

陕西棉花黄萎病菌致病力分化及其遗传多样性

毛 岚 宋培玲 杨家荣*

(西北农林科技大学植物保护学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100)

摘要: 采用生物学培养性状、致病力测定和 ISSR 分子标记方法研究 15 个棉花黄萎病代表菌株的遗传变异。结果表明,供试菌株的生长速率、孢子产量与致病力的强弱呈正相关。致病力测定结果显示,致病力强的 I 型有 7 个菌株,占 46.67%,平均病情指数大于 36.1;致病力弱的 II 型有 3 个菌株,占 20.00%,平均病情指数在 21 以下;致病力中等的 III 型有 5 个菌株,占 33.33%,平均病情指数在 20~28 之间。用 4 条 ISSR 引物对这些菌株进行 PCR 扩增,共得到 623 个条带,具多态性的有 425 条。聚类分析和相似系数分析结果显示,在 0.55 遗传相似水平下,供试菌株分为 2 个遗传类型,遗传类型与菌株致病力类型存在明显的相关性,与菌株地理来源也具有一定的相关性。

关键词: 棉花黄萎病菌;致病力分化;简单序列重复区间 (ISSR);遗传多样性

Pathogenicity differentiation and genetic diversity of *Verticillium dahliae* of cotton in Shaanxi

Mao Lan Song Peiling Yang Jiarong*

(College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture,
Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China)

Abstract: In order to explore its pathogenicity differentiation, the 15 representative strains of *Verticillium dahliae* in cotton were determined by cultural characteristic observation, pathogenicity testing and ISSR molecular marking analysis. Results showed that there was the positive correlation of growth rate and conidia production of strains of *V. dahliae* to its pathogenicity. Pathogenicity differentiation of representative strains of *V. dahliae* tested with five cotton differential hosts was obviously found: Type I causing a severe defoliation with strong pathogenicity, Type II causing with weak pathogenicity, Type III causing with inter-mediate pathogenicity. Among them, strains of Type I, Type II and Type III occupied 46.67%, 20.0% and 33.3% of total examined strains and the average disease index of them was more than 36.1, less than 21 and between 20 to 28, respectively. The 623 bands were obtained by PCR amplification with 4 ISSR primers, which there were 425 polymorphic bands. The strains of *V. dahliae* were clustered into 2 genetic lineages at 0.55 genetic similarity and it showed that there were some relations of genetic lineages of *V. dahliae* to its geographical origin, pathogenicity and ISSR genetic variation.

Key words: *Verticillium dahliae*; pathogenicity differentiation; ISSR; genetic diversity

棉花黄萎病是一种世界性土传植物维管束萎焉
病害,其病原菌 *Verticillium dahliae* Kleb. 寄主范围

广、传播途径多、危害重,且存在着明显的致病力分
化^[1]。1977—1978年我国棉花黄萎病菌生理型联

基金项目:国家公益性农业科研专项(3-19)资助,教育部“长江学者”和创新团队发展计划(No. 200558)

作者简介:毛岚,女,1981 生,博士研究生,研究方向为棉花黄萎病的综合防治, email: yezi1981318@hotmail.com

* 通讯作者(Author for correspondence), email: yjrong@nwsuaf.edu.cn

收稿日期:2008-07-29

合试验组,用8省(区)10个棉花黄萎病菌系对9个鉴别寄主进行致病力测定认为,我国存在致病力强的生理型Ⅰ,以陕西泾阳菌系为代表;致病力较弱的生理型Ⅱ,以新疆和田菌系为代表;致病力中等的生理型Ⅲ,以河南安阳菌系为代表^[2]。之后,全国有关植棉省区相继报道棉花黄萎病菌有致病力分化现象。李艳等^[3]在陕西三原棉田土壤中分离出了引起不同症状表型的棉花黄萎病菌株,发现同一棉田不同菌株之间存在致病力变异。朱荷琴等^[4]研究发现河南安阳棉花黄萎病菌存在明显的致病力变异,其中菌丝型(AVS)菌株是新的致病力类型,其致病力高于陕西泾阳菌系和江苏落叶型菌系VD-8,也高于美国强致病力落叶型菌系T-9。

近年来,棉花黄萎病在陕西关中和渭北棉区持续发生危害,成为制约棉花生产优质高产的主要因素之一。国内外对棉花黄萎病菌的致病力分化已有很多研究,但对病原菌致病力分化与基因遗传多样性之间的关系报道很少。为了理清陕西关中和渭北棉区棉花黄萎病菌的致病力分化及其遗传多样性,作者2004—2007年对从陕西关中和渭北棉区采集分离的棉花黄萎病代表性菌株进行了培养性状、致病力分化和ISSR(Inter simple sequence repeat,简单序列重复区间)分子遗传标记的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

