

一株大豆腐霉菌(*PSHH1*) rDNA 的 ITS 序列鉴定

张瑞萍¹, 王家军¹, 魏 峡¹, 张 武², 栾晓燕¹, 唐晓飞¹, 刘鑫磊¹

(1. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院 黑河分院, 黑龙江 黑河 164300)

摘要:大豆腐霉菌是黑龙江省大豆根腐病菌群的重要组成部分,为了明确大豆腐霉菌的种类,从黑龙江省黑河市大豆根系土壤分离获得1株腐霉菌 *PSHH1*,应用 rDNA-ITS 序列分析法对其进行菌种鉴定。Blast 和系统进化树结果表明:*PSHH1* 与 GenBank 上登录号为 AB259316.1 和 AB512973.1 等的 *Pythium sylvaticum* 亲缘关系最近,rDNA-ITS 序列同源性大于 99%,因此认定 *PSHH1* 为 *Pythium sylvaticum*。为了考察 *PSHH1* 的致病性,选取了 60 份当前大豆主栽品种,应用种子腐烂法和下胚轴接种法进行回接试验,通过计算种子腐烂率和植株茎折率来评价 *PSHH1* 的致病性,结果显示,*PSHH1* 仅对 13.33% 的大豆主栽品种表现出较强的致病力,而对 61.67% 的大豆主栽品种致病力较弱。

关键词:腐霉菌;ITS 序列鉴定;致病力

中图分类号:S565.1 文献标识码:A DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2015.05.0867

Internal Transcribed Spacer(ITS) sequence identification of rDNA in a *Pythium* strain *PSHH1*

ZHAN Grui-ping¹, WANG Jia-jun¹, WEI Lai¹, ZHANG Wu², LUAN Xiao-yan¹, TANG Xiao-fei¹, LIU Xin-lei¹

(1. Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Heihe Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Heihe 164300, China)

Abstract: *Pythium* is an important part of soybean root rot fungal population in Heilongjiang province, in order to determine the species of *Pythium* in Heilongjiang province, *PSHH1* has been isolated from the soil of soybean root in Heihe city. And rDNA-ITS sequence analysis was applied to *PSHH1*. According to the results of the analysis of rDNA-ITS sequences, the sequence homology was more than 99% when it was compared with the sequence of registration number AB259316.1 and AB512973.1 in GeneBank. Therefore, we think *PSHH1* was a *Pythium sylvaticum*. In order to study the pathogenicity of *PSHH1*, using seed rot method and hypocotyl inoculation method, 60 main soybean cultivars were selected to determine the pathogenicity of *PSHH1*, and seed rot rate and stem discount rate can be reflected to evaluate the pathogenicity of *PSHH1*, results showed that *PSHH1* had strong pathogenicity to 13.3% main soybean cultivars, at the same time, there were 61.67% main soybean varieties expressed weak pathogenicity to *PSHH1*.

Keywords: *Pythium*; Internal Transcribed Spacer(ITS) sequence identification; Pathogenicity

大豆根腐病是由多种病原菌混合侵染的一种土传病害,我国已报道的致病菌涉及镰孢属(*Fusarium*)、疫霉属(*Phytophthora*)、腐霉属(*Pythium*)和丝核菌属(*Rhizoctonia*)等^[1-4]。其中,腐霉属(*Pythium*)自 1858 年建立以来累计报道的腐霉种超过 200 余种,具有致病性的有 80 多种^[3]。我国报道的腐霉种截至 2013 年有 64 种^[5-6]。研究表明,耕作层及植物根围土壤中具有丰富的腐霉种类,多数腐霉菌在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。腐霉菌(*Pythi-*

um)侵染大豆会引起根部呈褐色湿腐病斑,椭圆型,略凹陷,茎基部常呈水渍状,细缩变软,迅速猝倒死亡^[7]。黑龙江省地域广阔,土壤类型以黑土为主,但有关黑龙江省腐霉菌的分类研究资料较少。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。本文从黑龙江省黑河地区大豆根围土壤中分离得到

收稿日期:2015-04-27

基金项目:黑龙江省农业科技创新工程(2012ZD004);哈尔滨市应用技术与开发项目(2013RFXYJ082);国家现代农业产业技术体系(CARS-04-PS05)。

