

## 棉花黄萎病菌营养亲和性研究

李 艳, 杨家荣\*, 张慧霞, 周书涛, 许 楠

(西北农林科技大学植物保护学院, 陕西杨凌 712100)

**摘 要:** 为进一步研究病原菌的变异规律提供理论依据, 采用营养体亲和性方法, 于 2006 年 11 月对从陕西三原棉花黄萎病圃中分离得到的 26 株代表菌系及陕西省植保所提供新疆菌株和泾阳菌株进行了研究。结果表明: 经在 KPS 培养基上诱变培养, 28 个菌株共获得 295 个 nit 突变株, 且不同菌株的突变率差异较大。经鉴定: nit1 235 个, 占总量的 79.66%; nitM 59 个, 占总量的 20.00%; nit3 仅有 1 个。营养体亲和性配对测试表明: 28 个菌株可分为 2 个营养体亲和群(VCGs), 26 个代表菌株都与泾阳菌株亲和, 同属于亲和群 VCG1, 新疆菌株属于亲和群 VCG2。

**关键词:** 棉花黄萎病菌; 营养体亲和性

**中图分类号:** S562.02

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1004-1389(2007)06-0203-04

## Preliminary Study on Vegetative Compatibility Group of *Verticillium dahliae* in Soil

LI Yan, YANG Jia-rong\*, ZHANG Hui-xia, ZHOU Shu-tao and XU Nan

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

**Abstract:** In order to explicit the pathogenicity and vegetative compatibility (VGC) of *Verticillium dahliae* in soil and to provide the theoretical testimony for the aberrance rule of pathogen, in August 2006, we have identified 26 strains of *Verticillium dahliae* in the disease garden in the Doukou county, Shaanxi province and studied. Based on the formation of complementary heterokaryons, 295 Nitratononutilizing (nit) mutants were obtained from 28 strains which induced on KPS media, in which 235 mutants were Nit1, It accounted for 79.66% of the total; 59 mutants were NitM, only one strain was Nit3. They also showed that 28 strains were assigned to two vegetative compatibility groups (VCGs); 26 representative strains of *V. dahliae* and Jingyang strain were compatible with each other and classified into the first VC group (VCG1), while Xinjiang strain was classified into the second VC group (VCG2).

**Key words:** *Verticillium dahliae*; Vegetative compatibility

大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb)是一种世界性分布, 且寄主范围很广的植物病原真菌, 已报道可引起 660 种植物的黄萎病<sup>[1]</sup>。棉花黄萎病菌没有明显的寄主专化性, 利用棉花黄萎病菌在不同棉花品种上致病力的差异划分的生理小种或生理型受环境条件影响比较大, 存在着一

定程度的差异, 营养体亲和性在许多真菌中存在, 利用营养体亲和性及营养体亲和群技术来研究病菌的遗传变异、种群地理分布、生理小种分化、致病型预测、种群遗传分化、生物防治、病害流行与动态是一种较为可靠和灵敏的方法。并且已用于区分各菌系和建立种以下的次级分类单元。有研

收稿日期: 2007-04-25 修回日期: 2007-07-08

基金项目: 欧盟科技合作项目(ICA4-CT-2001-10001)。

作者简介: 李 艳(1981-), 女, 硕士研究生。E-mail: liyan00045@163.com。

\* 通讯作者: 杨家荣, 博导。E-mail: yljryang@cnipm.com

究表明,同一亲和群的菌株与另一亲和群的菌株是遗传隔离的。研究 VCGs 多样性,可以了解种群遗传结构、预测病害流行的趋势和发展动态及分析病害动态的原因<sup>[2]</sup>。

