

陈民志,张海萍,曲延英,等. 新疆棉花黄萎病菌生理型鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):70-72.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.021

新疆棉花黄萎病菌生理型鉴定

陈民志¹, 张海萍¹, 曲延英¹, 朱荷琴², 叶武威², 马前程¹, 刘莎¹, 聂梦颖¹, 顾爱星¹

(1. 新疆农业大学农学院/新疆维吾尔自治区高校农林有害生物监测与安防重点实验室,新疆乌鲁木齐 830052;

2. 中国农业科学院棉花研究所,河南安阳 455000)

摘要:通过分离、培养新疆南疆、北疆若干地点采集棉株中的黄萎病菌,对不同抗病性的棉花有效接种黄萎病菌,采用鉴别寄主法和特异性引物 PCR 检测技术来确定棉花黄萎病菌的类型。得出菌株 44-138 在 30 个棉花品种上均表现强的致病力。

关键词:棉花黄萎病;生理型;培养性状;鉴定法

中图分类号:S435.621.2⁺4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)04-0070-03

棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae* Kleb.) 是一种典型的土传植物维管束病害,在世界各主要植棉区均有发生,并呈日益蔓延的趋势,严重影响我国主产区新疆棉花的产量与安全^[1]。姚耀文等研究表明,新疆和田及车排子菌,生理型 2 号,致病力最弱^[2]。2000 年前,新疆没有落叶型黄萎病菌菌系的报道^[3]。2004 年,张莉等从南北疆各主要植棉区采样进行检测,发现在南北疆已存在落叶型菌系,但数量很少^[4]。2004 年,段维军等采用营养亲和和分子生物学的方法,再次证实新疆存在落叶型黄萎病菌菌系^[5]。根据 2008—2009 年对棉花枯萎病、黄萎病的调查,近年来,棉花黄萎病的发生日益严重,重病田明显增多,急性枯死型症状不断出现,给当地农业生产带来极其严重的损失^[6],培育抗病品种是目前防治棉花黄萎病的有效措施,抗病育种需要明确棉花黄萎病菌的生理型、致病性分化和简易、准确的鉴定方法。

本研究通过分离、培养新疆南疆、北疆若干地点采集棉株中的黄萎病菌,对不同抗病性的棉花有效接种黄萎病菌,鉴定棉花黄萎病抗病性,探明棉花黄萎病菌生理型的简易、准确鉴定方法,为棉花抗病性研究提供依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 棉花品种 共 30 份抗病性不同的棉花品种(系)。抗病品种(系):新海 16 号、新陆早 26 号、中棉所 35 号、中棉所 12 号、中棉所 17 号、爱字棉、军海 1 号、新海 20 号、中棉所 19 号、新陆早 12 号;耐病品种(系)分别为新陆早 48 号、辽棉

18 号、新陆早 11 号、冀 668、川 737、新陆中 42 号、新陆早 42 号;感病品种(系)分别为新陆早 1 号、新陆早 36 号、大铃棉、老炮台、108 夫、F2、硕丰 1 号、新陆早 13 号、苏 K202、新陆早 35 号、新陆早 16 号、新陆早 50 号。对照为感病品种军棉 1 号。所有棉花品种(系)均来自新疆农业大学农学院植物育种系。

1.1.2 供试感病棉花植株 供试感病棉花植株的采集地点和棉株数量见表 1。

表 1 感病棉花植株采集地点和棉株数

序号	采集时间 (年-月)	采集地点	感染棉花黄萎病棉株数 (株)
1	2014-08	石河子 132 团	4
2	2014-08	石河子 122 团	8
3	2014-07	南疆	5
4	2014-07	阿克苏 16 团	8

1.1.3 供试棉花黄萎病菌 以落叶型棉花黄萎病菌株 V76、V991 为对照,对照菌株由美国南部平原棉花研究所及南京农业大学提供。

1.2 方法

1.2.1 分离棉花黄萎病菌的方法 挑出发病棉株,留茎下部,洗净去皮,擦干,切成 1~3 mm 小块,用于无菌操作;在超净工作台,将切好的病棉小块材料先后置于 2% 的次氯酸钠、75% 乙醇和无菌水中各泡 1~2 min,用无菌纸拭干,移入含 0.01% 链霉素的 PDA 培养基,置于 25 °C 恒温培养箱培养;待菌株长出,进行纯化、镜检、培养性状观察;置于 -4 °C 冰箱中待用。