第一作者简介:张瑞萍(1979-),女,博士,副研究员,主要从事作物病理学研究。E-mail:ruiping_zhang121@126.com。

通讯作者:王家军(1973-),男,硕士,副研究员,主要从事大豆植物保护研究。E-mail:junjiawang@163.com。

了腐霉菌分离株 *PSHH1*, 通过种子腐烂法和下胚轴菌碟接种法对其进行致病能力测定, 并结合生物信息学手段对其进行序列分析明确其分类地位, 为进一步研究腐霉菌与大豆互作分子机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 土样采集

大豆播种后 7 d(5月10日)在黑龙江省农业科学院黑河分院试验田大豆根腐病发生严重地块(5年大豆连作)采集大豆根际土样 3 份。土样采集方法为:每地点随机选取 5 处,取表层土下 5~15 cm 深处的土壤约 300 g 装入标本袋,该地块 5 个点土壤充分混匀,记为 1 份,贴上标签。土样用保鲜袋带回,4℃冰箱保存,并立即进行腐霉菌室内分离培养。

1.2 腐霉菌分离培养

选用平皿分离法筛选腐霉菌,腐霉菌的选择性培养基配方为:玉米粉琼脂培养基(CAM)+五氯硝基苯(pDNB)100 mg+氨基青霉素 30 mg+链霉素 30 mg^[8-9]。对于被细菌污染的腐霉,在其培养基中加入抗生素,用培养基覆盖在已长有被污染腐霉的表面继续培养;用盖玻片压在腐霉表面培养。对于被其他真菌污染的腐霉首先通过不同的生长速率进行初步纯化,然后用单菌丝先端切割法进行进一步的纯化^[10]。对分离纯化后的菌株进行初步镜检,有如下表现的即确认为腐霉菌:在 PDA 培养基上菌落正面、反面均为白色、平坦,气生菌丝生长旺盛,菌丝白色、致密、绵絮状,菌丝纤细有分枝,无隔膜。

1.3 分离菌株致病性检测

分别采用种子腐烂法^[11-13]和下胚轴接种法^[14-15]对分离菌株 *PSHH1* 进行致病性检测:随机选取黑龙江省种植面积 6 666.67 hm² 以上的大豆种植品种 60 个(表 1)进行致病性回接接种试验,通过计数接种待测菌株后供试品种的种子腐烂率和植株茎折率,考察 *PSHH1* 的致病性。种子腐烂法每品种设 1 皿不接菌对照,4 皿接菌,每皿接 10 粒健康饱满的种子,重复 1 次,接菌 7 d 后统计种子腐烂率。下胚轴接种法每品种设 10 株不接菌对照,30 株接菌,接菌 5 d 后统计植株茎折率。

致病力评价标准:种子腐烂率(植株茎折率) < 30%,为弱致病力(susceptibility, S);种子腐烂率(植株茎折率)31%~69%,为中度致病(moderate resistance, MR);种子腐烂率(植株茎折率) > 70%,为强

致病力(resistance, R)。

1.4 腐霉菌菌株的 rDNA-ITS 鉴定

将菌株 *PSHH1* 接种在 V8 培养液中,28℃,180 r·min⁻¹,振荡培养 2~3 d。DNA 的提取和核糖体 rDNAITS1 的克隆方法参照陈秀贤等^[16]的方法。利用通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对其核糖体 DNA-ITS 序列进行 PCR 扩增。反应体系:10×PCR Buffer 2.5 μL,2.5 mmol·L⁻¹ dNTP 2 μL,10 μmol·L⁻¹ 的引物 1 μL,模板 DNA 1 μL,5 U·μL⁻¹ *Taq* 聚合酶 0.25 μL,用 ddH₂O 将反应体系补至 25 μL。PCR 反应程序:95℃,3 min;(95℃,45 s;68℃,30 s;72℃,60 s) 31 个循环;72℃,60 s。经 EB 染色,紫外灯下检测扩增产物的有效性,并将菌株送金唯智生物工程有限公司测序。

1.5 腐霉菌菌株的序列同源性比较和聚类分析

将菌株 *PSHH1* 的 rDNA-ITS1 序列与 Genebank 核苷酸数据库中的 ITS1 序列进行同源性比较,使用 Clustal_X(1.83)软件和 MEGA 5.1 对自测序列以及从 GenBank 下载的相关序列进行较准后,以距离法构建系统发育树。