国内外许多研究证明,在植物病原真菌中,尤其在半知菌中营养体亲型往往与专化型、生理小种或某些致病型呈共同化的相关关系<sup>[3]</sup>,依据不能利用硝酸盐的突变体(nit)间营养体亲和性划分出的棉花黄萎病菌营养体亲和群(VCGs)与其生理小种间高度相关,即不同生理小种间营养体不亲和,而同一生理小种归属于一个或少数几个 VCGs。笔者研究了 26 种棉花黄萎菌株与 2 个已知的标准菌株(新疆菌和陕西泾阳菌)之间营养体亲和性,从生理学角度研究棉花黄萎病菌的群体结构,从而为进一步研究病原菌的变异规律提供理论依据。

# 1 材料与方法

## 1.1 供试菌株

2005 年 9 月从陕西三原棉花黄萎病菌圃土壤中经分离纯化得到的 26 株代表菌系,以及 2 个已知的标准菌株(新疆禾田菌系和陕西泾阳菌系)。

## 1.2 培养基制备

PDA 培养基:用于分离,纯化,保存菌种。

KPS 培养基:PDA 中加氯酸钾  $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,用于诱发 nit 突变体。BM 培养基:30 g 蔗糖,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.5 g  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,0.5 g KCl,10 mg  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,0.2 mL 微量元素溶液,20 g 琼脂,1 L 蒸馏水。微量元素溶液:5 g 柠檬酸,5 g  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,1 g  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,0.25 g  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,0.05 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,0.05 g  $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,95 mL 蒸馏水。MM 培养基:BM 培养基加入 2 g  $\text{NaNO}_3$ 。MO<sub>2</sub> 培养基:BM 培养基加入 0.5 g  $\text{NaNO}_2$ 。MH 培养基:BM 培养基加入 0.2 g 次黄嘌呤。

## 1.3 nit 突变体的诱发和突变类型的鉴定

将 PDA 平板上培养 7 d 的菌落打成 4 mm 的菌饼并接入 KPS 平板培养基中,每皿 2 块,25℃下培养 10~25 d,若发现从最初受抑制的菌落边缘出现扇形面,即转到 MM 培养基上,25℃培养 6~7 d 并与野生型菌株对照,在 MM 上呈扩展性生长,无气生菌丝,不产微菌核的即为 nit 突变体。然后将其转于 MM 斜面上保存备用。

将 nit 突变体转入 MO<sub>2</sub> 和 MH 培养基上 25℃培养并观察其形态。nit1 在 MO<sub>2</sub> 和 MH 上均呈野生型生长;nit M 仅在 MO<sub>2</sub> 上表现野生型而在 MH 上呈稀疏扩展性生长;nit3 仅在 MH 上表现为野生型生长。

表 1 各菌株 Nit 突变体的数量及营养亲和性

Table 1 Vegetative compatibility and mutants quantity of 28 strains of *Verticillium dahliae*

| 菌系<br>Strain | Nit 突变体类型 Nit type |      |      | VCGs |  | 菌系<br>Strain | Nit 突变体类型 Nit type |      |      | VCGs |
|--------------|--------------------|------|------|------|--|--------------|--------------------|------|------|------|
|              | Nit1               | NitM | Nit3 |      |  |              | Nit1               | NitM | Nit3 |      |
| B19          | 8                  | 4    | 0    | VCG1 |  | C17          | 8                  | 2    | 0    | VCG1 |
| A19          | 10                 | 3    | 0    | VCG1 |  | C20          | 10                 | 1    | 0    | VCG1 |
| B1           | 6                  | 2    | 0    | VCG1 |  | A9           | 8                  | 1    | 0    | VCG1 |
| B13          | 4                  | 2    | 0    | VCG1 |  | C9           | 7                  | 3    | 0    | VCG1 |
| C2           | 9                  | 1    | 0    | VCG1 |  | A7           | 9                  | 3    | 0    | VCG1 |
| B4           | 9                  | 0    | 0    | VCG1 |  | B23          | 10                 | 2    | 0    | VCG1 |
| B11          | 8                  | 3    | 0    | VCG1 |  | B15          | 8                  | 2    | 0    | VCG1 |
| C3           | 11                 | 3    | 0    | VCG1 |  | B22          | 13                 | 3    | 0    | VCG1 |
| B12          | 8                  | 3    | 0    | VCG1 |  | B8           | 15                 | 1    | 0    | VCG1 |
| A23          | 12                 | 2    | 1    | VCG1 |  | A8           | 7                  | 3    | 0    | VCG1 |
| A34          | 9                  | 1    | 0    | VCG1 |  | B2           | 7                  | 1    | 0    | VCG1 |
| C13          | 6                  | 3    | 0    | VCG1 |  | C6           | 0                  | 3    | 0    | VCG1 |
| C18          | 10                 | 2    | 0    | VCG1 |  | 泾阳           | 7                  | 1    | 0    | VCG1 |
| C14          | 10                 | 2    | 0    | VCG1 |  | 新疆           | 8                  | 2    | 0    | VCG2 |
|              |                    |      |      |      |  | 总计           | 235                | 59   | 1    |      |

