

# 几种分离土壤腐霉的方法

余永年\*

(中国科学院微生物研究所,北京)

腐霉 (*Pythium*) 有水生的、两栖的和陆生的,但大多数都腐生在土壤里,特别是富于有机质的潮湿土壤。在条件适合时,它们往往侵染植物,引起各类作物的根腐、基腐、绵腐、黄化及幼苗的猝倒病等,给农林业生产造成不同程度的损失<sup>[1,2,3]</sup>。有的腐霉能转换苗体<sup>[4]</sup>,有的能分泌果胶酶和纤维素酶等多种酶类<sup>[5,6,7]</sup>。在生物学基础理论研究方面,腐霉也常常被视为较理想的

对象。因此,对这类真菌进行研究,在生产实践和理论探讨方面都具有一定的意义。

植物病理学工作者一般多从受病植物或植株残余上,或将种子播于土中,从受病的幼苗上去分离腐霉<sup>[1,2,3,8]</sup>,这种方法不容易将纯腐生的、寄生性弱的和

---

\* 感谢乐静珠同志为本文绘制插图。

对寄主选择性较强的腐霉分离出来；土壤真菌分类学工作者，常采用各种选择性培养基去分离土壤真菌，但往往却忽视了对腐霉进行选择分离，所以在这类报告中腐霉的种类和数量也是很有限的<sup>19, 10, 11</sup>。有人用五氯硝基苯等加入马丁培养基中，据说对分离腐霉有效<sup>11</sup>，我们初步试用了一下，结果不太理想。在研究这类真菌时，我们探索和比较了从土壤中分离腐霉的多种方法<sup>12, 13, 14</sup>，其中以平皿法、饵诱法、诱生法较好，现作简单的介绍。

本实验所用土壤样品采自北京西郊中关村菜园地，在5个点采土，取土深度0—10厘米，土重约500克，采土时间4月26日，土温10—13℃，土壤pH5.5，该地种植作物为菠菜，间作有葱和蒜。采土工具及盛器(广口瓶)，均经灭菌。土壤带回实验室立刻进行分离，现将三种分离方法的步骤及结果简述如下。

## 平皿分离法

平皿分离法是在直径约9厘米的培养皿内进行的。用了4种培养基：①清水-琼脂培养基，②马铃薯-蔗糖-琼脂培养基，③胡萝卜-琼脂培养基，④玉米粉-琼脂培养基；4种放土方式：①1/10土液1毫升与未凝固的(40℃左右)培养基混匀，②取0.1—0.25毫克土粒置于培养基下面(先放土粒再缓缓倾入培养基)，③挑取0.1—0.25毫克土粒放在培养基表面(图1)，

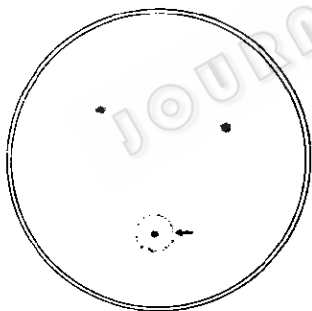


图1 平皿分离法：在培养基表面的土粒，“/”示长出待移植的菌落

④同③，再于土粒上加盖灭菌盖玻片；3种温度：20℃，25℃，30℃。每种处理重复3次，定时检查，见有菌丝长出，随即移植，并进行培养和鉴定。实验结果见表1。

从表1可以看出下列几个问题：(1)在所用4种培养基中，以玉米粉-琼脂培养基为最好，共出现腐霉14次(包括3个种)，占全部出现真菌的44.8%；胡萝卜-琼脂培养基次之，虽仅出现6次(占15.1%)，但腐霉的种类却较多(3个种)；清水-琼脂培养基最坏，未见有腐霉出现。(2)如以放土方式而论，以直接将土粒

