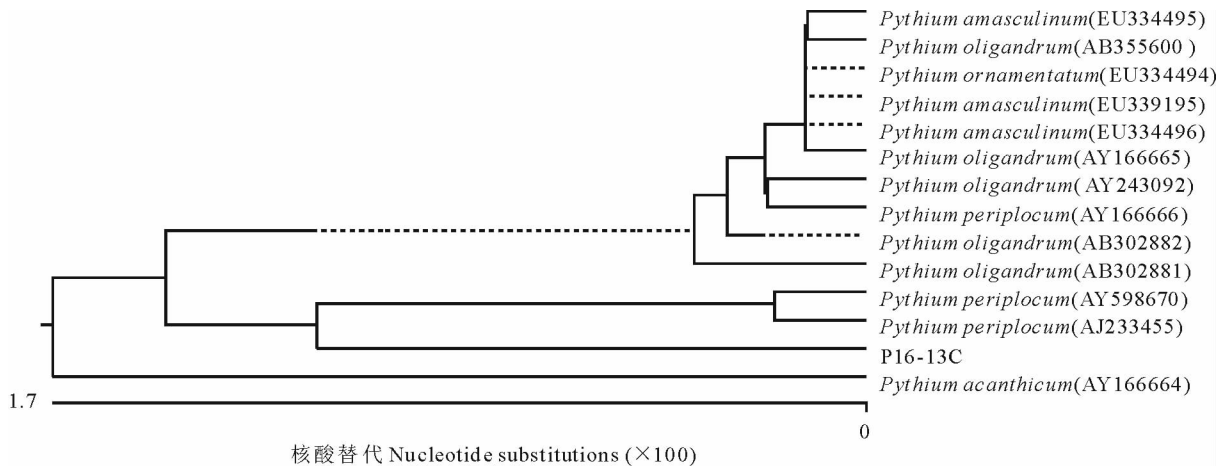


图 6 菌株 P16-13C 与 GenBank 中同源性较高的腐霉菌株的 rDNA-ITS 序列的聚类分析树状图

Fig. 6 Homology tree using ITS sequences of P16-13C strain and other *Pythium* strains from GenBank

录种;终极腐霉也是首次从玉米根围土壤中分离到。孟有儒^[4]记载终极腐霉是甘肃豌豆根腐病和马铃薯湿腐病的病原,本研究从玉米根围土壤中分离到终极腐霉,而且是优势种群。由于终极腐霉是包括玉米在内的多种植物的病原菌,所以本研究结果表明终极腐霉可能是兰州地区玉米栽培的潜在威胁,应该加强监测和防范。

对腐霉的鉴定主要以形态学特征为主要依据,但由于腐霉种类多,而且多数腐霉形态特征不稳定,有些种具有形态可变性或交叉性,有些种缺乏某些重要的分类特征,有些种类是异宗配合型,这些情况都会增加腐霉形态学分类鉴定的难度,使得一些疑难种被错误划分为相似种的类群,推迟了众多腐霉新种的发现^[27]。不少腐霉种间形态特征往往相互交叉,造成鉴定的困难和错误。为提高鉴定和分类的科学性和准确性,一些新技术如生理生化和分子标记技术已大量用于腐霉的鉴定、分类与系统发育的研究^[27~29]。特别是 1953 年 DNA 双螺旋结构被提出后,核酸分子生物学技术发展迅速,并且得到广泛应用,一系列分子标记应用于菌物的分类鉴定中,如 RFLP、RAPD、AFLP 等,而核糖体 DNA(rDNA)的研究是目前研究菌物 DNA 序列的重点^[29]。核糖体 DNA 上的 ITS 序列由于进化速度快,表现出广泛的序列多态性,其在不同的分类水平上都具有各自的特异分子标记,不仅能够正确定义生物在种水平上的概念,而且能够鉴定近缘物种间的亲缘关系,已成为真菌在种和亚种水平上分类鉴定的有效手段^[27,29]。绝大多数真菌的 ITS 序列具有高变异性,可以从中获得大量的遗传信息,作为传统的真菌分类鉴定方法的补充,常被应用于真菌近缘种的分类鉴定^[27,29]。本研究在形态鉴定的基础上,应用 rDNA-ITS 序列分析技术作为辅助鉴定玉米根围土壤中分离到的腐霉菌,提高了鉴定的准确性。

