

新疆棉花黄萎病菌病原种群监测研究

张莉¹, 段维军¹, 李国英¹, 杨之为²

(1 新疆兵团 绿洲生态农业重点实验室, 新疆 石河子 832003; 2 西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 采用致病性测定、营养亲和群测定及PCR 特异性扩增3种方法, 对新疆棉区采集的35个棉花黄萎病菌代表性菌系进行致病型鉴定。结果表明, 新疆棉花黄萎病菌存在强、中、弱3种不同的致病类型, 其中以中等致病类型居多。利用营养亲和群方法将新疆棉花黄萎病菌分为2个亲和群, 其中1个亲和群中的所有菌系均与标准落叶型菌系相亲和, 另1个亲和群中的所有菌系均与标准非落叶型菌系相亲和。利用棉花黄萎病菌落叶型特异引物进行PCR 特异性扩增, 有3个菌系扩增出550 bp 的落叶型黄萎病菌特异性片段。用营养亲和群及PCR 特异性扩增均进一步证实目前新疆存在落叶型黄萎病菌菌系。

[关键词] 棉花黄萎病菌; 致病性; 营养亲和性; PCR 扩增; 新疆棉区

[中图分类号] S435.621.2⁺4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)11-0189-05

新疆是我国最大的优质棉生产基地, 棉花生产已成为新疆的支柱产业。随着新疆植棉面积的迅速扩大和连作年限的延长, 棉花黄萎病发生日趋加重, 已严重影响新疆棉花生产的可持续发展^[1]。根据黄萎病菌对棉花品种致病力的强弱, 将黄萎病菌分为强、中、弱3种致病类型^[2]; 依据黄萎病菌侵染棉花后是否引起落叶, 将黄萎病菌分为落叶型与非落叶型^[3]; 其中以落叶型黄萎病菌的致病力最强, 危害最重。自我国江苏、山东、河北、河南等地相继报道存在落叶型黄萎菌系之后, 目前在新疆棉区有时也出现大片落叶和死株棉田, 与典型落叶型黄萎菌系危害的症状相似。为及时掌握新疆棉区黄萎病菌种群的变化, 探索用于棉花黄萎病菌落叶型菌系检测快速、简便、准确的方法, 本研究通过致病性测定、病菌营养亲和群测定及PCR 特异性扩增技术, 对新疆棉花落叶型黄萎病菌进行了检测, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试菌系

从新疆南、北疆棉区采集棉花黄萎病株, 用常规方法进行分离、纯化, 从中选出具有代表性的35个菌系做为供试菌系; 5个标准菌系, 即落叶型标准菌系T₉, 落151, 落153, 强₉₉₁和非落叶型标准菌系弱₇₇₄

(表1)。

1.2 棉花黄萎病菌致病性的测定

本试验采用3个棉花品种, 即唐棉2号(抗病), 鄂荆1号(感病)和中12(耐病)对供试菌系致病性进行测定, 方法参见文献[4]。

1.3 棉花黄萎病菌营养亲和性测定

1.3.1 培养基 (1)PSA 培养基, 用于培养、保存菌系。(2)WAC 培养基, 基本培养基(MM)、nit 突变体类型鉴别培养基(MO2, MH)的制备及nit 突变体的诱导和nit 突变体表型鉴定均参照Puhalla 等^[5]和Korolev 等^[6]的方法。

1.3.2 营养亲和性测定^[5] 将在MM 培养基上24培养4~5 d 的各菌系nit 突变体进行可能的全组合互补配对: 在MM 平板的中央放一菌系的突变体, 其他4个菌系的互补突变体置于四周, 间距1.0~1.5 cm, 24 培养, 如果形成茂密白色气生菌丝或浓密黑色微菌核带的即为两菌系可亲和。

1.4 棉花黄萎病菌PCR 特异性扩增

1.4.1 引物的设计与合成 选用Encarnacion 等^[7]设计的落叶型(D1/D2)引物。

D1: 5'-CAT GTT GCT CTG TTG ACT GG-3';