供试棉花黄萎病菌菌株为陕西关中和渭北棉区棉花病株上采集的单孢分离菌株:杨凌V42和V94、眉县V13和V26、兴平V35、礼泉V79、大荔V56、三原V17和V50、户县V9、浦城V24、富平V82、乾县V41。以致病力较强的陕西泾阳菌系和致病力较弱的新疆和田菌系为参照菌株。

1.2 方法

1.2.1 棉花黄萎病菌的培养性状测定

将棉花黄萎病单孢分离菌转接在PDA平板上,25℃恒温箱中培养15天,观察比较菌落形态和质地变化。

1.2.2 棉花苗期致病力测定

采用中棉、海岛棉和陆地棉的5个棉花鉴别寄主测定棉花黄萎病菌的致病力分化。鉴别寄主分别为:中棉石系亚、海岛棉7124、陕4080、陕2234、泗棉3号。其中,中棉石系亚,由中国农业科学院植物保护研究所简桂良先生提供;海岛棉7124、泗棉3号,

由中国农业科学院棉花所提供。供试棉花种子经脱绒、消毒后播种到营养钵中,置温室条件下培养。每个测试菌株接种5个鉴别寄主,每个鉴别寄主接种3钵,3次重复。待棉苗出土后,每钵留健苗4~5株。

测试菌株在PDA平板上培养10~15天后,用直径为4mm的打孔器在菌落边缘打取菌饼,接种到查彼得液体培养基中。在25℃、150r/min摇床上振荡培养15天后,培养液用纱布过滤制成孢子悬浮液。然后,用血球计数板在显微镜下观察计数悬浮液孢子数量,并将孢子浓度调到 1×10^6 个孢子/mL备用。

当棉苗长出3片真叶、1片心叶时,参考石磊岩等^[5]的方法进行伤根接种,并设清水接种对照。在棉株接种后的第15、20、25和30天,按全国棉花黄萎病苗期病情分级标准^[6],调查记载各处理的总株数、发病株数和病级,观察病害症状类型,并以第3次调查的病情指数划分供试菌株致病力的强弱^[7]。

1.2.3 棉花黄萎病菌的ISSR分析

将经查彼得液体培养基培养的菌丝体经纱布过滤,液氮冷冻后研磨成细粉。采用改进的SDS-CTAB(sodium dodecyl sulfate-cetyltrimethylammonium bromide,十二烷基磺酸钠-溴代十六烷基三甲胺)^[7]方法,提取菌丝体的DNA。扩增引物选用美国哥伦比亚大学公布的4条ISSR引物:885、889、818和842,序列为BHB(GA)₇、DBD(AC)₇、(CA)₈G、(GA)₈YG,由沃而尔森生物试剂公司合成。

ISSR反应体系为:dNTP 150 μmol·L⁻¹、引物0.5 μmol·L⁻¹、Taq DNA聚合酶1.5 U、DNA 2 mg·L⁻¹、10 X Buffer(KCl 50 mmol·L⁻¹、Tris-HCl 100 mmol·L⁻¹、MgCl₂ 20 mmol·L⁻¹) 2.5 μL。反应条件:94℃ 5 min,72℃ 45 s,1个循环;94℃ 45 s,最高退火温度45 s,每个循环降0.5℃,72℃ 45 s,30个循环;94℃ 45 s,最低退火温度45 s,72℃ 45 s,10个循环;72℃ 10 min,4℃保存。

1.2.4 数据处理

致病力测定数据采用SAS(statistical analysis system)统计软件包进行分析^[8],ISSR采用NYSTS 2.0软件^[9]统计数据。ISSR的PCR产物PAGE电泳图,按凝胶同一位置上DNA带的有无进行统计,有带的记为1,代表1个引物的结合位点,无带的记为0,生成0/1矩阵,仅记录清晰、可重复的条带。菌株间的相似系数采用Dice系数计算: $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$,式中 N_i 代表菌株*i*的条带数目, N_j 代表

菌株 j 的条带数目, N_{ij} 为菌株 i 和 j 共有带数目。采用 UPGMA (unweighted pair group arithmetic) 法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 棉花黄萎病菌的培养性状