1.2.2 鉴别寄主法

1.2.2.1 棉苗培育 挑选饱满的棉种进行催芽处理,待种芽长度达到 1 cm 时播种^[7]。将催芽后的棉花种子种植在装有灭菌土的无底塑料钵中,每钵种植 6 粒种子,每个品种 10 钵,播种后将营养钵置于托盘内,托盘中灌满清水,放置在人工气候箱中培养,光照 12 h,温度 27 °C;黑暗 12 h,温度 22 °C^[8]。棉种出苗后,每个营养钵中留棉苗 3 株,待 2 张真叶展平时接菌^[9]。

1.2.2.2 接种黄萎病菌孢子液的制备 将分离培养的菌种

收稿日期:2015-12-16

基金项目:棉花生物学国家重点实验室开放课题(编号:CB2014A05);新疆农业大学大学生创新项目(编号:jqztp72013011);新疆维吾尔自治区科学技术厅高技术项目(编号:201111117)。

作者简介:陈民志(1993—),男,湖南邵阳人,主要从事植物保护教学与研究。E-mail:1179975730@qq.com。

通信作者:顾爱星,博士,教授,硕士研究生导师。研究方向为作物转基因、微生物资源利用和抗病虫分子克隆。E-mail:594903711@qq.com。

在 PDA 平板上活化 3 d 后,用打孔器在菌落上打孔,挑取 5~6 块菌丝块放置液体 PDA 培养基中,于 26 °C 下静置培养 3 d 后,挑取液体培养基表面的菌丝。转接到营养较少的液体 PDA 培养基中,放在 20 r/min、26 °C 的摇床里培养,7 d 后用 4 层纱布过滤,在显微镜下用血球计数板将孢子浓度调至 2×10^7 个/mL,现配现用。本研究采用营养较少的 PDA 培养基配方为马铃薯 50 g、蔗糖 5 g、蒸馏水 1 000 mL。

1.2.2.3 棉苗接种 采用接种方法为切根蘸菌法,用灭菌后的剪刀在塑钵的底部将棉苗的须根剪掉,然后放在盛有 30 mL 孢子悬液的培养皿中泡 10 min,然后放回托盘中。7 月 19 日挑选饱满的棉种,用 30% 的 H_2O_2 冲洗 3 次,最后 1 次浸泡 5 h 后,用无菌水冲洗 2~3 遍,最后用无菌水浸泡 12 h,将土于高压蒸汽锅中灭菌;7 月 20 日播种于直径 10 cm、高 10 cm 的有底塑料钵中,土下 3~5 cm 位置,7 月 27 日长出 2 片真叶,每钵留 3 株,将棉花黄萎病菌孢子浓度调至 2×10^7 个/mL,将棉株剪去底根放入其中泡 10 min,然后放回托盘中,每 2 d 浇水 1 次、记录 1 次,15 d 后开始零星发病,9 月 10 日调查。

1.2.2.4 抗病性鉴定 当感病对照的病情指数达 50 左右时,按全国统一标准调查不同品种的发病情况。采用相对病情指数来划分抗病类型。先用 50.0 除以本期感病对照实际病情指数,计算校正系数 K 值。为保证鉴定结果的准确性,要求 K 值范围 0.75~1.25。然后将供试品种实际病情指数乘以 K 值,即为相对病情指数(表 2)^[10-11]。

表 2 相对病情指数及反应型

反应型	抗病指数	相对病情指数
免疫(I)	0 级	0
高抗(HR)	1 级	0.1~10.0
抗病(R)	2 级	10.1~20.0
耐病(T)	3 级	20.1~35.0
感病(S)	4 级	35.1~100.0

计算公式:

$$\text{发病率} = \text{病苗总数} / \text{调查总数苗} \times 100\%$$

病情指数 = ε (发病级值 × 该级病叶数) / (最高发病级值 × 调查总叶数) × 100%。

$$\text{相对病情指数} (In) = K \times \text{鉴定品种的实际病指}^{[2]}$$

K 值的计算:

$$K = 50.00 / \text{DICK}$$

式中: K 表示校正系数;50.00 表示感病对照标准综合评价病情指数;DICK 表示本次鉴定感病对照综合评价病情指数。

接种后每隔 2 d 记录 1 次感病情况,播种 50 d 后,将棉苗全部剖茎检查,根据病情,分级记载(表 3)。

表 3 病情指数分级标准

病情指数	苗期	剖茎
0 级	无病	维管束不变色
I 级	真叶发病面积在 1/4 以下	棉茎下部维管束变色
II 级	真叶发病面积在 1/4~3/4	棉茎中下部维管束变色
III 级	真叶发病面积在 3/4 以上	子叶节以上维管束变色
IX 级	因病死亡	维管束变色,病死亡

