

大豆根际土壤真菌分子生物学鉴定方法

接伟光¹, 张勇¹, 蔡柏岩², 白莉¹, 王丽阳², 李二平³

(1. 黑龙江东方学院 食品与环境工程学部, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江大学 生命科学学院, 分子生物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080; 3. 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:以大豆根际土壤为研究对象, 采用湿筛倾析-蔗糖离心法分离大豆根际土壤真菌孢子。应用 Nested-PCR 技术扩增其 28S rDNA D1/D2 区域, 并结合 DNA 测序、系统发育分析, 对其进行分类鉴定。结果表明: 筛选出的大豆根际土壤真菌孢子 DT-1 与土壤真菌 (AB438763) 有较高的序列同源性, 为 97%; DT-2 与 *Mucor racemosus* (Y213713) 有较高的序列同源性, 为 99%。此方法适用于大豆根际土壤真菌的鉴定, 并且能够快速准确地得到试验结果。

关键词:土壤; 真菌; 大豆; Nested-PCR

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)03-0384-04

Molecular Identification of the Fungi in the Rhizospheric Soil of Soybean

JIE Wei-guang¹, ZHANG Yong¹, CAI Bai-yan², BAI Li¹, WANG Li-yang², LI Er-ping³

(1. Department of Food and Environment Engineering, Heilongjiang East University, Harbin 150086, Heilongjiang; 2. Key Laboratory of Microbiology, College of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, Heilongjiang; 3. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: The fungi in the rhizospheric soil of soybean played a vital role in the formation of soil fertility, the spread of soil-borne diseases, the occurrence of allelopathy, etc. In particular, soybean root rot caused by soil fungi has become a major disease which result in soybean production declined dramatically in China. Therefore, the rapid identification of the fungi in rhizospheric soil of soybean has great significance in preventing and curing fungal diseases of soybean. In this study, the fungal spores were isolated from soybean rhizospheres following a procedure including wet sieving, decanting, and separation in a sucrose gradient. Nested-PCR was conducted to specifically amplify the large-subunit (28S) rDNA D1/D2 domain sequences. They were identified from sequencing, and phylogenetic analysis. It showed that sequence alignment of the DT-1 28S rDNA D1/D2 domain sequence to fungi sequences in the database revealed that DT-1 shared 97% homology with the corresponding DT-1 sequence; DT-2 clusters shared 99% homology with the corresponding *Mucor racemosus* (Y213713) sequence. Results demonstrate that the method can get results quickly and accurately, and is suitable for identification of fungi in rhizospheric soil of soybean.

Key words: Soil; Fungi; Soybean; Nested-PCR

土壤是微生物生活的大本营, 其中的微生物不仅数量巨大, 而且种类极多, 包括细菌、放线菌、真菌、藻类等。土壤微生物种类及数量在很大程度上影响并决定着土壤肥力的形成、植物营养的转化、土传病害的传播、化感作用的发生等^[1-5]。研究和利用植物根际丰富的微生物资源库, 正受到人们的重视^[6]。

大豆是我国重要的油料作物之一, 是人们生活中的植物蛋白和油份的重要来源^[7-8]。长期以来, 国内大豆的种植存在大面积连作现象, 而黑龙江地区的大豆连作现象尤其严重, 由此导致大豆根腐病

频发, 造成大豆减产, 因此提高大豆产量以满足不断增长的市场需求已迫在眉睫^[9-12]。

大豆根腐病主要是由多种土壤习居真菌复合侵染引起, 可以导致发病的真菌有多种, 主要包括尖孢镰刀菌、半裸镰刀菌、粉红粘帚菌、立枯丝核菌、疫霉菌和腐霉菌等。目前, 土壤微生物学研究方法均有不足之处, 如有的微生物不能纯培养, 应用 DGGE 进行研究获得的基因信息较少等, 限制了对土壤微生物的研究。

该研究将寡营养活体微生物丛枝菌根 (Arbuscular mycorrhiza, AM) 真菌的分子生物学鉴定方

收稿日期: 2011-03-29

基金项目: 黑龙江省教育厅 2010 年度科学技术研究 (指导) 项目 (11553080); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (C200918); 黑龙江省博士后科研启动金资助项目 (LBH-Q09022); 黑龙江大学高层次人才支持计划资助项目 (生态修复团队 Htd 2010-12)。