供试菌株培养 15 天后, 根据菌落的培养性状及形态特征, 将 13 个供试菌株划分为菌核型 (AVH)、菌丝型 (AVS) 和中间型 (AVM) 三类。其中菌核型菌株 V56、V26、V79、V82、V13、V24、V17 和 V41 菌丝生长较密集, 菌落深黑色, 中央有白色或灰白色气生菌丝团, 分生孢子数量较多, 产生大量的微菌核。菌丝型菌株 V35 的菌落表面呈白色或浅黄色, 质地较硬、气生菌丝发达呈绒毛状, 无辐射状条纹, 无同心纹, 分生孢子多, 不产生微菌核。中间型菌株 V50、V9、V42 和 V94 的菌落边缘光滑, 分生孢子比菌核型多, 比菌丝型少, 产生的微菌核数比菌核型少, 颜色也较浅。

2.2 致病力测定

用 SAS 软件对各供试菌株的病情指数进行方差分析, 结果表明, 菌株间 $P=0.0016$, 鉴别寄主不同棉花品种间 $P=0.0002$, 均小于 0.05, 说明 5 个鉴别寄主间存在抗病或感病性差异, 同时, 也表明供试菌株间存在着明显的致病力变异。15 个供试菌株可划分为致病力较强的 I 型、致病力较弱的 II 型和致病力中等的 III 型 (表 1)。其中 I 型有 7 个菌株 (V56、V26、V79、V13、V82、V24、泾阳), 占 46.67%, 棉株发病早且重, 部分出现整株枯死, 平均病情指数大于 36.1。II 型有 3 个菌株 (V35、V94、和田), 占 20.00%, 棉株发病迟、病情轻, 多数叶片发黄, 未发现棉株枯死现象, 平均病情指数在 21 以下。III 型有 5 个菌株 (V17、V42、V41、V9、V50), 占 33.33%, 发病稍晚于 I 型菌株, 发病较重, 多数叶片产生黄绿相间的病斑, 个别出现整株枯死现象, 平均病情指数在 20~28 之间。

表 1 15 个棉花黄萎病菌系对 5 个棉花品种的致病力

Table 1 Pathogenicity testing with 15 strains of *Verticillium dahliae* defined as to 5 cotton differential cultivars

菌株 Strain	中棉石系亚 Shixiya		海岛棉 7124 Hai-7124		陕 4080 Shan 4080		陕 2234 Shan 2234		泗棉 3 号 Simian-3		平均 病指 Average disease index	致病力 类型 Pathogen- icity type
	病指 Disease index	反应型 Reaction type	病指 Disease index	反应型 Reaction type	病指 Disease index	反应型 Reaction type	病指 Disease index	反应型 Reaction type	病指 Disease index	反应型 Reaction type		
V56	29.6	T	29.4	T	49.5	S	19.2	R	55.3	S	36.6	I
V26	50.5	S	32.7	T	25.4	T	26.3	T	60.2	S	39.0	I
V79	12.4	R	24.9	T	55.3	S	31.2	T	56.7	S	36.1	I
V13	34.0	T	32.0	T	40.0	S	26.5	T	59.7	S	38.4	I
V82	24.5	T	45.7	S	43.2	S	35.6	S	37.9	S	37.4	I
V24	50.2	S	12.4	R	42.9	S	41.3	S	44.6	S	38.3	I
泾阳 Jinyang	30.4	T	37.8	S	44.8	S	42.1	S	45.0	S	40.0	I
V17	10.3	R	13.8	R	39.9	S	12.6	R	50.6	S	25.4	III
V42	18.0	R	16.8	R	32.8	T	21.8	T	25.9	T	23.1	III
V41	15.0	R	10.5	R	32.0	T	47.3	S	32.0	T	27.4	III
V9	15.0	R	41.5	S	16.4	R	25.8	T	34.7	T	26.7	III
V50	25.2	T	11.2	R	25.2	T	29.5	T	20.5	T	22.3	III
V35	16.5	R	14.3	R	24.7	T	23.6	T	22.4	T	20.3	II
V94	25.0	T	11.0	R	24.9	T	20.0	R	21.2	T	20.4	II
和田 Hetian	14.9	R	12.0	R	15.6	T	19.2	R	23.7	T	19.1	II

此外, I 型菌株对鉴别寄主, 特别是对陕 4080 和泗棉 3 号导致的病害较重, 病级大多达 4 级以上, 造成落叶光杆或死株。II 型菌株对鉴别寄主一般造

成轻微黄斑, 病级在 1~3 级之间。III 型菌株对鉴别寄主往往造成西瓜皮症状, 病级在 3~4 级之间。根据病害症状表现, 发病棉株以非落叶型为主, 占 56.3%,