D2: 5'-GAC ACG GTA TCT TTG CTG AA-3'。

引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

· [收稿日期] 2006-03-17

[基金项目] 新疆兵团棉花枯黄萎病监测与防治研究项目; 新疆兵团绿洲生态农业重点实验室项目

[作者简介] 张莉(1970-), 女, 江苏如皋人, 副教授, 博士, 主要从事棉花病害研究。E-mail: zhangli7010@sohu.com

[通讯作者] 杨之为(1941-), 男, 陕西西安人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病害流行学和生态病理学研究。

E-mail: yzw_shta@163.com

表1 40 个供试菌系和标准菌系的名称、来源及寄主

Table 1 Name and source and host of 40 strains of *V. dahliae*

菌系 Strain	采集地点 Source	棉花品种 Cotton species	菌系 Strain	采集地点 Source	棉花品种 Cotton species
A -7	新疆阿克苏 Xinjiang A kesu	中 35 Zhong 35	S-428	新疆石河子 Xinjiang Shihezi	系 9 Xi 9
A -15	新疆阿克苏 Xinjiang A kesu	新海 14 X inhai14	T -431	新疆石河子 Xinjiang Shihezi	中 36 Zhong 36
B -38	新疆阿克苏 Xinjiang A kesu	中 35 Zhong 35	T -432	新疆石河子 Xinjiang Shihezi	辽 17 L iao 17
B -53	新疆阿克苏 Xinjiang A kesu	中 35 Zhong 35	U -435	新疆石河子 Xinjiang Shihezi	中 36 Zhong 36
C -96	新疆阿克苏 Xinjiang A kesu	新陆中 7 X inluzhong 7	500	新疆博乐 Xinjiang Bole	新陆早 13 X inluzao 13
C -97	新疆阿克苏 Xinjiang A kesu	新陆中 7 X inluzhong 7	509	新疆博乐 Xinjiang Bole	新陆早 13 X inluzao 13
C -98	新疆阿克苏 Xinjiang A kesu	新陆中 7 X inluzhong 7	510	新疆博乐 Xinjiang Bole	新陆早 12 X inluzao 12
E -117	新疆阿克苏 Xinjiang A kesu	中 35 Zhong 35	511	新疆博乐 Xinjiang Bole	新陆早 12 X inluzao 12
F -151	新疆库勒 Xinjiang Kuerle	中 35 Zhong 35	524	新疆博乐 Xinjiang Bole	新陆早 12 X inluzao 12
G -166	新疆库勒 Xinjiang Kuerle	未知 U nknown	536	新疆博乐 Xinjiang Bole	系 7 Xi 7
F -214	新疆和田 Xinjiang Hetian	中 35 Zhong 35	546	新疆奎屯 Xinjiang Kuitun	新陆早 9 X inluzao 9
J -224	新疆和田 Xinjiang Hetian	中 35 Zhong 35	575	新疆奎屯 Xinjiang Kuitun	系 9 Xi 9
J -229	新疆和田 Xinjiang Hetian	中 35 Zhong 35	584	新疆奎屯 Xinjiang Kuitun	系 9 Xi 9
K -246	新疆和田 Xinjiang Hetian	99B	585	新疆奎屯 Xinjiang Kuitun	系 5 Xi 5
K -257	新疆和田 Xinjiang Hetian	新彩 1 X incai 1	592	新疆石河子 Xinjiang Shihezi	新陆早 13 X inluzao 13
K -265	新疆和田 Xinjiang Hetian	南 6 Nan 6	强 991 Q iang 991	中国农科院植保所赠 CAA S	棉花 Cotton
M -404	新疆石河子 Xinjiang Shihezi	中 36 Zhong 36	弱 774 Ru 0 774	中国农科院植保所赠 CAA S	棉花 Cotton
P -410	新疆石河子 Xinjiang Shihezi	下 9 Xia 9	T 9	中国农科院植保所赠 CAA S	棉花 Cotton
Q -418	新疆石河子 Xinjiang Shihezi	中 36 Zhong 36	落 151 L uo 151	南京农业大学赠 NJAU	棉花 Cotton
S -425	新疆石河子 Xinjiang Shihezi	中 27 Zhong 27	落 153 L uo 153	南京农业大学赠 NJAU	棉花 Cotton