## 1.4 营养体亲和性的测定

分别在各菌株的 nit 突变体中选择数个 nit1 和 nitM,与 2 个标准菌株的 nitM 或 nit1 在 MM

培养基上等距离配对接种,25℃恒温培养 2~3 周,若 nit1 与 nitM 生长菌丝发生融合,形成异核体并恢复野生型生长,则二者营养体亲和,反之则

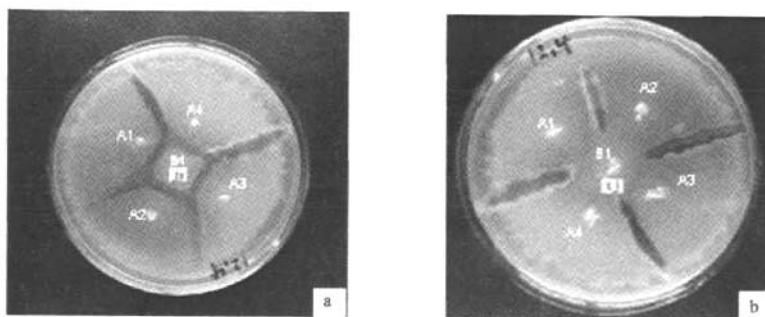
不亲和。

## 2 结果与分析

### 2.1 nit 突变株及其突变类型

在 KPS 培养基上培养 10 d 后开始陆续出现突变体的扇形面,28 个菌株共获得 295 个 nit 突变株,且不同菌株的突变率差异较大。经鉴定

nit1 共 235 个,占总量的 79.66%;nitM 共 59 个,占总量的 20.00%;nit3 仅有 1 个。各突变类型的突变率由高至低的顺序依次为 nit1>nitM>nit3,其中 nit1 在各菌株上均较易获得(表 1),然而有的菌株只获得了 nit1 型,如 B4;有的仅获得 nitM 型突变体,如 C6。



a. 泾阳菌和待测菌高度亲和, *V. dahliae* and Jingyang strain were compatible; b. 新疆菌株与待测菌不亲和(其中 A: NitM; B: Nit1), *V. dahliae* and Xinjiang strain haven't compatibility (A: NitM; B: Nit1)

图 1 棉花黄萎病菌菌株的营养体亲和性反应

Fig. 1 Vegetative compatibility reactions between colonies of *V. dahliae* isolates

### 2.2 菌株间的营养体亲和性

在本次试验中,所有供试菌株均能够自身亲和。分别以各菌株的 nit1 与泾阳菌株,新疆菌株的 nitM 在 MM 上进行等距离配对,而以各菌株的 nitM 与泾阳和新疆菌株的 nit1 配对,测定其营养体亲和性的结果显示:26 株待测菌株都与泾阳菌株亲和(图 2-a),同属于亲和群 VGC1,但营养亲和产生的亲和带形态特征却有着明显的差异(有的亲和带宽、密;而有的则较细、淡);26 株待测菌株与新疆菌株(VGC2)间无亲和性,(图 2-b);此外,在试验中还发现:不同突变类型间的营养体亲和性也不同,其中 nit1-nitM 的亲和性最好,其次是 nitM-nitM 的亲利, Nit3 与 nit1 或 nitM 也能亲和;另外,同一种突变类型的不同突变株所表现的营养体亲和性也有较大差异。