落叶型病株占 43.7%。试验结果证实,近年来陕西棉花黄萎病严重发生与棉花黄萎病菌的致病力分化有关。

2.3 ISSR-PCR 检测

用 4 个引物对 13 个供试菌株进行 ISSR-PCR 扩

增,共扩增得到 623 个带条,其中具有多态性的 425 条,占 68.22%。分析结果表明,ISSR 标记可以很好地揭示出棉花黄萎病菌菌株间的遗传差异和亲缘关系,并显示棉花黄萎病菌具有丰富的遗传多态性(图 1)。

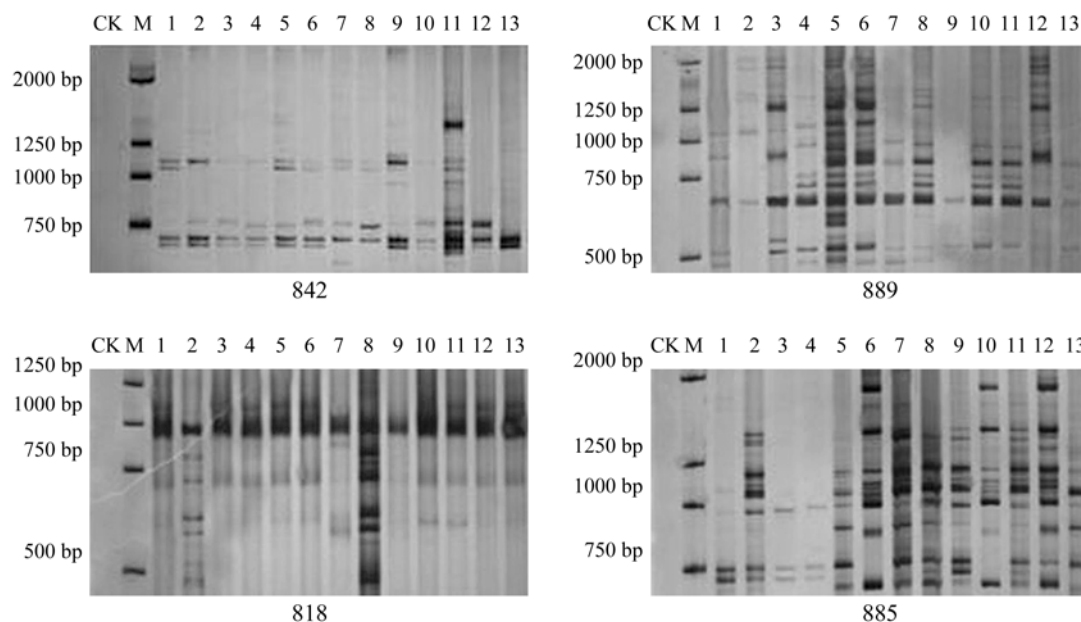


图 1 4 个引物对 13 个棉花黄萎病菌菌株的 PCR 扩增结果

Fig. 1 ISSR-PCR amplifications of different primers of 13 strains of *Verticillium dahliae*

注:1~13:菌株 V9、V35、V79、V82、V24、V17、V50、V42、V94、V41、V56、V13、V26;CK:无菌水;M:Marker。Note: 1-13 were strains V9, V35, V79, V82, V24, V17, V50, V42, V94, V41, V56, V13, V26; CK: sterile distilled water; M: marker.

2.4 供试菌株相关性及聚类分析

根据 ISSR 标记数据计算出供试菌株间的遗传相似系数,其变异范围是 0.22~1.00,其中 V94 和 V13 相似系数最低(0.22),V79 和 V26 相似系数最高(1.00)。表明部分菌株间的遗传差异较大。

在遗传相似系数 0.55 处,陕西省 10 个不同县区的 13 个供试菌株可分为 2 个遗传类型,类型 I 包括来自兴平的 V35 和杨凌的 V94 两个菌株;类型 II 包括来自户县、蒲城、三原等县区的 11 个菌株。另外,类型 II 又可进一步划分为 2 个亚类型,第一亚类型包括菌株 V9、V42、V50、V17 和 V24,第二亚类型包括其余的 6 个菌株(图 2)。这表明,棉花黄萎病菌的遗传类群与其地理来源有一定的相关性。

3 讨论

本研究结果表明,供试菌株菌落生长速率、产孢量与病原菌的致病力强弱呈正相关。这一结论与贾涛等^[10]关于棉花黄萎病菌的致病力分化加重危害和导致品种抗病性降低的观点相符。另外,供试菌