放于培养基表面者为最好，腐霉出现率占全部出现真菌的27.2—33.3%；土粒放于培养基下面者次之，出现率为9.1—21.4%；1/10土液稀释法最差，未见有腐霉出现。(3)在3种不同温度下，以25℃为最好，腐霉出现率为23.6%；20℃次之，出现率为19.2%；30℃较差，出现率仅13.3%。(4)在平皿法的全部分离中，腐霉共出现23次，包括5个种：瓜果腐霉(*P. aphanicrmatum*)、缺性腐霉(*P. elongatum*)、绚丽腐霉(*P. pulchrum*)、喙腐霉(*P. rostratum*)和中国腐霉(*P. sinense*)，它们占全部分得真菌的19.2%。腐霉属以外的其他真菌共出现97次(占80.8%)，包括下列9个属：笋顶孢霉(*Acrostaglamus*)、放射毛霉(*Actinomucor*)、格孢霉(*Alternaria*)、曲霉(*Aspergillus*)、镰孢霉(*Fusarium*)、毛霉(*Mucor*)、根霉(*Rhizopus*)、青霉(*Penicillium*)和木霉(*Trichoderma*)。

养料丰富的马铃薯-蔗糖-琼脂培养基，适于多种真菌的生长，但在这种培养基上，腐霉还竞争不过其它腐生菌，所以不宜用作分离腐霉的培养基。而营养贫瘠的清水-琼脂培养基，不能满足腐霉生长的要求，因此也不宜用。玉米粉-琼脂培养基虽说营养成分较少，缓冲作用亦差，一般真菌在这种培养基上的生长发育都很差，但却对腐霉的生育很适合，是分离和培养腐霉较理想的培养基。

大多数腐霉是好气的，所以将少量土粒放于培养基表面进行分离是有利的。加盖盖玻片后，有利于某些厌气性细菌的繁殖而不利于腐霉的生长。一般腐霉生长的最适温度为25℃左右或稍高，30℃左右或稍高有利于多数细菌的繁殖而抑制了腐霉的生长，所以25℃或稍低对于腐霉的分离较合适。

综上所述，用平皿法进行分离，以少量土粒放于玉米粉-琼脂培养基表面在25℃下进行是较好的方法。

## 饵诱分离法

将2克土样投入20毫升灭菌水中，于50毫升锥形瓶内，用手来回摇动(约120次/分钟)10分钟。另一处理为用往复式振荡器振荡(280次/分钟)10分钟。第三种处理为不摇动。然后分别将各种处理倾入1,000毫升容积的玻缸或烧杯中，再加灭菌水500—700毫升，将煮过的鸡蛋白、大麻籽(一部分去壳)及稻籽(去壳)投入，盖好玻盖，置于室温下，见有菌落(丝)长出，立即挑出，进行纯化、培养和鉴定(图2)。

此法分离结果详见表2。

表2说明了下列3个问题：(1)用饵诱法分离土壤中的腐霉，是一个较好的方法，特别是用手摇动后(120次/分钟)，效果更佳。在北京春季的土壤里，腐霉以菌丝的形态在土壤中活跃着，分离时，如用振荡器振荡，可能由于振荡过猛，易使腐霉的无隔菌丝受伤死亡，因