## 3 结论与讨论

营养亲合性(Vegetative compatibility)或异核体亲合性是指任何两菌株接触,融合并交换细胞质或核物质的遗传能力。这种重要的特性,实际上控制着真菌异质体和异核体的形成,在一些真菌中,营养亲合性是受着称之为 vic 或 het 的多个位点所调控,若两株真菌是营养亲合的,在大多数情况下,它们的一个或多个 vic 或 het 位点,就

必然具有相同的等位基因<sup>[4,5]</sup>。具有这种相互亲和现象的真菌就定为一个营养亲合群(VCG)。在遗传特性上,处于同一 VCG 中的菌株,比处于不同 VCG 中同种的其它菌株更为相似<sup>[6]</sup>。营养亲合性分析在仅有无性繁殖的真菌中特别有意义。因为,基于营养亲合性和异核现象研究,能将真菌种群进一步分成能交换遗传信息的 VCGs<sup>[7]</sup>。

杨家荣等在前人工作的基础上,选用有代表性的属于不同生理型的菌系,应用 Nit 突变体营养体亲和性技术,将供试的代表菌株划分为 4 个营养亲和群,江苏 VD-8 和美国 T-9 菌株亲和,属于第 4 亲和群,陕西泾阳、新疆和田、河南安阳菌株则分别属于第 1、2、3 营养亲和群<sup>[8]</sup>。本次研究发现从同一棉田土壤中分离所获 26 株棉黄萎病菌和陕西泾阳菌株同属于一个亲和群(VGC2),但各菌株间亲和程度差异较大,不同菌株间亲和性与其致病力强弱之间存在明显的相关性:即亲和带较宽,完成亲和时间较短的菌株一般致病力也较强,反之亦然。这是否说明棉花黄萎病菌同一 VCG 内在个体间存在着生理和遗传的差异,还需进行更深入地研究。

有文献报道, *V. dahliae* 的抗氯酸盐扇形变异的培养特征是:①以其浓密的菌丝生长与亲本

株的稀疏菌丝生长相区别;②以其薄的菌丝生长与野生型菌株的浓密生长相区别;③角变与亲本菌株皆为浓密生长,这是最常见的一种角变类型<sup>[9]</sup>。本试验的的突变体角变特征中未发现有“角变菌丝生长稀薄而原始菌株浓密生长”这一类型。出现最多的是角变和亲本菌株都为浓密生长。