在本研究中,虽然 P16-6C 的序列与 Genbank 上登记的腐霉菌株 AY598681 的同源性最高,位于系统发育树的同一分支(图 4)。但 AY598681 所示腐霉(*P. dissimile*)的最关键的形态特征之一是该菌的雄器通常完全缺失^[21],显然在这一点上菌株 P16-6C 的有性态特征与 *P. dissimile* 完全不符合。P16-6C 始终未观察到孢子囊,藏卵器光滑、球形,顶生或间生,每一藏卵器上的雄器数目为 1~5 个,多为同丝生,也有异丝生,不分支或分支,这些形态学特点与硬腐霉的关键特征相一致^[21]。形态学反复比较研究证明 P16-6C 无论在培养特性上、还是在形态上,都与硬腐霉基本吻合。分子鉴定结果表明,菌株 P16-6C 的序列与 Genbank 上登记的菌株 AB248912(硬腐霉)和 AY598680(硬腐霉)在同一进化水平上(图 4),支持了 P16-6C 是硬腐霉的形态学鉴定结果。可以看出,只有形态与分子鉴定技术相结合,才能更准确的鉴定出腐霉菌。另外,菌株 P16-13C 未鉴定到种,仍有待研究,这里不再进行讨论。

在研究中,发现 P13-9D 菌株在显微镜视野中虽未观察到排孢管,但有时能见到少量游动孢子。根据资料^[7,21]初步推断,从玉米根围分离到的以 P13-9D 为代表的菌株有可能是在室温条件下能释放游动孢子的终极腐霉变种,有待进一步研究。

值得探讨的是,不同的腐霉菌种由于生长习性和生物学特性的差异,通过一种方法分离到土壤中全部的腐霉

菌种几乎是不可能的。随着研究的深入,有必要利用多种分离方法对玉米根围土壤中的腐霉菌进行系统研究,搞清随季节变化腐霉菌种群的季节变化和数量上的消长规律,探明种群与玉米病害的关系。

参考文献:

- [1] Bala K, Gautam N, Paul B. *Pythium rhizo-oryzae* sp. nov. isolated from paddy fields: Taxonomy, ITS region of rDNA, and comparison with related species[J]. *Current Microbiology*, 2006, 52:102-107.
- [2] 袁高庆,赖传雅. 广西南宁地区腐霉的研究[J]. *中国生态农业学报*, 2004, 12(3):149-152.
- [3] 余永年. 中国腐霉属的生态与分布[J]. *真菌学报*, 1987, 6:20-33.
- [4] 孟有儒. 甘肃省经济植物病害志[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2003. 40-42.
- [5] 楼兵干,张炳欣. 基于 rDNA ITS 序列探讨部分腐霉种的系统发育与其形态特征[J]. *菌物学报*, 2005, 24(2):207-220.
- [6] 张中义,冷怀琼,张志铭,等. 植物病原真菌学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1988. 27-107.
- [7] 余永年. 中国真菌志——霜霉目[M]. 第 6 卷. 北京: 科学出版社, 1998.
- [8] 余永年,马国忠,刘晓娟. 腐霉属分类性状评价及其中国的种[J]. *真菌学报*, 1990, 9(4):249-262.
- [9] 朱霞,杨文钰,任万君. 粮饲兼用型玉米全株饲用营养价值及其调控[J]. *草业学报*, 2005, 14(5):92-98.
- [10] 吴全安,梁克恭,朱小阳,等. 北京和浙江地区玉米青枯病病原菌的分离与鉴定[J]. *中国农业科学*, 1989, 22(5):71-75.
- [11] 吴全安,朱小阳,李怡琳. 北京地区玉米青枯病病原与发生条件的调查研究[J]. *植物保护*, 1990, 16(4):5-6.
- [12] 王晓鸣,吴全安,刘晓娟,等. 寄生玉米的 6 种腐霉及其致病性研究[J]. *植物病理学报*, 1994, 24(4): 342-346.
- [13] 杨岫,郝彦俊,邱荣芳,等. 新疆玉米青枯病病原菌分离和鉴定[J]. *新疆农业大学学报*, 1997, 20(2): 29-36.
- [14] 朱华,梁继农,王彰明,等. 江苏省玉米茎腐病菌种类鉴定[J]. *植物保护学报*, 1997, 24(1):49-54.
- [15] 王连生,刘克明,刘玉瑛,等. 河北省玉米青枯病病原菌的分离及致病性测定[J]. *河北农业科学*, 1992, (1):1-4.
- [16] 沈杰,张炳欣. 浙江省春玉米苗期致病腐霉的研究[J]. *植物保护学报*, 1995, 22(3):265-268.
- [17] 柴强,黄鹏,黄高宝. 间作对根际土壤微生物和酶活性的影响研究[J]. *草业学报*, 2005, 14(5):105-110.
- [18] Erwin D C, Ribeiro O K. *Phytophthora Diseases Worldwide*[M]. The American Phytopathological Society, Aps Press, 1996. 18-24.
- [19] 方中达. 植物研究方法[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998. 122-137.
- [20] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [21] van der Plaats-Niterink A J. Monograph of the genus *Pythium*[J]. *Studies in Mycology*, 1981, 21: 1-242.
- [22] Paul B. *Pythium ornacarpum*: a new species with ornamented oogonia isolated from soil in France[J]. *FEMS Microbiol Letters*, 1999, 180: 337-344.
- [23] Paul B. A new species of *Pythium* with filamentous sporangia having pectinolytic activities, isolated in the Burgundy region of France[J]. *FEMS Microbiol Letters*, 2001, 199: 55-59.
- [24] 王树和,王晓娟,王茜,等. 丛枝菌根及其宿主植物对根际微生物作用的响应[J]. *草业学报*, 2007, 16(3):108-113.
- [25] 王启兰,王长庭,杜岩功,等. 放牧对高寒嵩草草甸土壤微生物量碳的影响及其与土壤环境的关系[J]. *草业学报*, 2008, 17(2): 39-46.
- [26] 尚占环,丁玲玲,龙瑞军,等. 江河源区退化高寒草地土壤微生物与地上植被及土壤环境的关系[J]. *草业学报*, 2007, 16(1): 34-40.
- [27] 陈秀贤,曾会才, Ho H H,等. 分子生物学技术在腐霉菌分类上的应用研究[J]. *生物技术通报*, 2007, (5):84-92.
- [28] 马国忠,余永年. 凝胶电泳与腐霉属的分类[J]. *真菌学报*, 1991, 10(3): 217-222.
- [29] 林剑伟,阙友雄,陈天生,等. 核糖体 DNA 的内转录间隔区序列标记在真菌分类鉴定中的应用[J]. *生物技术通讯*, 2007, 18(2):292-294.

Isolation, identification, and sequence analysis of rDNA—ITS of***Pythium* species sampled from rhizosphere soil of corn**

CHAI Zhao-xiang^{1,2,3,4}, LI Jin-hua^{1,2}, LOU Bing-gan⁵, LI Wei⁶, GAN Hui-lin¹,
GUO Cheng¹, ZHAO Ling¹, DONG Di¹

(1. College of Grassland Sciences, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Gansu Key Lab of Crop improvement and Germplasm Enhancement, Lanzhou 730070, China; 3. Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Lanzhou 730070, China; 4. Sino-U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China; 5. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 6. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: *Pythium* spp. were isolated from the rhizosphere soils of corn sampled from Honggu and Qilihe districts of Lanzhou using a baiting method. Twenty three isolates were obtained after subculture and purification. Based on the morphology, culture characteristics, growth rate, adaptation to temperatures and sequence analysis of rDNA—ITS, the 23 isolates were all identified as *P. scleroteichum*, *P. ultimum* or *Pythium* sp. This is the first report of *P. scleroteichum* in China and of *P. ultimum* from corn in Gansu. *P. ultimum* was the dominant population of the three species (60.9% of the isolations), while *Pythium* sp. (26.1%) was second, and, *P. scleroteichum* (13.0%) was third.

Key words: *Zea mays*; rhizosphere soil; *Pythium* spp.; identification; rDNA—ITS