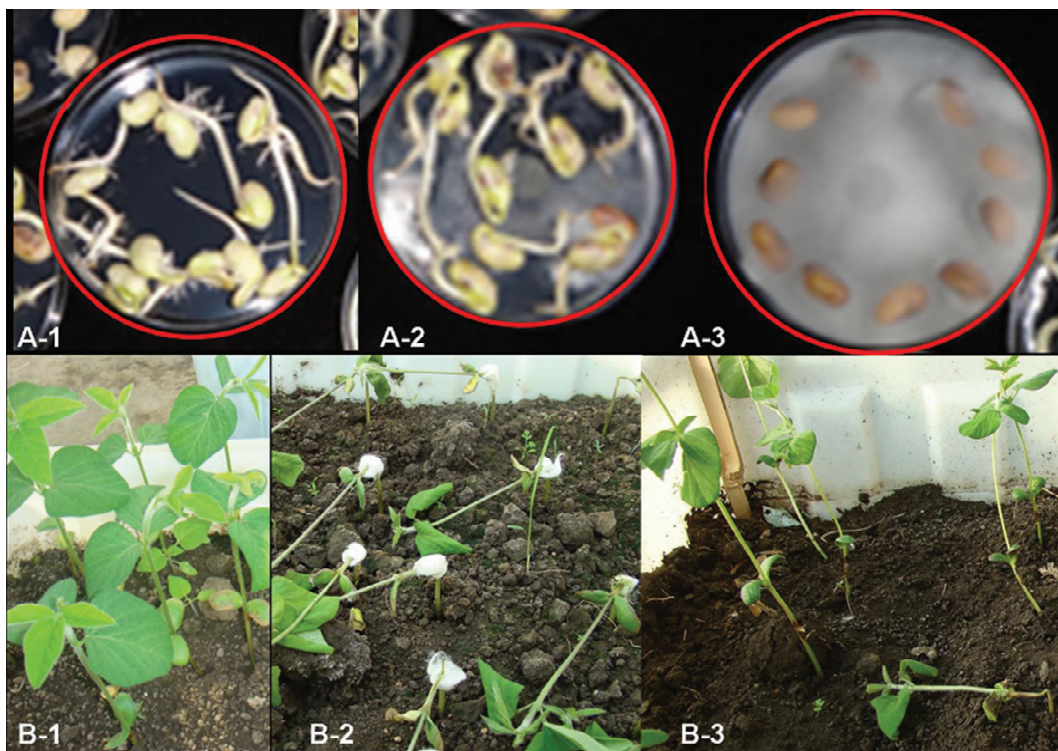
2 结果与分析

2.1 腐霉菌株的获得

在选择培养基上,应用稀释平皿法对采集的土壤溶液(5 g 土加入 10 mL 无菌水)稀释成 10⁻¹、10⁻²……10⁻¹⁰ 依次倒板,12 h 后挑取白色的单菌落单独放置在含培养基的新皿内,先端切割法进行进一步纯化,并实时观察、初步镜鉴,获得的菌株 *PSHH1* 菌丝气生、纤细有分枝,无隔膜。

2.2 黑龙江省黑河大豆腐霉菌分离菌株的致病性检测

60 份大豆主栽品种对菌株 *PSHH1* 进行回接试验,测定种子腐烂率表明(图 1A),*PSHH1* 对 13.33% 的大豆品种表现出强致病力,对 55.00% 的大豆品种致病力较弱,对 31.67% 的大豆品种中度致病。而下胚轴接种发病程度相对较弱(图 1B),接种腐霉菌株 *PSHH1* 2 d 后,接种点病斑不明显,近接种点 1~2 片叶萎蔫;3~4 d 后开始有大豆植株茎折,病斑扩展;接种 5 d 后发病情况稳定,病斑呈水渍状,*PSHH1* 仅对 10.00% 的大豆品种表现出强致病力,对 61.67% 的大豆品种致病力较弱,对 28.33% 的大豆品种中度致病。



A-1: 不接菌对照; A-2: 部分种子腐烂; A-3: 全部种子腐烂; B-1: 不接菌对照; B-2: 幼苗感病, 茎折; B-3: 幼苗抗病, 有菌斑。

A-1: Control without *PSHH1*; A-2: Partly rot seeds; A-3: Toally rot seeds; B-1: Seedlings control without *PSHH1*; B-2: Seedlings were infected to *PSHH1* and stems fold; B-3: Seedlings were resistant to *PSHH1* and plague.