表 1 平皿分离法中不同培养基、放土方式及温度对霉菌及其他真菌出现的影响

培养基种类 放土方式 温度(°C)		腐霉 其他真菌	清水-琼脂培养基	马铃薯-蔗糖-琼脂培养基	胡萝卜-琼脂培养基	玉米粉-琼脂培养基	合计	
							出现次数	霉菌出现%
20	1/10 土液	腐霉 其他真菌	0(0)* 1(1)**	0(0) 6(3)	0(0) 4(4)	0(0) 1(1)	0(0) 12(5)	0.0
	土粒置于培养基下	腐霉 其他真菌	0(0) 3(1)	1(1) 3(3)	1(1) 3(3)	1(1) 2(2)	3(2) 11(6)	21.4
	土粒置于培养基上	腐霉 其他真菌	0(0) 3(1)	1(1) 7(2)	2(1) 2(2)	4(2) 2(1)	7(3) 14(3)	33.3
	同上,再加盖玻片	腐霉 其他真菌	0(0) 1(1)	0(0) 1(1)	0(0) 1(1)	0(0) 2(2)	0(0) 5(4)	0.0
	小 计	腐霉 其他真菌	0(0) 8(2)	2(2) 17(4)	3(2) 10(4)	5(3) 7(3)	10(5) 42(18)	19.2
25	1/10 土液	腐霉 其他真菌	0(0) 0(0)	0(0) 1(1)	0(0) 2(2)	0(0) 0(0)	0(0) 3(3)	0.0
	土粒置于培养基下	腐霉 其他真菌	0(0) 3(2)	1(1) 3(3)	1(1) 1(1)	1(1) 4(4)	3(3) 11(5)	21.4
	土粒置于培养基上	腐霉 其他真菌	0(0) 3(1)	0(0) 4(3)	2(1) 4(3)	3(2) 1(1)	5(3) 12(5)	29.4
	同上,再加盖玻片	腐霉 其他真菌	0(0) 0(0)	0(0) 1(1)	0(0) 2(1)	1(1) 0(0)	1(1) 3(1)	25.0
	小 计	腐霉 其他真菌	0(0) 6(2)	1(1) 9(3)	3(2) 9(4)	5(2) 5(3)	9(4) 29(14)	23.6
30	1/10 土液	腐霉 其他真菌	0(0) 0(0)	0(0) 2(2)	0(0) 2(2)	0(0) 1(1)	0(0) 5(4)	0.0
	土粒置于培养基下	腐霉 其他真菌	0(0) 2(1)	0(0) 3(2)	0(0) 3(2)	1(1) 2(1)	1(1) 10(2)	9.1
	土粒置于培养基上	腐霉 其他真菌	0(0) 2(2)	0(0) 3(2)	0(0) 3(2)	3(2) 0(0)	3(2) 8(4)	27.2
	同上,再加盖玻片	腐霉 其他真菌	0(0) 1(1)	0(0) 0(0)	0(0) 1(1)	0(0) 1(1)	0(0) 3(1)	0.0
	小 计	腐霉 其他真菌	0(0) 5(1)	0(0) 8(4)	0(0) 9(3)	4(2) 4(1)	4(2) 26(11)	13.3
总 计		腐霉 其他真菌	0(0) 19(3)	3(2) 34(8)	6(3) 28(6)	14(3) 16(5)	23(5) 97(9)	
腐 霉 出 现 %			0.0	8.1	15.1	44.8		19.2

\* 括弧内数字示腐霉种的数目。

\*\* 括弧内数字示其他真菌属的数目。

表 2 饵诱分离法中各种真菌出现的情况

诱		饵	真 菌		腐霉出现%
名 称	数 量	名 称	出现次数		
鸡 蛋 白 (手摇, 120次/分钟)	20	瓜果腐霉 ( <i>Pythium aphanidermatum</i> )	2	40	
		卡地腐霉 ( <i>P. carolinianum</i> )	2		
		缺性腐霉 ( <i>P. elongatum</i> )	4		
		笋顶孢霉 ( <i>Acrostalagmus sp.</i> )	1		
稻 籽 (手摇, 120次/分钟)	20	卡地腐霉 ( <i>P. carolinianum</i> )	2	50	
		缺性腐霉 ( <i>P. elongatum</i> )	8		
		异水霉 ( <i>Allomyces spp.</i> )	2		
		镰孢霉 ( <i>Fusarium spp.</i> )	4		
大 不 摇	20	树状异水霉 ( <i>A. arbuscula</i> )	8	0	
		长雌异水霉 ( <i>A. macrogynus</i> )	8		
		镰孢霉 ( <i>Fusarium spp.</i> )	3		
麻 振 荡 (280次/分钟)	20	缺性腐霉 ( <i>P. elongatum</i> )	4	30	
		绚丽腐霉 ( <i>P. pulchrum</i> )	2		
		异水霉 ( <i>Allomyces spp.</i> )	6		
籽 手 摇 (120次/分钟)	20	瓜果腐霉 ( <i>P. aphanidermatum</i> )	4	60	
		缺性腐霉 ( <i>P. elongatum</i> )	6		
		绚丽腐霉 ( <i>P. pulchrum</i> )	2		

而不如用手缓慢摇动效果好。如将土壤直接投入水中而不进行摇动, 土内的菌丝在水底的缺氧条件下, 可能对菌丝的生长和游动孢子的形成及其释放都是不利的, 所以效果也不好。(2) 用煮熟的大麻籽、稻籽和鸡蛋蛋白作为诱饵, 结果均较好, 共得分得 4 种腐霉, 出现率为 40—60%。(3) 用蛋白、淀粉和油脂 3 类物质作诱饵, 虽有一些差异, 但差异并不显著。