第一作者简介: 接伟光 (1981-), 男, 硕士, 讲师, 主要从事微生物生态学研究。E-mail: jieweiguang2007@126.com。

通讯作者: 蔡柏岩 (1968-), 男, 教授, 主要从事生态学研究。E-mail: caibaian@126.com。

— ää e — Ä &' ž Y > f ~ > q 1 2 Æ Ü v d >
 f D; ' ¶ 5 ~ 0 1 2 q \$ M å ç ë v Ä; ' ¶
 5 ~ 0 f @; Ý q Ç Q † / Æ K Q € w » i P &
 ' ž . s 1 2 Æ » &' 6 . å ~ &' g † Ž W
 5 • è

ã, OP - QR

ã%ã, STOP

Ä äää\$ è% äâü • f &' ž YÇÍ êê z
 z + Q 0 å f äâ†ää Ç + Ç ã Ñ ä äää ê Ä
 9 > j A B % € ... å ~ ^ - è
 ä%ã, + , D - ' / " * . z
 • - ~ r î „ ß ~ Î @ | — f @ &' ž Y Ç
 Í * - > ° % äæ è
 ä%ã, äê óýð óääóäÄ Y Z . /
 ä%ã%ã, T M C š > óýð%) * , h • * + û ý q O
 — ää Æ # f : ê | ð % ~ > ° % € • z Ô , Å
 ... Æ û æ » û ôã 7 ³ áää è û ßä Š ò å
 ä è û ßä óó ðã ÷ è%ãää ^ å f ø @ ... å #
 û äã » û äâ Û ò % ß äää ê A ú B ãç Æ Ò B ä
 † å äää äää è ßä @ | ç Æ ½ y ³ Æ Ä
 ßää' — ã - è
 ä%ã%ã, ý ! Š ò , f ° ! ½ < ¥ h ~ > ð °
 óýð / Q ! ää ÿò Æ " Ä Ä å ää ÿò Æ "
 6 0 çãí D Ä ... / Q ! ää ÿò Æ " Ä Ä Æ •
 ý ! Š ò è ÿò 0 - q Ä 0 Ñ z äê
 u ä, ý ! Š ò \$ ^
 ä ÿ ý ! Š ò

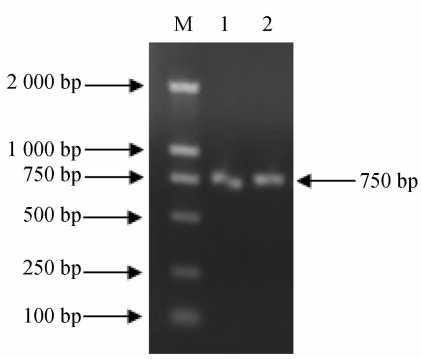
Ä 0 ý	Æ 5 } "	L 8 "
ø ä	ç•Šòòò ðòò òððòò òòòòŠ•	æç
ýóüää	ç•Šòò òòò ò òððòòòòŠ•	äè
û ä	ç•Šòð ð òðð ðððòòòòòòòòòŠ•	äé

, , ! ää ÿò Æ " å p e x ý Q ää » ûóää ^
 ÿò ä 7 ³ ä » ûå ä%ã è û ßä ý ÿ ä%ã » ûääç
 è û ßä ü òã ä » ûää%ã » è û ßä ø ä
 ä » ûå ä%ã » è û ßä ýóüää ä » ûå
 ç è » û ßä & ä%ã » ûå ÷ ð è%ã » ûå
 Ä Ä óýð ä%ã » ûê p e 3 4 Q óèç' å ôää'
 ä åçç' ä áää' ä áää % Ò Ö óää'
 ç ê! ää ÿò Æ " å p e x ý * Ä 0 d :
 Q û äT ýóüääê p e 3 4 è ! ß ß ä : Q
 çã' è M ää ÿò Æ " 6 0 ¥ ç » ûå- ä%ã Û Í Í
 Í Í Ò Í ð Ñ " è
 ä%ã%ã, • æ óýð; < = > 5 X • g ž ? @ , !
 ÿò 6 0 9 öüŠ á æ ýóüý Ú Ý å w x ç Ò æ
 Ý ð% ó ÷ ç ° ¶ : x „ ... Æ " < Ò % å ó - R