在本研究中,大多数菌株都诱发出 Nit1 和 NitM,也有一些菌株只获得了 NitM 或 Nitl 型突变体,Nit3 型突变体只获得了一株(表 1)。资料显示,许多学者在他们突变体诱发实验中也未鉴定出 Nit3 型<sup>[10,11]</sup>。另外,一些研究还表明,在含硝酸盐培养基上,每一种类型的 Nit 突变体获得几率受诱发培养时培养基中所含氮源的影响<sup>[12,13]</sup>。因此,本次实验中 nit3 获得较少可能与 KPS 培养基中 N 源有关。试验发现,Nit3 与 nit1 或 nitM 也能亲和,但因本次实验只有一株 Nit3 突变体,突变机率太小,因此对于 Nit3 与其他类型突变体亲和度情况以及亲和的应用价值,还需做进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 王正芬.棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae* Kleb)的寄主种类鉴定[J]. 西北农业大学学报, 1987, 15(1):35~48.
- [2] Korolev N, Kantan T. Proved medium for selecting nitrate nonutilizing(nit) mutants of *Verticillium dahliae*[J]. Phytopathology, 1997,87:1067~1070
- [3] Wang K R. Vegetative Compatibility of Plant Pathogenic Fung Reviews on Genetic Study of Microor ganisms[M]. Shanghai:Fuda University Press,1993. 203~216.
- [4] Puhalla J E, Hummel M. Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae* [J]. Phytopathology,1983, 73: 1305~1308.
- [5] Wang K R. Vegetative Compatibility of Plant Pathogenic Fung Reviews on Genetic Study of Microor Ganisms[M]. Shanghai:Fuda University Press,1993. 203~216.
- [6] Puhalla J E, Hummel M. Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae* [J]. Phytopathology, 1983,73: 1305~1308.
- [7] 喻宁莉,陶小谷,王雪薇,等. 新疆棉花黄萎病菌营养体亲和性的量化评估及其营养体亲和和群体研究[J]. 新疆农业大学学报,2000,23 (1),7~11.
- [8] 杨家荣,Harris DC. 大丽轮枝菌 Nit 突变体产生及其营养亲和性测定[J]. 西北农业学报,1992,1(1):47~52.
- [9] Puhalla J E. Classification of Strains of *Fusariumoxy Sporumon* the Basis of Vegetative Compatibility[J] CanJBot. 1985,63,179~183.
- [10] JoaquimT R, Rowe R C. Reassessment of Vegetative Compatibility Relationships among Strains of *Verticillium dahliae* Using Niate-nonutilizingnts[J]. Phytopathology, 1990,80:1160~1166.
- [11] Strausbaugh C A. Assessment of Vegetative Compatibility and Virulence of *Verticillium dahliae* Isolates from Idaho Potatoes and Tester Strains[J]. Phytopathology, 1993,83: 1252~1258.
- [12] 霍向东,李国英,张 莉. 新疆棉花黄萎病菌营养体亲和性的研究 [J]. 石河子大学学报(自然科学版), 1999, 12 (3) 269~272.
- [13] Joaquim T R,Rowe R C. Vegetative Compatibility in Populations of *Fusarium oxysporum* from Soil and Potato Plants[J]. Phytopathology, 1991,81:552~558.

作者：李艳， 杨家荣， 张慧霞， 周书涛， 许楠， LI Yan， YANG Jia-rong， ZHANG Hui-xia， ZHOU Shu-tao， XU Nan  
作者单位：西北农林科技大学植物保护学院, 陕西杨凌, 712100  
刊名：西北农业学报   
英文刊名：ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA  
年，卷(期)：2007, 16(6)

参考文献(13条)

1. 王正芬 棉花黄萎病 (Verticillium dahliae Kleb.) 的寄主种类鉴定[期刊论文]-西北农业大学学报 1987(1)

2. Korolev N;Kantan T Proved medium for selecting nitrate nonutilizing(nit) mutants of Verticillium dahliae 1997

3. Wang K R Vegetative Compatibility of Plant Pathogenic Fung Reviews on Genetic Study of Microor Ganisms 1993

4. Puhalla J E;Hummel M Vegetative compatibility groups within Verticillium dahliae 1983

5. Wang K R Vegetative Compatibility of Plant Pathogenic Fung Reviews on Genetic Study of Microor Ganisms 1993

6. Puhalla J E;Hummel M Vegetative compatibility groups within Verticillium dahliae 1983

7. 喻宁莉, 陶小谷, 王雪薇 新疆棉花黄萎病菌营养体亲和性的量化评估及其营养体亲和群体研究[期刊论文]-新疆农业大学学报 2000(1)

8. 杨家荣 大丽轮枝菌Nit突变体产生及其营养亲和性测定[期刊论文]-西北农业学报 1992(1)

9. Puhalla J E Classification of Strains of Fusariumoxy Sporumon the Basis of Vegetative Compatibility 1985

10. JoaquimT R;Rowe R C Reassessment of Vegetative Compatibility Relationships among Strains of Verticillium dahliae Using Niate-nonutlilzingnts 1990