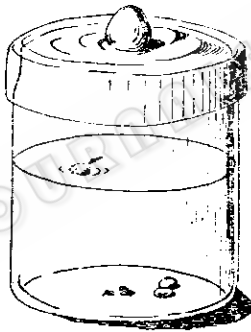


图 2 饵诱分离法: 长有菌落的诱饵多浮在水面, “/”示待移植的菌落

从上述情况看来, 在饵诱法分离中, 以将土样浸入水中, 用手缓慢摇动, 然后用大麻籽和鸡蛋蛋白等为诱饵, 分离效果较好。

### 诱生分离法

此法是将土壤直接放于直径为 12—15 厘米的培养皿内, 喷洒灭菌水使其保持高度湿润, 然后将表面灭菌的诱物(如梨、苹果、黄瓜和马铃薯等), 切成约 1 立方厘米大的小块, 放于土表(使少部分埋于土内), 置室温下, 见诱物上有菌丝体长出(图 3), 立即移植, 培



图 3 诱生分离法: “/”示诱物上生出的菌丝体, 待移植

养、鉴定。结果见表 3。

表 3 诱生法分离中各种真菌出现的情况

诱 物	真 菌		腐霉出现%
	名称	出现次数	
梨	缺性腐霉 ( <i>Pythium elongatum</i> )	5	80
	绚丽腐霉 ( <i>P. pulchrum</i> )	2	
	喙腐霉 ( <i>P. rostratum</i> )	1	
黄瓜	瓜果腐霉 ( <i>P. aphanidermatum</i> )	4	40
	镰孢霉 ( <i>Fusarium spp.</i> )	2	
	未定属真菌	2	
苹果	(未见真菌出现)		
马铃薯	同 上		

表 3 的数据表明: (1) 此种分离法也是可行的, 不过要选择适当的诱物。(2) 在本实验中梨似较黄瓜好, 因为用梨块进行诱生, 腐霉出现的种类多、数量大, 而

表4 三种分离方法的比较

菌名		平皿法		饵诱法		诱生法		合计	
		玉米粉-琼脂培养基	胡萝卜-琼脂培养基	稻籽	大麻籽	梨	黄瓜	出现次数	出现%
<i>Pythium aphanidermatum</i> (瓜果腐霉)		6	1		4		4	15	27.7
<i>P. carolinianum</i> (卡地腐霉)				2				2	3.7
<i>P. elongatum</i> (缺性腐霉)		4	4	8	6	5		27	50.0
<i>P. pulchrum</i> (绚丽腐霉)					2	2		4	7.4
<i>P. rostratum</i> (喙腐霉)						1		1	1.9
<i>P. sinense</i> (中国腐霉)		4	1					5	9.3
总计	出现次数	14	6	10	12	8	4	54	
	出现%	44.8	15.1	50.0	60.0	80.0	40.0		

且其它杂菌也较少。但是,在后来的大量分离中,黄瓜却显示出较大的优越性。(3)苹果和马铃薯似不能用,因未见有任何真菌被诱生。这可能由于这类诱物中含有某些不利于真菌生长的生物碱或其它有碍生长的物质。马铃薯块茎中就含有马铃薯素(由马铃薯碱和三糖组成)和矮铃薯素(由矮铃薯碱和四糖组成)等,这类生物碱对许多生物都是有毒的。

## 讨 论

1. 在富于有机质的菜园土内,无论在种类和数量上,腐霉都是相当丰富的。然而,往往由于分离方法的不够完善,常常难于如实反应这类真菌的真实情况。尽管在本实验所用的同一块土壤中便分离出了6种不同的腐霉(详见表4),但是我们完全有理由相信,这块菜园地土壤里的腐霉一定不只6个种。实际上,我们后来的工作也证明了此点,即在这块土的小麦根上还分离出了禾生腐霉(*Pythium graminicolum*),这个种曾有人从土壤中直接分离出来过,而本实验所用3种方法均未分离出来。

表4指出:(1)该菜园土的腐霉甚为丰富,以缺性腐霉和瓜果腐霉为最多,出现率分别为50.0%和27.7%。(2)在6种腐霉中,仅上述两个种可以用前述3种方法中的任何一种将其分离出,而其余4个种,则需用不同的方法才能分离出,如中国腐霉仅在乎皿法中分得。由此看来,如欲从土壤中分离腐霉获得较好的结果,最好3种方法同时使用,或采用其它更好的分离方法。

