

## 一种检测棉花黄萎菌毒素致萎性的新方法—叶片针刺涂抹法

齐俊生, 李怀方\*

(中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094)

**摘要:** 用针在棉花叶片表面  $0.5 \text{ cm}^2$  的面积上刺 15~20 个小点, 然后将黄萎菌毒素溶液涂抹于针刺部位, 观察记载处理部位的萎蔫程度, 由此检测黄萎菌毒素对棉花致萎性的强弱。利用层析纯化的黄萎菌  $V_{991}$  毒素对棉花的致萎性试验表明: 棉苗的子叶为最佳接种部位, 毒素对陆地棉感病品种鄂荆 3 号的致萎下限为  $7.3 \mu\text{g}$ , 接种 24 h 即可表现萎蔫症状。用 8 个不同致病力黄萎菌系的培养滤液(简称滤液)针刺涂抹 3 个不同抗病性陆地棉品种, 同时设置相应毒素浸泡参比试验。结果表明, 利用培养滤液, 即可以快速、准确地检测滤液的致萎力强弱, 该方法既可用于棉花品种资源对黄萎病的抗性鉴定, 又可用于比较黄萎病菌的不同生理型。

**关键词:** 棉花; 黄萎菌毒素; 针刺涂抹方法; 致萎性检测

**中图分类号:** S435.621      **文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-7807(2006)04-0228-05

## A New Detection Method of Wilting Induction by Phytotoxin from *V. dahliae* on Cotton through Leaf Pricking and Spreading

QI Jun-sheng, LI Huai-fang\*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agriculture University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** A new method, measuring the extent of wilting by pricking on leaf surface and spreading on cotton, has been developed. First, *V. d. -toxin* (phytotoxin of *Verticillium dahliae*) of  $V_{991}$  which is a severe defoliating virulence strain of *Verticillium dahliae* on cotton was purified partially with Sephacryl S-200 HR; next, cotyledon or euphyla of seedling of cotton was pricked 15~20 pinhole in  $0.5 \text{ cm}^2$  area on the surface with small needle; then, *V. d. -toxin* was spreaded on it; and wilting symptom was recorded after 24 h, taking water and BSA as the control. The extent of wilting could be divided into 5 classes from 0 to IV after 24 h. Apart from the purified *V. d. -toxin*, the filtrate (liquid culture medium filtered after culturing *V. d.* over 7 days) can be taken as this method yet. To validate the method above further, 8 strains of *V. d.* have been selected to do the repeat tests, which belong to severe wilting strains( $V_{991}$ ,  $T_9$ ,  $V_{56}$  and  $V_{146}$ ), weakness wilting, strains( $V_{110}$ ,  $V_{246}$ ,  $V_{250}$ ) and medium wilting strain of  $V_{3-10-1}$ . By pricking on leaf surface and spreading *V. d. -toxin* on cotton individually, the answers appears that their potential power of wilting can be easily measured and divided into corresponded groups, such as  $V_{120}$ ,  $V_{991}$  and  $T_9$  belong to the severely type after testing. This dividing way is as same as the ever measurement with traditional ways (such as soaking seedling method). To identify the most suitable stage and part of the leaf to treat on cotton plant, we have tested to treat them both cotyledon and euphyla in seedling and euphyla in adult plant. As the result, this method can be utilized as early as in seedling stage, and cotyledon is better than euphyla since it is easy to prick but not to pore through. However, the extent of wilt has been appeared varying usually according to the temperature in environment, cotyledon or euphyla of seedling, and the concentration of *V. d. -toxin*. To identify the differential reaction of cultivars on

收稿日期: 2005-08-15      作者简介: 齐俊生(1963-)男, 博士, 副教授; \* 通讯作者, plpath@cau.edu.cn

基金项目: 国家 863 项目——植物无特定疫害人工免疫与检测技术(2004-AA249060)

cotton to *V. d.*-toxin with this method, we have chosen 4 cultivars of upland cotton which are Ejing-3, B99261, CCRI 12, Xingluzao-7. We have conducted different cultivar treatments with the same *V. d.*-toxin, and compared the coherence between *V. d.*-toxin soaking way to the way of pricking on leaf surface and spreading *V. d.*-toxin. The result indicated that both methods can get very similar results after repeating tests.

**Key words:** cotton; phytotoxin of *Verticillium dahliae*; pricking and spreading method; wilting detection

大丽轮枝菌(黄萎菌)是导致我国棉花黄萎病的病原菌,黄萎菌毒素是引起棉花感病株叶片萎蔫的主要原因,因此利用黄萎菌毒素作为鉴定棉花品种(资源)抗性的一种方法具有现实意义<sup>[1]</sup>。鉴定棉花对黄萎病抗性的方法主要包括:田间病圃鉴定和室内处理两大类。处理又包括:孢子液撕底蘸根法和切根浸泡法、茎秆注射法、毒素浸泡观察根冠细胞脱落等方法<sup>[2-3]</sup>,各种鉴定方法都有其优点,也都存在一定局限性。为克服同一个品种年际间、不同鉴定手段所造成的差异,提出了各种处理方法,其目的就是为了消除系统误差,提高抗病性鉴定的准确性<sup>[4-7]</sup>。研究认为棉花抗黄萎病鉴定方法不规范也是制约高抗病品种的选育的主要因素之一<sup>[8]</sup>。本研究用棉花幼苗叶片针刺涂抹法检测了不同致病力菌系毒素的致萎力,该方法只用极微量的毒素就可快速直观地观测到毒素的致萎效果,同时试图将环境等影响因素减少到最低,尽可能客观地反映出各黄萎菌系的致萎力和不同棉花品种的抗病性。