11. Strausbaugh C A Assessment of Vegetative Compatibility and Virulence of Verticillium dahliae Isolates from Idaho Potatoes and Tester Strains 1993

12. 霍向东, 李国英, 张莉 新疆棉花黄萎病菌营养体亲和性的研究[期刊论文]-石河子大学学报(自然科学版) 1999(4)

13. Joaquim T R;Rowe R C Vegetative Compatibility in Populations of Fusarium oxysporum from Soil and Potato Plants 1991

本文读者也读过(8条)

1. 张莉, 马慧宁, 陈文霞, 吴旭双, 李国英 石河子地区棉花黄萎病菌致病型监测研究[期刊论文]-安徽农业科学 2007, 35(16)

2. 许爱玲, XU Ai-ling 山西省棉花黄萎病菌致病力分化研究[期刊论文]-山西农业科学2006, 34(1)

3. 顾美英, 徐万里, 茆军, 梁智, 宋素琴, 霍向东 新疆棉花黄萎病发病株根际土壤微生物生态特征研究[会议论文]-2008

4. 许楠, 张慧霞, 杨家荣, 李艳, XU Nan, ZHANG Hui-xia, YANG Jia-rong, LI Yan 陕西关中地区棉花黄萎菌营养亲和性研究[期刊论文]-棉花学报2008, 20(5)

5. 张莉, 段维军, 李国英, 杨之为, ZHANG Li, DUAN Wei-jun, LI Guo-ying, YANG Zhi-wei 新疆棉花黄萎病菌病原种群

[监测研究\[期刊论文\]-西北农林科技大学学报（自然科学版）2006, 34\(11\)](#)

6. [刘培源](#), [高峰](#), [韩宏伟](#), [门光耀](#), [张涛](#), [任毓忠](#), [杜娟](#), [李国英](#), [LIU Pei-yuan](#), [GAO Feng](#), [HAN Hong-wei](#), [MEN Guang-yao](#), [ZHANG Tao](#), [REN Yu-zhong](#), [Du Juan](#), [LI Guo-ying](#) [棉花植株内黄萎病菌致病类型的快速检测\[期刊论文\]-新疆农业科学2010, 47\(4\)](#)
7. [邹亚飞](#), [简桂良](#), [马存](#) [棉花枯、黄萎病菌营养亲和性研究进展\[期刊论文\]-棉花学报2004, 16\(3\)](#)
8. [李国英](#), [霍向东](#), [田新莉](#), [张升](#), [张云](#) [新疆棉花黄萎病菌的培养特性及致病性分化的研究\[期刊论文\]-石河子大学学报（自然科学版）2000, 4\(1\)](#)

#### 引证文献(5条)

1. [景岚](#), [裴旭](#), [杨柳青](#), [李莉](#), [周洪友](#), [赵君](#) [向日葵黄萎病菌营养亲和性及致病力分化\[期刊论文\]-中国油料作物学报2014\(01\)](#)
2. [郝荷荷](#) [湖北省棉花黄萎病菌与品种的互作研究\[学位论文\]硕士 2011](#)
3. [史认辉](#) [棉花抗黄萎病鉴定技术研究\[学位论文\]硕士 2010](#)
4. [丁锦平](#) [陆地棉对河南商丘强致病力棉花黄萎病菌的抗性反应研究\[学位论文\]博士 2010](#)
5. [裴旭](#) [向日葵黄萎病菌的遗传多样性研究\[学位论文\]硕士 2011](#)

引用本文格式: [李艳](#), [杨家荣](#), [张慧霞](#), [周书涛](#), [许楠](#), [LI Yan](#), [YANG Jia-rong](#), [ZHANG Hui-xia](#), [ZHOU Shu-tao](#), [XU Nan](#) [棉花黄萎病菌营养亲和性研究\[期刊论文\]-西北农业学报 2007\(6\)](#)