2. 根据对以上分离方法的初步研究结果,应用于后来对全国各地所采400多号土样的分离,同时增加了诱饵的种类、减少了平皿法中不适宜的培养基种类。现将已鉴定的菌种总结如表5。

表5的情况说明了下列几个问题:(1)在所列已鉴定的33种腐霉中,如前所述,仅有两个种在3种分

离方法中均可分得;有16个种仅在一种分离方法中分得;其余15个种在两种分离方法中出现。这再一次说明了3种方法同时使用的合理性和必要性。(2)在饵诱法中用煮熟的大麻籽、鸡蛋及稻籽等作诱饵具有较突出的优越性;在诱生法中则以黄瓜和梨等较好。此外,在饵诱法中,我们还用了向日葵籽、棉籽、松籽、菜豆、小麦及蚊虫等;在诱生法中还用了冬瓜、苦瓜、柿子椒、甘薯、马铃薯、枣、藕及苹果等,效果均不好。(3)中国土壤中常见的腐霉为:瓜果腐霉、卡地腐霉、绚丽腐霉和刺腐霉等。在新疆的乌鲁木齐和西藏的拉萨等地所采集的数批土样中,从未分离出过腐霉,其原因值得进一步探索,研究。(4)中国的腐霉,特别是植物寄生性腐霉,以前有不少人曾进行过研究<sup>[1,2,3]</sup>,到1958年止,总共报告7个种<sup>[13]</sup>,但是我们用上述3种方法分离土壤里的腐霉,再加上少数其他来源(如从植物上和水体中分离),在较短期间内便分离出大量的菌种,已鉴定的种近40个,其中包括5个新种<sup>[16]</sup>。而全世界已报道的腐霉才90个种左右。这不仅说明了中国的真菌资源极为丰富,而且也说明这些分离方法的有效性。

## 小 结

1. 腐霉是一属经济意义较大的真菌,它们大多腐生在富于有机质的潮湿土壤里。平皿法、饵诱法、诱生法3种分离方法同时使用,可将土壤中寄藏的大多数腐霉分离出来。如本实验应用上述3种方法,仅从一块菜园土内便分离出来6种腐霉,后来又以同样方法从全国各地土壤中分离出大量腐霉,已鉴定者就有33个种。

2. 平皿法是采用玉米粉-琼脂培养基,在它的表面置放少许土粒(0.10—0.25毫克),在20—25℃下进行分离。饵诱法是将2克土样投入20毫升灭菌水中,在50毫升锥形瓶内用手摇动(约120次/分钟)10分钟,然后倾入玻缸中,再加灭菌水500—700毫升,投

表 5 应用上述三种方法分离全国各地土壤中腐霉 (*Pythium*) 的情况

菌名	分离方法	平皿法 (CMA)	诱 法					诱 生 法					合 计		
			鸡蛋白	鸡蛋黄	苍蝇	大麻籽	稻籽	大豆	黄 瓜	西 瓜	茄 子	番 茄		胡 萝 卜	梨
<i>P. acanthicum</i> (短刺腐霉)		+												1	
<i>P. acrogynum</i> (顶生腐霉)					+									1	
<i>P. adhaerens</i> (粘腐霉)		+												1	
<i>P. amasculinum</i> (孤雌腐霉)		+									+			2	
<i>P. aphanidermatum</i> (瓜果腐霉)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	
<i>P. carolinianum</i> (卡地腐霉)			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	
<i>P. connatum</i> (壁合腐霉)		+												1	
<i>P. coloratum</i> (色孢腐霉)		+												1	
<i>P. debaryanum</i> (德巴利腐霉)													+	1	
<i>P. deliense</i> (德地腐霉)		+												1	
<i>P. dissotocum</i> (无柄腐霉)			+	+	+	+								4	
<i>P. elongatum</i> (缺性腐霉)		+	+	+	+	+		+					+	7	
<i>P. gracile</i> (细囊腐霉)					+	+	+							3	
<i>P. indicum?</i> (印度腐霉)		+												1	
<i>P. indigoferae</i> (木蓝腐霉)		+						+						2	
<i>P. irregulare</i> (畸雌腐霉)						+	+	+						3	
<i>P. iwayamai</i> (岩山腐霉)					+									1	
<i>P. kunmingense</i> (昆明腐霉)		+						+						2	
<i>P. mamillatum</i> (乳突腐霉)		+												1	
<i>P. middletonii</i> (米顿腐霉)			+		+									2	
<i>P. monospermum</i> (筒囊腐霉)			+	+	+		+							4	
<i>P. paroecandrum</i> (侧雄腐霉)					+									1	
<i>P. periplocum</i> (缠器腐霉)		+												1	
<i>P. polymorphum?</i> (多形腐霉)			+											1	
<i>P. pulchrum</i> (绚丽腐霉)			+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	11	
<i>P. rostratum</i> (喙腐霉)			+										+	2	
<i>P. salinum</i> (盐腐霉)		+												1	
<i>P. salpingophorum</i> (角柄腐霉)				+										1	
<i>P. sinense</i> (中国腐霉)		+						+						2	
<i>P. spinosum</i> (刺腐霉)			+	+	+	+		+				+	+	8	
<i>P. torulosum</i> (簇囊腐霉)		+	+			+								3	
<i>P. ultimum</i> (极端腐霉)					+			+		+				3	
<i>P. vexans</i> (钟器腐霉)		+			+									2	
总 计 (种数)		17	9	9	5	14	8	6	10	3	4	4	4	7	33
			19					13							