1.4.2 DNA 提取方法 总 DNA 的提取参考 Mercado-Blanco 等^[8]的方法。

1.4.3 PCR 反应体系和扩增条件 PCR 扩增的反应液总量为 25 μL,反应体系为: 10×Buffer 2.5 μL; 200 μmol/L dNTP 2 μL; 1.25 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 0.5 μmol/L 引物 D1, D2 各 1.25 μL, Taq 酶 1 U, 模板 1 μL, ddH₂O 14.7 μL。反应液在 PTC-200 热循环控制仪中进行扩增。扩增条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 56℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 3 min, 30 个循环; 最后 74℃ 延伸 10 min。扩增产物在 8 g/kg 琼脂糖凝胶上电泳,电泳后于紫外凝胶成像仪上观察结果,并扫描于计算机软件中保存。

2 结果与分析

2.1 棉花黄萎病菌致病性测定结果

在试验中发现,各供试菌系接种中 12、唐棉 2 号、鄂荆 1 号 3 个棉花品种后,一般 20 d 开始发病,35 d 左右达到发病高峰,根据各菌系对棉花品种的致病反应和病情指数划分致病型,即病情指数在 30.0 以上为感病(S);病情指数在 20.1~30.0 为耐病

(W);病情指数在 20.1 以下为抗病(R),具体情况见表 2。由表 2 可知,强致病类型包括 592, 511, 510, C-96 和 J-229 5 个菌系,占供试菌系的 14.3%,致病力大小与落 153 相似;中等致病类型包括 16 个菌系,占供试菌系的 45.7%;弱致病类型包括 14 个菌系,占供试菌系的 40.0%。由此可知,新疆棉花黄萎病菌以中等致病类型为主。此外,本研究还发现,标准菌系中以落 153 发病最早,发病进程快,发病严重,而其余几个标准菌系则发病较轻。供试菌系中以 592, J-229, K-265, S-428, G-166, F-151 发病较早,个别菌系(592, 511, J-229)接种后出现了典型的落叶型黄萎病症状。

2.2 棉花黄萎病菌营养亲和性测定结果

2.2.1 nit 突变体表型的鉴定 在试验中发现, WAC 培养基上培养 20~30 d 后开始陆续出现突变体的扇形面,40 个菌系共获得 240 个 nit 突变株,其中 nit A 169, 占总突变株的 70.3%, nit B 65 个, 占总突变株的 27.2%, nit C 6 个, 占总突变株的 2.5%, 各突变类型的突变率由高至低依次为 nit A > nit B > nit C。

表 2 40 个供试菌系和标准菌系在不同棉花品种上致病性测定结果

Table 2 Virulence variation of 40 different isolates inoculated into different varieties

菌系 Strain	棉花品种抗感反应 Reaction type			病情指数 Disease index	致病类型 Type	菌系 Strain	棉花品种抗感反应 Reaction type			病情指数 Disease index	致病类型 Type
	1	2	3				1	2	3		
落 153 L _{uo} 153	W	S	S	48 21	强 Strong	536	W	R	R	20 66	中 Mildness
592	S	S	W	40 10	强 Strong	B-38	W	W	R	20 31	中 Mildness
511	S	W	W	33 53	强 Strong	B-53	W	W	R	20 17	中 Mildness
510	S	W	W	32 05	强 Strong	强 ₉₉₁ Qiang ₉₉₁	W	R	R	19 87	弱 Feebleness
C-96	S	W	W	31 40	强 Strong	P-410	W	R	R	19 19	弱 Feebleness
J-229	S	R	R	31 09	强 Strong	U-435	S	R	R	18 99	弱 Feebleness
K-265	S	R	R	28 99	中 Mildness	A-7	W	W	R	18 52	弱 Feebleness
546	S	W	R	28 17	中 Mildness	C-98	R	R	R	18 00	弱 Feebleness
J-224	S	R	R	28 01	中 Mildness	K-257	S	R	R	17 30	弱 Feebleness
G-166	S	R	W	27 61	中 Mildness	F-151	W	R	R	17 21	弱 Feebleness
575	W	W	W	27 45	中 Mildness	584	R	R	R	16 47	弱 Feebleness
S-425	S	R	R	26 79	中 Mildness	524	R	W	R	15 55	弱 Feebleness
509	W	W	R	26 48	中 Mildness	500	W	R	R	13 67	弱 Feebleness
585	W	W	W	26 44	中 Mildness	A-15	R	R	R	13 39	弱 Feebleness
C-97	W	W	R	25 12	中 Mildness	弱 ₇₇₄ Ru _o 774	W	R	R	13 05	弱 Feebleness
S-428	S	R	R	23 72	中 Mildness	E-117	R	R	R	11 21	弱 Feebleness
T-431	S	R	R	23 19	中 Mildness	M-404	R	R	R	10 43	弱 Feebleness
K-246	S	R	R	22 55	中 Mildness	T-432	R	R	R	9 022	弱 Feebleness
Q-418	S	R	R	22 53	中 Mildness	I-214	R	R	R	8 53	弱 Feebleness
T ₉	W	W	R	22 46	中 Mildness	落 151 L _{uo} 151	R	R	R	6 73	弱 Feebleness