株存在明显的致病力分化,在 ISSR 遗传基因区域上也表现出变异。根据供试菌株遗传相似距离划分的 ISSR 类群与致病力类型之间存在着一定的相关性,其中除 V24 和 V41 菌株外,所有菌株的 ISSR 类群与致病力类群都一致。这与朱有勇等^[11]报道的棉花黄萎病菌 RAPD 指纹类型与病菌致病类群无相关性的结论不同,而与石磊岩等^[12]报道的棉花黄萎病菌 RAPD 指纹类型与病菌落叶与非落叶症状表型基本一致的研究结果相似。本研究结果还表明,ISSR 聚类分析与相似系数值的大小,在一定程度上与菌株间的亲缘关系和地理来源有关联,比如:来自礼泉的 V79 菌株和眉县的 V26 菌株完全相同,而关联性不强的杨凌 V94 和 V42 菌株分属于不同的亚类型,亲缘关系较远,这与邹亚飞等^[13]的研究结果相似。

鉴于 ISSR 指纹类型与致病力类群的相关性,以及 ISSR 分子标记准确快速、不受客观环境影响、试验周期短、重复性好和显性标记等特点,这种分子标记方法可供人们在棉花黄萎病菌的遗传分化和分子变异等方面的研究中应用。

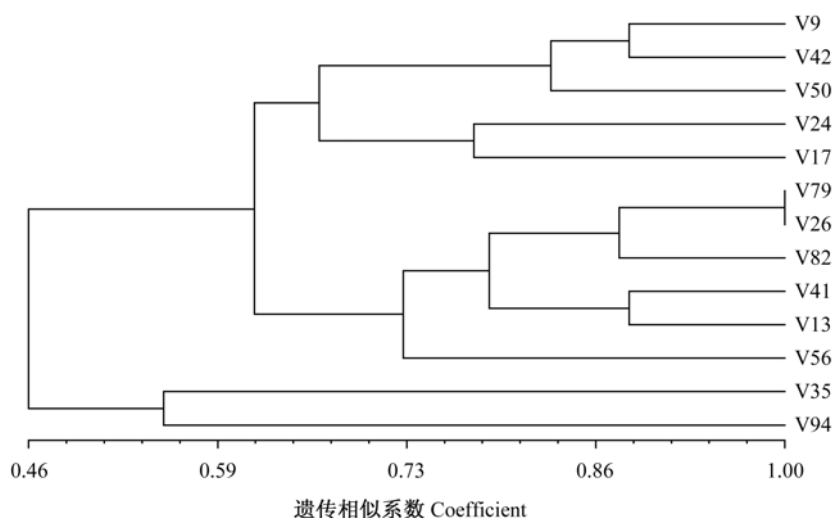


图 2 13 个棉花黄萎病菌菌株的聚类分析图

Fig. 2 Cluster analysis of genetic distances among 13 strains of *Verticillium dahliae*

参 考 文 献 (References)

- [1] 姚耀文,傅翠真,王文录,等. 棉花黄萎病生理型鉴定的初步研究. 植物保护学报,1982,9(3):145-148
- [2] 石磊岩,简桂良,孙文姬,等. 我国棉花黄萎病研究现状与方向. 植物保护学报,1998,25(2):103-107
- [3] 李艳,杨家荣. 土壤棉花黄萎病菌致病力分化的初步研究. 棉花学报,2007,19(4):291-295
- [4] 朱荷琴,宋晓轩,孙君灵,等. 棉花黄萎病菌安阳菌系致病类型变异研究. 棉花学报,1999,11(6):312-317
- [5] 石磊岩,王波,文学. 我国棉花黄萎病菌类型分化及培养特性研究. 植物保护学报,1993,20(3):247-252
- [6] 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. 石河子大学学报,2000,4(1):9-15
- [7] 吉贞芳,许爱玲,刘惠民,等. 山西棉花黄萎病菌致病性研究. 棉花学报,2004,16(5):280-285
- [8] SAS Institute Inc. SAS/STAT User's Guide. Release 8.1 Edition. North Carolina: SAS Institute Inc., 1999-2000
- [9] Rohlf F J. NTSYSPC numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02. Exeter Software, New York, 1998
- [10] 贾涛,裴国亮,杨家荣,等. 棉田土壤中棉花黄萎病菌的致病力分化. 植物保护学报,2007,34(5):519-523
- [11] 朱有勇,王云月,Dilbag S M,等. 棉花黄萎病菌致病类型及其分子指纹分析. 中国农业科学,1998,31(3):56-61
- [12] 石磊岩,王莉梅. 北方棉区棉花黄萎病菌 RAPD 分析. 植物保护,1997,23(5):3-7
- [13] 邹亚飞,简桂良,马存,等. 棉花黄萎病菌致病型的 AFLP 的分析. 植物病理学报,2003,33(2):135-141