图 1 菌株 *PSHH1* 的致病力测定

Fig. 1 The pathogenicity determination of *PSHH1*

表 1 *PSHH1* 对 60 个大豆品种的致病力评价

Table 1 The pathogenicity evaluation of *PSHH1* to 60 soybean varieties

品种 Variety	种子腐烂率 Seed rot rate/%	茎折率 Stem discount rate/%	品种 Variety	种子腐烂率 Seed rot rate/%	茎折率 Stem discount rate/%
北豆 10 Beidou 10	25.00	20.00	黑农 51 Heinong 51	30.00	30.00
登科 1438 Dengke 1438	76.25	80.00	黑农 53 Heinong 53	20.00	20.00
登科 1 号 Dengke 1	27.50	26.67	黑农 54 Heinong 54	16.67	16.67
登科 48 Dengke 48	32.50	36.67	黑农 58 Heinong 58	56.67	56.67
登科 4 号 Dengke 4	61.25	46.67	黑农 62 Heinong 62	43.33	43.33
登科 5 号 Dengke 5	65.00	63.33	黑农 64 Heinong 64	60.00	60.00
东农 42 Dongnong 42	43.75	43.33	黑农 66 Heinong 66	43.33	43.33
东农 48 Dongnong 48	18.75	26.67	黑农 68 Heinong 68	30.00	30.00

续表 1

品种 Variety	种子腐烂率 Seed rot rate/%	茎折率 Stem discount rate/%	品种 Variety	种子腐烂率 Seed rot rate/%	茎折率 Stem discount rate/%
东农 49 Dongnong 49	20.00	30.00	华疆 2 号 Huajiang 2	26.67	26.67
东农 50 Dongnong 50	15.00	23.33	金源 55 Jinyuan 55	20.00	20.00
东农 51 Dongnong 51	23.75	26.67	黑农 67 Heinong 67	30.00	40.00
东农 53 Dongnong 53	21.25	23.33	抗线 4 号 Kangxian 4	23.33	23.33
东农 55 Dongnong 55	28.75	30.00	抗线 8 号 Kangxian 8	16.67	16.67
东农 56 Dongnong 56	23.75	20.00	克山 1 号 Keshan 1	16.67	16.67
丰收 27 Fengshou 27	11.25	13.33	垦丰 16 Kenfeng 16	23.33	23.33
合丰 25 Hefeng 25	95.00	86.67	垦丰 17 Kenfeng 17	63.33	76.67
合丰 35 Hefeng 35	36.25	33.33	垦丰 20 Kenfeng 20	33.33	30.00
合丰 50 Hefeng 50	21.25	23.33	垦丰 22 Kenfeng 22	23.33	23.33
合丰 55 Hefeng 55	26.25	23.33	垦丰 25 Kenfeng 25	30.00	30.00
黑河 25 Heihe 25	86.25	80.00	蒙豆 14 Mengdou 14	16.67	16.67
黑河 35 Heihe 35	90.00	70.00	蒙豆 16 Mengdou 16	23.33	23.33
黑河 38 Heihe 38	100.00	76.67	蒙豆 30 Mengdou 30	26.67	26.67
黑河 43 Heihe 43	68.75	63.33	蒙豆 36 Mengdou 36	26.67	26.67
黑河 44 Heihe 44	52.50	50.00	蒙豆 37 Mengdou 37	30.00	30.00
黑河 45 Heihe 45	100.00	83.33	绥农 4 号 Suinong 4	30.00	33.33
黑河 52 Heihe 52	45.00	43.33	绥农 10 Suinong 10	26.67	40.00
黑农 61 Heinong 61	18.75	20.00	绥农 26 Suinong 26	60.00	70.00
黑农 65 Heinong 65	15.00	26.67	绥农 31 Suinong 31	30.00	30.00
黑农 44 Heinong 44	23.75	50.00	绥农 8 号 Suinong 8	33.33	36.67
黑农 48 Heinong 48	23.75	36.67	黑农 55 Heinong 55	20.00	20.00

2.3 PCR 扩增结果及 BLAST 比对分析

列经 DNAMAN 拼接后,大小为 898 bp,其基因组序列为:

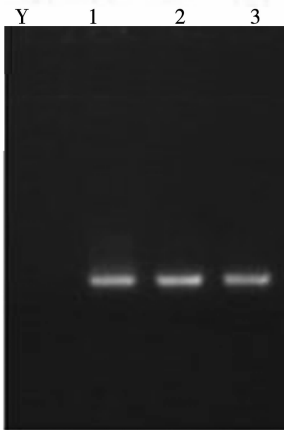
PCR 扩增出的目的片段条带单一清晰(图 2)序

ORIGIN

```

1  taaaaaactt tccacgtgaa ctgtcgttat ttgttgtgtg tctgcgcggt gctggcgtgc
61  gtttgcttac gcttcggtgt ttgcbgagtg gtgctggcgg tgcgcggact gaacgaaggt
121 cgtggtgctg tgtgcctgct gcaactgctga ctttgattg atttgcatgg tcttggcgga
181 gcggcgggtg ctgtgcgtgc gcggctgact tactttttca aacccatac ctaacttact
241 gattatactg tgagaacgaa agttcttgct ttaactaga taacaacttt cagcagtgga
301 tgtctaggct cgcacatcga tgaagaacgc tgcgaactgc gatacgtaat gcgaattgca
361 gaattcagtg agtcatcgaa attttgaacg catattgcac ttccgggtta tgcctggaag
421 tatgtctgta tcagtgtccg taaatcaaac ttgcctttct tccttccgtg tagtcggtgg
481 aggagagttg cagatgtgaa gtgtctcgct gtggttggta tatttgttta tgcacaactt
541 gcgagtcctt ttaaattggac acgactttct cttttttgta tctgcgcggt gctgtgcgtg
601 aacgcggtgg ttttcggatc gctcgcggct gtcggcgact tcggtgaatg cattatggag
661 tggacctcga ttcgcggtat gttgggcttc ggctggaaa tgggtgctctg
721 ttccgcgctc gccttgaggt gtactggtgg ctgtgggatt gaactgggta ctggtgtag
781 tagtgggagg ctcggttgcg tgggtgcatc tgtgtttttg tacttggtgca attggcagaa
841 gaggagtctc aatttgggaa attagtgtac tccgggtttg atcctgcgtg tatactctc//

```



1~3 为 3 次重复。

1-3 are three repeats.

图 2 *PSHH1* rDNA ITS 序列的 PCR 扩增
Fig. 2 The PCR amplification of ITS sequence of *PSHH1* rDNA

将 *PSHH1* 的 ITS 序列提交 GeneBank 数据库进行 Blast 序列比对分析(表 3),该序列与 *Pythium sylvaticum* 相似度在 99% 以上,G + C 含量表明属于同一个种,初步断定,*PSHH1* 为 *Pythium sylvaticum*。

2.4 黑龙江省黑河地区大豆腐霉菌群体的同源性分析

将菌株 *PSHH1* 的 ITS 序列提交至 Genbank,获得登录号为 KP980565,获得有效序列长度 898 bp,在 GenBank 上进行 BLAST 比对,使用 Clustal_X (1.83)软件和 MEGA 5.1 对自测序列以及从 GenBank 下载的相关序列进行较准后,以距离法构建系统发育树(图 3)。结果表明,该序列与登录号为 AB259316.1 和 AB512973.1 等的 *Pythium sylvaticum* 亲缘关系最近,rDNA-ITS 序列同源性大于 99%。

表 3 Blast 比对序列

Table 3 Blast sequence alignment

登录号 Accession number	序列大小 Sequence length/bp	G + C 含量 G + C content/%	最大相似度 The biggest similarity/%
KP980565	898	49.11	100
AB512967.1	907	49.17	100
HM051065.1	957	49.01	100
HQ643847.1	938	49.04	99
AB259316.1	907	49.28	99
AB108008.1	907	49.06	99