注: 1 鄂荆 1 号; 2 唐棉 2 号; 3 中 12; “R”表示抗病, 病情指数在 20 以下; “W”表示耐病, 病情指数在 20 1~ 30 0; “S”表示感病, 病情指数在 30 0 以上。
Note: Cotton variety: 1 Ej in 1 hao; 2 Tangm ian 2 hao; 3 Zhong 12; “R”show s Disease index is 0 1- 20 1, “W”show s Disease index is 20 1- 30 0, “S” show s Disease index is above 30 0

2.2.2 亲和性测定 对供试菌系及标准菌系的互补型突变体进行全组合配对培养, 17~ 28 d 后观察发现, 供试菌系分为亲和群 I (VCG I) 和亲和群 II (VCG II) 2 个营养亲和群, 其中亲和群 I 含有 T₉, 落 151, 落 153, 强₉₉₁ 4 个标准落叶型菌系和 K-265, 592 2 个新疆供试菌系; 其余的 34 个菌系属于亲和群 II, 即非落叶型菌系。用亲和性技术鉴定落叶型和非落叶型黄萎病菌菌系比较可靠^[5,9]。由此可知, 新疆棉

区已存在致病性强的落叶型黄萎病菌菌系。
2.3 棉花黄萎病菌 PCR 特异性扩增结果
利用落叶型黄萎病菌的专一引物 D1/D2, 分别以 5 个黄萎病菌的标准菌系及 35 个供试菌系的总 DNA 为模板进行 PCR 特异性扩增, 其中 T₉, 落 151, 落 153, 强₉₉₁, 592, K-265, 536 共计 7 个菌系扩增出特异性片段, 大小为 550 bp, 而标准菌系弱₇₇₄及其他供试菌系均未扩增出相应大小的片段(图 1)。