S > € • " | ê " | ± ² K ö ñ * € • ® 8
 | } , d å [\ ý ! † & " è

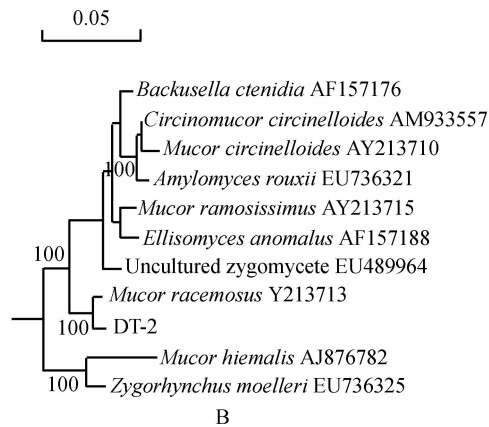
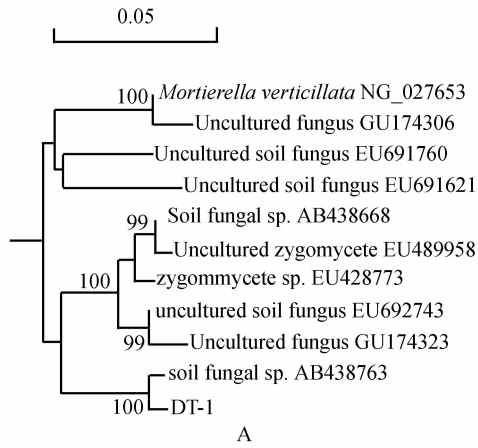
ä, WX - . /

ä%ã, - ' 0 / óýð ý ! Š ò
 &' ž YÇÍ ~ K & . q ~ > Æ X > æ O —
 q Ä • - ää ^ Û s ä%ã ~ > ° % å f ° R E Q
 ó ŠT ó Šä
 0 - ' — ° M q ~ > ð ° óýð ää ° Ò / Q Ä
 Ä Æ • ý ! Š ò è ! ää ÿò Æ " 6 0 ä M i
 K Ì Í Í Ì Ò * x Ø á • e ~ > q óýð è ð Æ
 æ ~ > óýð ç [\ ~ c ä å) äê! ää ÿò Æ
 " å - Æ " | } ý F V Í x äê óýð * óääŠä
 Ä u è F q Ä 0 d û äŠóüäää > • e óýð |
 } ÷ i y ~ È Æ " ß L å c & ñ Ñ Q éçä á
 äää Ä Ñ Æ J Ä Ä ž . B C q Í Û 5 å c ý Š
 ! Š ò q ç & / - Ä B è q Æ " ß F ç 6 0 è



ü ó óüääää ü ò äó ó Šò äó ó Šä
 E ä, äê óýð óääóäÄ û * ÿò
 ò ö e ^ f g E
 ò ää, ð ! " ! !
 óääää "

ä%ã, > Y WX — m n o p . /
 ` &' ž YÇÍ * f @ u á q å h ~ > ° %
 ó ŠT ó Šä äê óýð óääóäê F | } " W ±
 ² z > å Æ " q óýð | } ° é f ° Q ééæT éää
 ê! Y ' > , 9 + , • ý 9 - q U G ~ > [\
 ý ! † & € Ý " å ñ !! — d ^ ^ Š æ ²
 Ñ í äê
 Í ó Š | } 9 ~ • p * ® 8 - 9 » q ää%
 ~ > € • , 9 å äê óýð óääóäê | } 9 Ç Í
 ~ > ð ñ äééééå q | } ® 8 - » { ééÜ è ` ý ! †
 & " Ä Ì # ß áó Š 9 Ç Í ~ > ð ñ äééééå V , Q
 w H å äðääó Š Q Ç Í ~ > è
 Í ó Š q äê óýð óääóäê " | • f „ ±
 ² 9 ~ • p * ® 8 - 9 » q ää% ðü ~ > € • ,



òóó Šòñóó Šà

E ä, ó Šáo Š- j k 1 2 _ - ' * m n o p q
 á ² r * â 3 u v äääâ 4 5 ~ * â 6 â
 õ àä, ÿ & ! ! ó Šáo Š
 ! ! " á# " ! Š ! %
 ! äää ! â