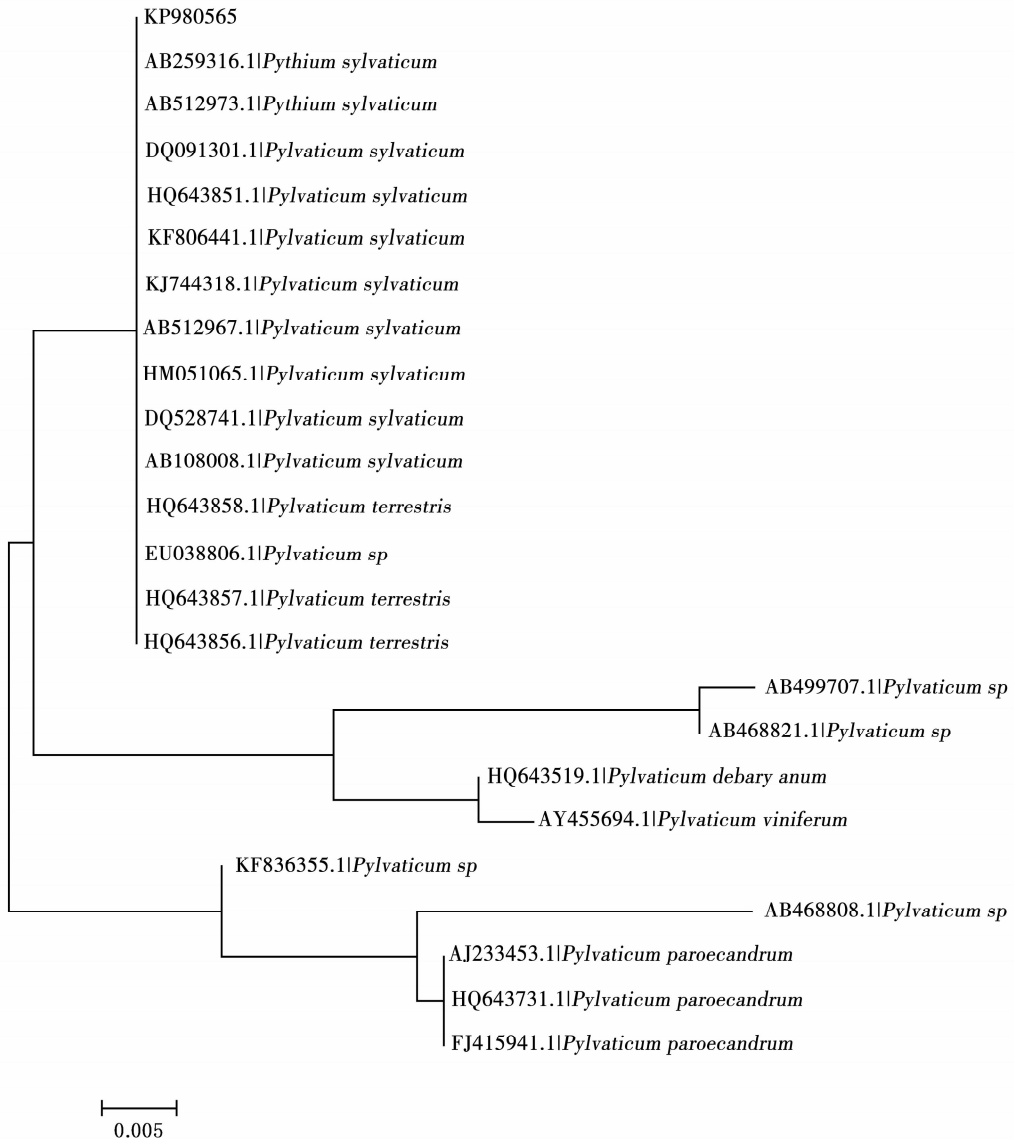


图3 基于 ITS 序列的分子系统树

Fig. 3 The molecular phylogenetic trees based on ITS sequences

3 讨论

土传病害的病原菌种类及数量因受到气候因子、多种土壤演替过程和生物因子等因素影响,变化较快^[16]。腐霉菌因菌群组成复杂,分离者的采样时间、地点和样品量不同等因素,所获得的腐霉菌数据有较大差异,如马淑梅分离得到腐霉菌为 25.2%^[17],李永刚分离到腐霉菌仅为 2.85%^[18]。目前对黑龙江省大豆腐霉菌的研究仅仅限于分离频率,未见到分离小种的报道,为了揭示研究腐霉菌与大豆互作机理,有必要明确黑龙江省大豆腐霉菌的小种。然而,由于腐霉菌种类较多,每种形态特征又具有交叉性,且种内存在变异,对菌株的正确鉴定造成困难;加上观察时机具有不确定性,观察物清晰程度、观察者人为视觉误差等原因,形态学分类鉴定也存在一定的弊端。rDNA 的 ITS 区同