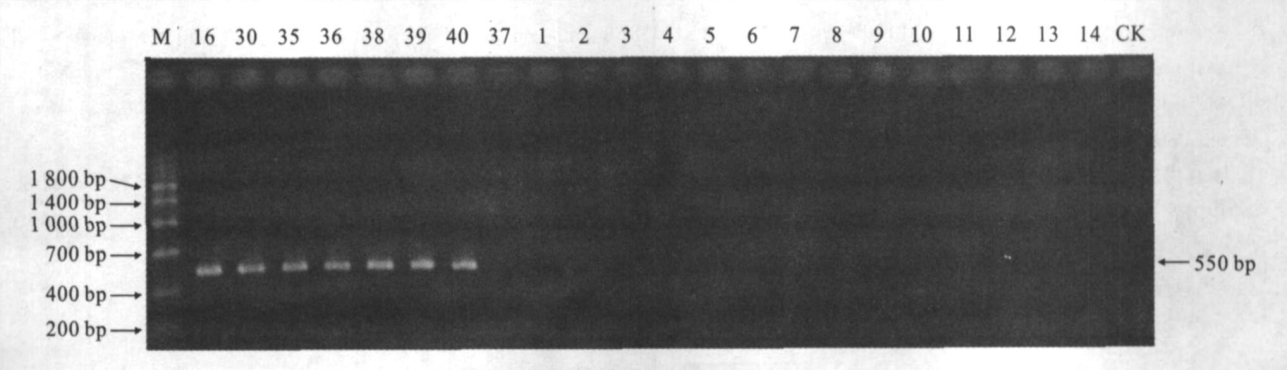


图 1 特异引物 D1/D2 对标准菌系和供试菌系的扩增结果

M. 分子量标记; 16, 30, 35 和 1~ 14 泳道为 592, K-265, 536, A-7, A-15, B-38, B-53, C-96, C-97, C-98, E-117, F-151, G-166, I-214, J-224, J-229, K-246 菌系的扩增结果; 36~ 40 泳道为标准菌系强₉₉₁, 弱₇₇₄, T₉, 落 151, 落 153 的扩增结果; CK 泳道为无模板的 DNA 扩增结果
Fig. 1 Result of PCR amplification with specific primers D1/D2 to standard strains and the tested strains
Lanes marked M is the ladder DNA; Lanes marked 16, 30, 35 and 1~ 14 is the result of amplification of the partly tested strains (592, K-265, 536, A-7, A-15, B-38, B-53, C-96, C-97, C-98, E-117, F-151, G-166, I-214, J-224, J-229, K-246); Lanes marked 36~ 40 is the product of amplification of standard strains (Qiang₉₉₁, Ruo₇₇₄, T₉, Luo 151, Luo 153); Lanes marked CK is the control with sterile water

由此可知,新疆存在落叶型黄萎病菌系,而且在南、北疆植棉区均有分布,但目前新疆棉花黄萎病菌仍以非落叶型黄萎病菌系为主,其中非落叶型黄萎病菌系占供试菌系的91.4%。

3 结论与讨论

本研究采用致病性测定、营养亲和性测定、PCR特异性扩增3种方法对新疆棉花黄萎病菌的致病性分化进行了研究。结果表明,目前新疆已存在致病力强的落叶型黄萎病菌系,而且在南疆和北疆植棉区均有分布,这在国内属首次报道,须引起高度重视。邹亚飞等^[10]和王莉梅等^[11]报道,落叶型黄萎病菌菌株内也具有强、中、弱的致病性分化,有些落叶型菌系的致病力并不一定比非落叶型菌系强,如本次研究中的K-265。但总体而言,目前在新疆棉区,致病力中等或致病力较弱的非落叶型黄萎病菌系,仍是新疆棉花黄萎病菌的主要致病类型。

快速、准确地鉴定棉花落叶型黄萎病菌系是控制该病扩展、蔓延和防治的主要条件。传统致病性测定方法简单、易于掌握,但温室接种工作量大,鉴定结果易受环境条件和人为因素的影响,其准确性

有待进一步提高。营养亲和性测定是建立在菌系间遗传物质交换基础上的,其能客观地反映病菌自身的生物学及遗传学特征,鉴定结果较为可靠,本研究也进一步证明了这一点,但该方法也有其局限性,如诱发突变体较费时,诱发的突变体易恢复为野生型,个别菌系难诱发到互补型的突变体等。PCR特异性扩增实现了对棉花黄萎病菌致病类型的快速检测,不仅快速、准确,而且避免了许多传统方法难以解决的问题。因此,为达到快速、准确检测危险性病害的目的,可以采用以特异性PCR扩增为主,营养亲和性测定、鉴别寄主测定等为辅的方法,从而构建一个棉花黄萎病菌检测平台,为棉花黄萎病菌预警检测体系提供技术支持。

在本试验中,536菌系与非落叶型棉花黄萎病菌系的标准菌系属于同一亲和群,但在PCR特异性扩增测定中归于落叶型黄萎病菌系,其他同类研究^[9-10]也曾出现类似情况。一般认为,该菌系在基因水平上可能兼有落叶型和非落叶型两种性状的控制位点。因此,可将536菌系作为落叶型和非落叶型菌系的一种过渡类型。

[参考文献]