\* “+”示有腐霉出现。

入煮熟的各种诱饵进行分离。诱生法是把土壤放于培养皿内,保持高湿,将表面灭过菌的诱物小部分埋于土内进行分离。

3. 北京中关村这块菜园土,真菌颇为丰富,除分离出 7 种腐霉 (*Pythium aphanidermatum*, *P. carolinianum*, *P. elongatum*, *P. gramincolum*, *P. pulchrum*, *P. rostratum* 及 *P. sinense*) 外,还分离出属于其它 10 个属 (*Acrostagium*, *Actinomucor*, *Allomyces*, *Alternaria*,

*Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* 及 *Trichoderma*) 的真菌。

### 参 考 资 料

- [1] 俞大绂等: *Lingnan Sci. J.*, 21: 45—61, 1945.
- [2] 俞大绂: 植物病理学报, 1: 177—182, 1955.
- [3] 俞大绂: *Peking Nat. Hist. Bull.*, 18: 281—288, 1950.

(下转第 9 页)

(上接第 31 页)

- [4] Charney, W. *et al.*: *Microbial Transformations of Steroids*. Acad. Press, New York, 1967.
- [5] Wood, R. K. S. & C. S. Gupta: *Ann. Bot.*, **22**: 309—319, 1958.
- [6] Winstead, N. N. *et al.*: *Phytopath.*, **51**: 270—273, 1961.
- [7] Taylor, E. E. & B. P. Marsh: *Canad. J. Microbiol.*, **9**: 353—358, 1963.
- [8] 泽田谦吉、陈其昌: 台湾博物学报, **16**: 199—213, 1926。
- [9] Barron, G. L.: in "Methods in Microbiology", pp. 405—427, Acad. Press, London & New York, 1971.
- [10] Gilman, J. C.: *A Manual of Soil Fungi*, 1—450pp., Iowa State College Press, U. S. A., 1957.
- [11] Singh, R. S.: & J. E. Mitchell: *Phytopath.*, **51**: 440—444, 1961.
- [12] Schmitthenner, A. F.: *Phytopath.*, **52**: 1133—1138, 1962.
- [13] Meredith, C. H.: *Phytopath.*, **30**: 1055—1056, 1960.
- [14] 俞大绂: 植物病理学和真菌学技术汇编, 卷一, 1—1133 页, 高教出版社, 1959。
- [15] 戴芳澜等: 中国经济植物病原目录, 1—500 页, 科学出版社, 1958。
- [16] 余永年: 微生物学报, **13**: 115—123, 1973。
- [17] Middleton, J. T.: *Mem. Torrey Bot. Club*, **20**: 1—171, 1943.
- [18] Waterhouse, G. M.: *Mycol. Pap.*, **109**: 1—15, 1967.
- [19] Domsch, K. H. and W. Gams: *Fungi in Agricultural Soils*, 1—290 pp., Longman, 1972.