1.2.2.5 生理型判定 美国 Schnathorst 等根据不同菌系对

棉花致病严重性和症状类型将其分为落叶型、非落叶型。国内以海岛棉、陆地棉、中棉三大棉种的不同抗感品种为鉴别寄主,依据致病力强弱将我国棉花黄萎病划分为强、中、弱 3 个生理型^[12];强表示平均病情指数在 30 以上;中表示平均病情指数为 20.0~30.0;弱表示平均病情指数在 20.0 以下(表 4)^[13]。

表 4 棉花生理型及致病力划分

指标	生理型		
	III 型	II 型	I 型
致病力	强	中	弱
平均病情指数	>30	20~30	<20

1.2.3 PCR 鉴别方法

1.2.3.1 DNA 的提取 各供试菌系在 PDA 平板上 25 °C 培养 15 d,采用天泽基因工程有限公司生产的柱式土壤 DNA out 试剂盒,按照说明书操作提取 DNA,将其保存在 -20 °C 冰箱中备用。

1.2.3.2 引物合成 PCR 特异性引物选用 Pérez - Artés 等设计的检测棉花黄萎病菌落叶型(D1/D2)、非落叶型(ND1/ND2)的 2 对特异性引物^[14],扩增片段大小分别为 550、1 500 bp。

1.2.3.3 PCR 反应体系及扩增条件 PCR 反应体系:10 × buffer(含 Mg^{2+}) 2.5 μL、200 μmol/L dNTP、0.5 umol/L 各引物、1 U *Taq* DNA polymerase、模板 1 μL,总体积 25 μL。扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,54 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,34 个循环;72 °C 延伸 10 min。

1.2.3.4 PCR 产物的电泳检测 PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,电泳结束后将琼脂糖凝胶置于含有 0.5 μg/mL EB 的染液中染色 15 min,然后置于凝胶成像仪上观察并扫描于计算机软件中保存。

1.2.3.5 统计分析 采用 Excel 2007 对数据进行初步处理,然后利用 SPSS 18.0 软件分析黄萎病相对病情指数与产量性状指标间的相关关系。

2 结果与分析

2.1 分离得到的棉花黄萎病菌

从各采集地点采集的感病棉花植株中分离得到的棉花黄萎病菌和分离率见表 5。

表 5 分离得到的棉花黄萎病菌及分离率

序号	采集地点	菌株名称	菌株数(株)	菌株分离率(%)
1	石河子 132 团	44-138	1	25.0
2	石河子 122 团	81-4	4	50.0
3	南疆	N-2	2	40.0
4	阿克苏 16 团	AKS-16	1	12.5

2.2 不同棉花品种(系)的抗病性

从表 6 可以看出,接菌 45 d 后,相对病情情况为耐病的有 6 个品种(系),感病的有 24 个品种(系),分别为参试品种的 20%、80%,平均相对病情指数为 41.4。

3 讨论与结论

棉花黄萎病菌致病性分化强,在发病区域快速准确地鉴

表6 接种棉花黄萎病菌株44-138后的棉株感病情况

品种	相对病情指数	反应型
军棉1号	50.00	S
新陆早36号	39.94	S
108夫	51.35	S
冀668	58.20	S
新陆早35号	47.07	S
新陆早12号	40.78	S
老炮台	41.37	S
新陆早42号	42.01	S
大铃棉	33.84	T
新陆早1号	39.94	S
新陆早16号	50.13	S
新陆早50号	33.76	T
新陆早48号	34.23	T
新陆中42号	30.49	T
新陆早13号	37.75	S
新陆早11号	34.85	T
军海1号	35.31	S
辽棉18号	37.75	S
苏K202	37.75	S
硕丰1号	40.65	S
新海20号	52.95	S
中棉所12号	34.23	T
中棉所17号	41.08	S
中棉所35号	39.68	S
川737	47.68	S
新陆早26号	36.91	S
爱字棉	38.51	S
新海16号	35.31	S
F2	49.51	S
中棉所19号	48.91	S