时具有多变区和保守区,5.8S、18S 和 28S 的序列在进化中趋于保守,种间变化小,而内转录间隔区 ITS1 和 ITS2 作为非编码区,最终不加入成熟核糖体,所以受到的选择压力较小,进化速度快,种间差异大,且变异速度存在着较大的差异,适合种及种以下水平的分类研究,因此,真菌 rDNA-ITS 适用于不同分类水平的物种鉴定及系统发育研究,能从分子水平为病原菌的准确分类、鉴定提供科学依据,被广泛应用在腐霉菌种鉴定中^[19-26]。应用该技术,我们从北方寒地连作土中分离出 1 株腐霉菌株 PSHH1,经 rDNA-ITS 序列鉴定为 *Pythium sylvaticum* (KP980565),有效序列长度为 898 bp。对 PSHH1 进行回接试验,仅对 13.33% 的大豆主栽品种表现出较强的致病力,而对 61.67% 的大豆主栽品种致病力较弱,而 *P. aphanidermatum* 对参试的 60% 以上品种有较强致病力^[27-28]。这一表现也与魏嵘等^[13]的报道一致。

参考文献

- [1] 白丽艳. 大豆根腐病原种类鉴定及分子检测技术研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2009. (Bai L Y. Study on pathogen identification and molecular detection technology of soybean root rot [J]. Urumuchi: Xinjiang Agricultural University, 2009.)
- [2] 李保英, 马淑梅. 大豆根腐病原菌种类及抗源筛选[J]. 植物保护学报, 2000, 27(1): 91-93. (Li B Y, Ma S M. Pathogens of soybean root rot and screening of resistant source [J]. Acta Phytocologica Sinica, 2000, 27(1): 91-93.)
- [3] 银玲, 田讯, 霍万学. 腐霉属菌形态学及分子生物学鉴定技术概述[J]. 中国蔬菜, 2013(12): 15-22. (Yin L, Tian X, Huo W F. Overview of identification techniques for *Pythium* species based on morphology and molecular biology [J]. China Vegetables, 2013(12): 15-22.)
- [4] 马淑梅. 黑龙江省大豆根腐病致病病原种类分布及抗病种质鉴定[J]. 中国农学通报, 2012, 28(27): 230-235. (Ma S M. Pathogenic pathogen categories distribution and germplasm resistance identification of soybean root rot in Heilongjiang province [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(27): 230-235.)
- [5] Ho H H. The genus *Pythium* in mainland and China [J]. Mycosystema, 2013, 32(S1): 20-44.
- [6] 李金花, 柴兆祥. 甘肃腐霉新记录种 *Pythium carolinianum* 的分离鉴定及 rDNA-ITS 序列分析[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2010, 46(6): 84-95. (Li J H and Cai Z X. A new record of *Pythium carolinianum* in Gansu province and its isolation, identification and rDNA-ITS sequence analysis [J]. Journal of Lanzhou University (Natural Sciences), 2010, 46(6): 84-95.)
- [7] 朱振东. 大豆疫霉根腐病的发生和防治研究进展[J]. 植保技术与推广, 2002, 22(7): 40-42. (Zhu Z D. Progression of *Phytophthora* root rot of soybean research and prevention [J]. Plant Protection and Extension. 2002, 22(7): 40-42.)
- [8] 楼兵干, 张炳欣. 一种适合于从植物病组织中分离腐霉菌的选择性培养基[J]. 杭州电子工业学院学报, 2000, 20(3): 72-74. (Lou B G, Zhang B X. A medium selective for the isolation of *pythium* species from diseased plant tissues [J]. Journal of Hangzhou Institute of Electronic Engineering, 2000, 20(3): 72-74.)
- [9] 柴兆祥, 李金花, 楼兵干, 等. 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[J]. 草业学报, 2009, 18(3): 126-135. (Chai Z X, Li J H, Lou B G, et al. Isolation, identification, and sequence analysis of rDNA-ITS of *Pythium* species sampled from rhizosphere soil of corn [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2009, 18(3): 126-135.)
- [10] 方忠达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 11-65. (Fang Z D. Research methods of plant disease [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 11-65.)
- [11] Broders K D, Lipps P E, Paul P A, et al. Characterization of *Pythium* spp. associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio [J]. Plant Disease, 2007, 91: 727-735.
- [12] Zhang B Q, Yang X B. Pathogenicity of *Pythium* populations from corn-soybean rotation fields [J]. Plant Disease, 2000, 84: 94-99.
- [13] 魏喙, 李文滨, 韩英鹏, 等. 大豆品种对四种腐霉菌的抗性研究[J]. 大豆科学, 2010, 29(6): 971-975. (Wei L, Li W B, Han Y P, et al. Identification of resistance to four *Pythium* species in soybean cultivars [J]. Soybean Science, 2010, 29(6): 971-975.)