- [1] 李国英,丁胜利,张莉.当前新疆棉花病虫害发生特点、问题及对策[J].新疆农垦科技,1997,7(增刊):111-114
- [2] 姚耀文.棉花黄萎病菌生理型鉴定的初步研究[C].中国棉花病害研究及其综合防治.北京:农业出版社,1984:53-59
- [3] Schnathorst W C, Mather D E. *Verticillium dahliae* strains in cotton in the Parump Valley, Nevada[J]. Plant Disease Report, 1975, 59: 863-865
- [4] 李国英,霍向东,田新莉,等.新疆棉花黄萎病菌的培养特性及致病性分化的研究[J].石河子大学学报,2000,4(1):8-15
- [5] Puhalla J E, Hummel M. Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae*[J]. Phytopathology, 1993, 83: 1305-1308
- [6] Korolev N, Katan T. Improved medium for selecting Nitrate-Nonutilizing (nit) mutants of *Verticillium dahliae*[J]. Phytopathology, 1997, 87: 1067-1070
- [7] Encarnacion P A, García-Pedrajas M D, Bejarano-Alcázar J, et al. Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes PCR analyses[J]. European Journal of Plant Pathology, 2000, 106: 507-517
- [8] Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Pérez-Artés E, et al. Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR[J]. Plant Pathology, 2001, 50: 609-619
- [9] 李延军.中国棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)营养亲和性研究[C].陈其焱,李典谟,曹赤阳.棉花病虫害综合防治及研究进展.北京:中国农业科技出版社,1990:364-369
- [10] 邹亚飞,简桂良,马存,等.棉花黄萎病菌致病型的AFLP分析[J].植物病理学报,2003,33(2):135-141
- [11] 王莉梅,石磊岩.北方棉区黄萎病菌落叶型菌系鉴定[J].植物病理学报,1999,29(2):181-189

Population monitoring study of *Verticillium dahliae* in cotton in Xinjiang

ZHANG Li¹, DUAN Wei-jun¹, LI Guo-yang¹, YANG Zhi-wei²

(1 Key Laboratory of Oasis Ecological Agriculture in Xinjiang, Shihezi, Xinjiang 832003, China;

2 College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The pathogenicity identification of 35 representative strains of *Verticillium dahliae* collected from the cotton-planted region in Xinjiang was studied using the methods of pathogenicity identification,

vegetative compatibility group and PCR specific amplification. The results show: (1) the strains of *Verticillium dahliae* in Xinjiang can be separated into three groups, namely strong, middle and weak. Among them, most of the strains belong to the middle group. (2) the strains of *Verticillium dahliae* in Xinjiang can be separated into two vegetative compatibility groups. All strains in one vegetative compatibility group can be fused with standard defoliating pathotype and all strains in the other vegetative compatibility group can be fused with standard nondefoliating pathotype. This result makes sure the presence of the defoliating pathotype strains of *Verticillium dahliae* in cotton. (3) The result of PCR amplification using the specific primer of defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in cotton shows that the specific fragment (550 bp) of defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* can be produced from three strains, which proves the presence of the defoliating pathotype strains of *Verticillium dahliae* in cotton in Xinjiang at present under the molecular level.

Key words: *Verticillium dahliae*; pathogenicity; vegetative compatibility; PCR amplification; cotton-planted region in Xinjiang

(上接第 188 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)11-0184-CA

Research about effect of soil physical properties on the variation of surface roughness under the condition of rainfall

ZHENG Zi-cheng^{1, 2a}, WU Fa-qi¹, HE Shu-qin^{2b}

(¹ College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

² Sichuan Agriculture University, a College of Resources and Environment,

^b College of Forestry and Gardening, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: On the basis of artificial rainfall experiments and contact roughness meter, the effect of soil physical properties on surface roughness was studied. Under the condition of rainfall density of 1.0 mm/min, the variation of roughness increased with the increase of soil physical clay gradually. The variation of roughness decreased generally with the increase of soil bulk density during the course of rainfall. The variations of straight slope and rake slope were higher than those of artificial hoe slope and contour tillage slope when soil bulk density was the same. The variation of roughness also decreased generally with the increase of soil moisture content during the course of rainfall and the variations of straight slope were higher obviously than those during the course of the same soil moisture content. At the same time, the quantitative analysis was done on the effect of the above soil physical factors on the variation of surface roughness. The results were that the variation of roughness had negative relationship with soil moisture content and soil bulk density, and had positive relationship with soil porosity.

Key words: rainfall; surface roughness; soil texture; soil bulk density; soil moisture content