9 k éää%÷ " AE5 * áo Š, 9 ü" Š
 " á äääéääâq ~ > 1 9 » q | } ® 8 - äQ
 èèÙ è` ÿ ! † & " Ä ĩ # Þ áo Š9 ü" Š
 " á äääéääâV, Q w H á äñääó Š- Q Ç
 Í - > ê

â, € , •

5 ~ 0 È Ç Í C { q V I ä Ç Í * q 5 ~ 0 ç
 è ~ . , & ä ñ h ĩ B o ã ê Ç Í 5 ~ 0 q f í
 9 z S á p J v Ç Í ¥ 6 p d 5 ~ 0 ~ x f í é
 ~ Ý i - ĩ • d ^ UV q = > T / - â p J v 5
 ~ 0 d ö 0 ~ é † & Ç Í C { T 0 † È Ö 9 V .
 ç K q = > T / - ä%´ v Ç Í † & q † Ø T >
 ÿ è 6 ' ä Ç Í 5 ~ 0 K c S ~ x ÿ ! q V . T 0
 † È Ö ä - ~ x ÿ ! Û È ^ ç O Ò v æ N f < _
 q / - á ê

& ' È < ĩ < _ q ö 0 • Ž 8 ð ñ ž ' o h
 ' Á Â < ĩ | L q z - 0 † Ý y x ā é MN é ,
 Í ý è B ð â+ â & ' q h ö ~ K & Ô Õ ç / †
 > ä ' a õ & ' ž . s ~ † á ° & ' & ç o
 6 ° è ç ® è F & ' ž . s D D ò ç ® q Ç Í 2
 3 - > Ä v á Y O 2 3 è : È d & ' ž Y - > € •
 1 2 È H R & ' ž . s q • s è F K ä Ç Í 5 ~ 0
) 1 2 O — , 1 ç E Þ j á 5 ~ 0 ; ' ¶ O ± Ç
 Q ð x ä q 5 ~ 0 ç V ; ' ¶ ä - ö ö ö € •
 1 2 t u q 5 6 ™ š 9 C ä - Á ^ ç @ G • ä
 / P Q ý ä f m v d Ç Í 5 ~ 0 q 1 2 ê

â æ f % ~ 0) S T q ç ä † P ä h f % S
 T U ÷ e - á 0 h q ; W = / * è F K ä Ä ¥ h
 ó y ð | } f , q ÿ ò é | T ý ! † & f , ý f
 % ~ x) S T ä Ç Í 5 ~ 0 q 1 2 ° Y v 1 { q
 1 2 U c ä / A ? 2 R è : È ° Y 5 ~ 0 q • •
 ™ š è æ ' W • - ð ü - > q f % ~ 0) ; W O —
 d & ' ž Y q > f - > € • ; W ä R Ü v d > f D
 ; ' ¶ 5 ~ 0 1 2 q \$ M á ç è v Ä ; ' ¶ 5 ~
 0 f @ ; Ý q Ç Q † / á ñ V A 9 è : é Ô È
 d ^ € • ; W ä ð ° » v ' W ± ² q - • - è '
 W ± ² z > á O - Õ - Ä Ç Í - > q ; W á ñ
 V A 2 3 è : È u á ' W ± ² ê

, f H I

â , N I S ä p ¥ T á ž U í á y à ĩ | m j K > ž Y Ç Í - >
 9 ç † > f @ * q e - 1 2 ù ä ä & ! , - &)) Û á
 äääéää äääáá ç ç Š é á á y á ÷ ÷ á ñ ú á ! à
 õ " ! ! ! \$! " ! ! & ! Š
 ! ! & ' ' ù à ù " ø
 ü ð " ! # ! & äääéää äääáá ç ç Š é á á
 ä , V W — â * + ù ä X X á y à Ç Í * U V - > q f @ • ^ H «
 V { q ~ » 1 2 ù â * + Ç Í 9 C / á äääéää äääéää äääéää
 á ó ù y á ò ñ á ö ä ! à ø ! " ! "
 ! # " ! ù à ö ! '
 ò á äääéää äääéää äääéää
 á , Ž ñ Z á = È [á = Y á y à Z [\] - È Ç Í 5 ~ 0 ~ . 1
 2 ù à Ç Í b Û á äääéää äääéää äääéää äääéää á ú á
 " ö á " ú á ! à ò ! ! " Š
 ! & " " \$! á ! ! ò ù à ò
 ù " á äääéää äääéää äääéää äääéää
 æ , ð ú à ò ù ú á y ! ó ð á ! à ò Š
 ' & ! # ! " ! & !
 " ! ! ! ! ! ð ' ù " á