- [14] 于洪久, 朱洪德, 刘丽君, 等. 腐霉菌侵染条件下大豆下胚轴中 PAL 和 POD 活性的变化[J]. 大豆科学, 2012, 31(3): 495-497. (Yu H J, Zhu H D, Liu L J, et al. PAL and POD activities of soybean hypocotyls infected by *Pythium* [J]. Soybean Science, 2012, 31(3): 495-497.)
- [15] Shehata M A. Response of susceptible and moderately resistant pea genotypes to interaction between *Rhizoctonia solani* and three other stem and root rot pathogens [J]. Plant Disease, 1983, 67(10): 1146-1148.
- [16] Wang X Y, Wen J Z. Species and pathogenicity of *Fusarium* causing soybean root rot in Northeast China [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2011, 33(4): 391-395.
- [17] 马淑梅. 黑龙江省大豆根腐病致病病原种类分布及抗病种质鉴定[J]. 中国农学通报, 2012, 28(27): 230-235. (Ma S M. Pathogenic pathogen categories distribution and germplasm resistance identification of soybean root rot in Heilongjiang province [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(27): 230-235.)
- [18] 张丽. 黑龙江省大豆尖镰孢抗源筛选、致病机理及遗传多样性分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014. (Zhang L. Resistant materials screening, pathogenic mechanism and genetic diversity analysis of *Fusarium Oxysporum* causing soybean root rot in Heilongjiang province [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2014.)
- [19] 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. (Chen X X, Zeng H C, Ho H H, et al. Application of molecular biology on taxonomy of *Pythium* [J]. Biotechnology Bulletin, 2007(5): 84-92.)
- [20] 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. (Lin J W, Que Y X, Chen T S, et al. Application of ribosomal DNA internal transcribed spacer in *Fungi* taxonomy [J]. Letters in Biotechnology, 2007, 18(2): 292-294.)
- [21] 陈凤毛. 真菌 ITS 区序列结构及其应用[J]. 林业科技开发, 2007, 21(2): 5-7. (Chen F M. Fungal sequences of ITS structure and its application [J]. China Forestry Science and Technology, 2007, 21(2): 5-7.)
- [22] Briard M, Dutetre M, Rouxel F, et al. Ribosomal RNA sequence divergence within the *Pythiaceae* [J]. Mycological Research, 1995, 99: 1119-1127.
- [23] Wang P H, White J G. Molecular characterization of *Pythium* species based on RFLP analysis of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA [J]. Physiological Molecular Plant Pathology, 1997, 51: 129-143.
- [24] Mastumoto C, Kageyama K, Suga H, et al. Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5.8S sequences of the ribosomal DNA [J]. Mycoscience. 1999, 40: 321-331.
- [25] Martin F N. Phylogenetics among some *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially encoded cytochrome oxidase II gene [J]. Mycologia, 2000, 92: 711-727.
- [26] 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. (Lou B G, Zhang B X. Phylogenetic relationships and ITS morphological characteristics among some *Pythium* species inferred from sequence analysis of rDNA ITS [J]. Mycosystema, 2005, 24(2): 207-220.)
- [27] 边传红, 王伟杰, 赵世民, 等. 烟草钟器腐霉的分子鉴定与致病力测定[J]. 农学学报, 2015, 5(1): 32-36. (Bian C H, Wang W J, Zhao S M, et al. Molecular identification and pathogenicity of *Pythium vexans* isolated from tobacco [J]. Journal of Agriculture, 2015, 5(1): 32-36.)
- [28] Bates G D, Rothrock C S, Rupe J C. Resistance of the soybean cultivar Archer to *Pythium* damping-off and root rot caused by several *Pythium* spp [J]. Plant Disease, 2008, 92: 763-766.