定出棉花黄萎病的致病性,对病情的防治有着重要意义。关于棉花致病性常见的检测方法有温室致病性测定、菌落培养性状比较和分子检测等方法,棉花黄萎病菌生理型的鉴定主要通过接种病原菌后的鉴别寄主抗感反应型进行划分^[15]。本试验通过鉴别寄主法得到棉株对菌株44-138的平均相对感病系数为41.4。郭景红等对近5年新疆审定通过的新陆早系列棉花品种抗黄萎病进行鉴定,新审定棉花品种抗黄萎病性较弱,仅有28%的品种鉴定抗病,32%的品种鉴定感病^[16];邵红忠对近几年新疆南部棉区示范和试种棉花品种进行了黄萎病抗病性鉴定,抗病品种占黄萎病鉴定材料的21.43%,没有抗病材料^[17]。本试验通过鉴别寄主法得到30个棉花品种(系)对菌株44-138仅有20%的品种(系)鉴定抗病,80%品种(系)鉴定感病,与前人研究结果一致。2004年,张莉等从南疆、北疆主要植棉区采样进行检测,发现在南疆、北疆已存在落叶型菌系,但数量很少^[4]。本试验验证了该结论。现在南疆、北疆都存在落叶型菌系,具体分布、致病力、生理型都不明确,还有待进一步研究分析。

从南疆、阿克苏16团采样地点的感病棉株中分离出

N-2、AKS16菌株,分离率分别为40.0%、12.5%。北疆石子122团、132团分离出了81-4、44-138菌株,分离率分别为50%、25%。从中选出44-138菌株进行鉴别寄主法鉴定,得出棉株平均相对感病系数为41.4,且每个棉株的相对感病系数都大于30.1,所以44-138菌株属强致病力菌系,生理型属生理I型。

参考文献:

- [1] 李国英,丁胜利,张莉,等. 当前新疆棉花病虫害发生特点、问题和对策[J]. 新疆农垦科技,1997(增刊1):111-114.
- [2] 姚耀文,傅翠真,王文录,等. 棉花黄萎病菌生理型鉴定的初步研究[J]. 植物保护学报,1982,9(3):148-154.
- [3] 霍向东,李国英,张升. 新疆棉花黄萎病菌致病性分化的研究[J]. 棉花学报,2000,12(5):254-257.
- [4] 张莉,段维军,李国英,等. 应用聚合酶链式反应鉴定新疆棉花落叶型黄萎病菌[J]. 植物检疫,2004,18(5):266-268.
- [5] 段维军,李国英,张莉,等. 新疆棉花黄萎病菌致病性分化监测研究[J]. 新疆农业科学,2004,41(5):324-328.
- [6] 韩宏伟,任毓忠,刘培源,等. 新疆南部棉区黄萎病菌种群致病性分化及变异[J]. 棉花学报,2012,24(2):147-152.
- [7] Bejarano-Alcázar J, Melero-Vaea J M, Blanco-López M A, et al. Influence of inoculum density of defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* on epidemics of verticillium wilt of cotton in southern Spain[J]. Phytopathology, 1995, 85:1474-1481.
- [8] Bolek Y, Bell A A, El-Zik K M, et al. Reaction of cotton cultivars and an F₂ population to stem inoculation with isolates *Verticillium dahliae*[J]. Phytopathology, 2005, 153:269-273.
- [9] 顾爱星,张翠芳,曲延英,等. 棉花组织结构与黄萎病抗性的关系[J]. 植物病理学报,2011,41(5):502-508.
- [10] Okoli C N, Carder J H, Barbara D J. Molecular variation and subspecific grouping within *Verticillium dahliae* [J]. Mycological Research, 1993, 97:233-239.
- [11] 吴献忠,李凤铃,王月福,等. 棉花黄萎病菌系及鉴定技术[J]. 植物病理学报,1996,26(3):281-282.
- [12] 王莉,杨秦一. 棉花黄萎病的研究进展[J]. 农业技术与装备,2011(2):15-16.
- [13] 韩宏伟,任毓忠,高峰,等. 石河子地区棉花黄萎病菌培养特性和致病力分化研究[J]. 新疆农业科学,2011,48(3):522-527.
- [14] Pérez-Artés E, García-Pedrajas M D, Bejarano-Alcázar J, et al. Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses[J]. European Journal of Plant Pathology, 2000, 106(6):507-517.
- [15] 金利容,万鹏,孔令甲,等. 棉花黄萎病菌生理型鉴定的主要方法综述[J]. 湖北农业科学,2008,47(11):1357-1360.
- [16] 郭景红,赵海,李玉国,等. 新疆审定棉花品种枯黄萎病抗性分析[J]. 中国种业,2011(3):35-36.
- [17] 邵红忠. 南疆示范试种棉花品种(系)黄萎病抗性初报[J]. 中国棉花,2011,38(6):29-30.