- New Zealand[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(7): 1770-1781.
- [5] 王树起, 韩晓增, 乔云发, 等. 长期施肥对东北黑土酶活性的影响[J]. *应用生态学报*, 2008, 19(3): 551-556. (Wang S Q, Han X Z, Qiao Y F, et al. Effects of long-term fertilization on enzyme activities in black soil of Northeast China [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(3): 551-556.)
- [6] 王丹丹, 李辉信, 魏正贵, 等. 蚯蚓和秸秆对铜污染土壤微生物类群和活性的影响[J]. *应用生态学报*, 2007, 18(5): 1113-1119. (Wang D D, Li H X, Wei Z G, et al. Effects of earthworm inoculation and straw amendment on soil microflora and microbial activity in Cu contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(5): 1113-1119.)
- [7] 刘灵, 廖红, 王秀荣. 磷有效性对大豆菌根侵染的调控及其与根构型、磷效率的关系[J]. *应用生态学报*, 2008, 19(3): 564-568. (Liu L, Liao H, Wang X R. Regulation effect of soil P availability on mycorrhizal infection in relation to root architecture and P efficiency of *Glycine max* [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(3): 564-568.)
- [8] 蔡柏岩, 接伟光. 大豆根围丛枝菌根真菌鉴定[J]. *大豆科学*, 2009, 28(3): 483-486. (Cai B Y, Jie W G. Detection of the arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of soybean[J]. *Soybean Science*, 2009, 28(3): 483-486.)
- [9] 王树起, 韩晓增, 乔云发, 等. 寒地黑土大豆轮作与连作不同年限土壤酶活性及相关肥力因子的变化[J]. *大豆科学*, 2009, 28(4): 611-615. (Wang S Q, Han X Z, Qiao Y F, et al. Variation of soil enzymes activity and relevant nutrients at different years of soybean (*Glycine max* L.) rotation, alternate and continuous cropping[J]. *Soybean Science*, 2009, 28(4): 611-615.)
- [10] 张俊英, 王敬国, 许永利. 大豆根系分泌物中氨基酸对根腐病菌生长的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2008, 14(2): 308-315. (Zhang J Y, Wang J G, Xu Y L. Effect of amino acids from soybean root exudates on hyphal growth of pathogenic fungi of soybean root rot[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2008, 14(2): 308-315.)
- [11] 汪涛, 戚仁德, 黄志平. 大豆根腐病的识别与防治[J]. *大豆科技*, 2010(6): 14-15. (Wang T, Qi R D, Hang Z P. Identification, prevention and control of soybean root exudates[J]. *Soybean Science & Technology*, 2010(6): 14-15.)
- [12] 刘晓莉. 黑河地区大豆重茬种植存在的问题及解决途径[J]. *中国农业科技导报*, 2005, 7(5): 22-25. (Liu X L. Problems and resolving methods of soybean continuous planting in Heihe region[J]. *Review of China Agricultural Science and Technology*, 2005, 7(5): 22-25.)
- [13] 蔡柏岩, 接伟光, 葛菁萍, 等. 黄檗根围丛枝菌根(AM)真菌的分离与分子鉴定[J]. *菌物学报*, 2008, 27(6): 884-893. (Cai B Y, Jie W G, Ge J P, et al. Molecular detection of the arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of *Phellodendron amurense* [J]. *Mycosystema*, 2008, 27(6): 884-893.)
- [14] 刘润进, 陈应龙. 菌根学[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 1-404. (Liu R J, Chen Y L. *Mycorrhizology* [M]. Beijing: Science Press, 2007: 1-404.)
- [15] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols, a guide to methods and applications[M]. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [16] Van Tuinen D, Zhao B, Gianinazzi-Pearson V. PCR in studies of AM fungi: from primers to application[M]// Varma A K. *Mycorrhiza manual* [M]. Heidelberg: SpringerVerlag, 1998: 387-399.
- [17] Van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, et al. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR[J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7: 879-887.