## 1 材料和方法

### 1.1 黄萎菌菌株及毒素

1.1.1 供试黄萎菌菌系。用黄萎菌系共 8 个,强致病力  $V_{991}$ 、 $T_9$ 、 $V_{56}$ 、 $V_{146}$ ,中等致病力  $V_{3-10-1}$ ,弱致病力的  $V_{110}$ 、 $V_{246}$ 、 $V_{250}$ 。首先利用  $V_{991}$  菌系纯化毒素进行了针刺涂抹致萎试验,初步建立起该方法,然后再以  $T_9$  等 8 个致病力不同的黄萎菌系培养滤液进行了多菌系验证。试验所用菌系均由中国农业科学院植物保护研究所提供。

1.1.2 致萎毒素。将强致病力落叶型  $V_{991}$  菌系接种于 500 mL 液体 PDA 中,在 25℃、150 r·min<sup>-1</sup> 条件下暗培养 15 d。先用中性滤纸将菌液过滤,低温冷冻干燥浓缩至 10 mL,用 Sephacryl S-200HR 柱层析进行纯化(另文发表),将具有致萎特性的纯化毒素蛋白(简称毒素),分别稀

释成 1、10、100、1000 倍,用 PE Lambda Bio20 分光光度仪测定其蛋白含量。再将毒素稀释为 1000、2000、3000、5000 和 10000 倍进行致萎极限试验。

### 1.2 棉花叶片针刺涂抹方法

1.2.1 针刺方法及纯化毒素涂抹。用小号注射针头或大头针轻刺棉苗(鄂荆 3 号,2~3 片真叶时)的子叶和真叶(分别在正面主叶脉两侧,圆形面积约 0.5 cm<sup>2</sup> 的地方针刺 15~20 个点,尽量不要将叶片刺穿)。为提高效率同时保持针刺深度的一致性,可将 15~20 个大头针组成 1 束,镶嵌固定在一块泡沫板上(固定在木板上更稳定),使得针尖外露 0.3~0.5 mm(依据叶片的厚度而定,针刺棉花子叶时,针尖外露可适当长些;针刺棉花真叶时,针尖外露则稍短些)。针刺叶片时,将手垫在叶片的背面,以针刺表面几个洞深浅一致、刺不穿叶片(手不被刺着)为标准掌握针刺深度。在针刺部位涂抹毒素。以洗脱液、清水作为对照,牛血清白蛋白(BSA)为参考对照。毒素溶液涂抹 1~3 μL(依据针刺面积大小而定)。试验重复 3 次,总计处理棉苗 24 株。涂抹后间隔 6 h 观察 1 次,记载症状变化。

1.2.2 针刺与  $V_{991}$  滤液涂抹。为探讨直接利用黄萎菌滤液处理效果,将  $V_{991}$  培养液过滤除去菌丝和孢子后再分别稀释为 10、20、30、……100 倍 10 种不同浓度,对鄂荆 3 号及海岛棉阿许模尼(AXMN)幼苗针刺处理,以清水涂抹为对照,重复 5 次。

1.2.3 多个菌系滤液处理不同棉花品种。为检测不同菌系滤液对不同棉花品种的致萎差异,用 8 个菌系的未稀释的滤液(1 倍)、稀释 30 倍、100 倍和 300 倍 4 个稀释倍数,对新陆早 7 号、B99261 和中棉所 12 三个陆地棉品种进行了针刺涂抹试验。8 个菌系的菌液先用中性滤纸滤去菌丝,14000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,然后针刺涂抹,以蒸馏水为对照。每个品种选取 8 株具有 3~4 片真叶、长势一致的棉苗,选 3 片展开叶,每

片叶针刺2个约0.5 cm<sup>2</sup>的“点阵”，然后在每个针刺面积表面分别涂抹2 μL的蒸馏水、300倍、100倍、30倍和1倍滤液。重复3次，处理6 h后开始调查发病效果，以24 h的发病结果计算病情指数。

### 1.3 棉苗滤液浸泡方法

以不同致病力菌株的滤液浸泡棉花叶片，直接进行致病力鉴定，作为针刺涂抹方法的参比试验，棉花品种为新陆早7号、B99261及中棉所12。用上述8个菌系的过滤菌液浸泡棉花叶片。滤液设1倍(不稀释)、30倍和100倍等3个稀释倍数，对照以清水浸泡。重复3次。

### 1.4 致萎力分级及病情指数计算方法

针刺涂抹方法以形成枯斑与否划分为0~4级。0级，不形成枯斑；I级枯斑面积占处理面积的25%以下；II级25%~50%；III级50%以上至75%；IV级75%以上；黄萎菌滤液浸泡法的分级(以72 h后叶片轻微变软、中度变软或病斑小于整个叶片的25%、严重萎蔫或大于25%小于75%的病斑、叶片干枯及病斑大于75%划分为0~4级)。病情指数计算方法与田间病圃鉴定计算方法相同。

## 2 结果与分析

### 2.1 针刺叶片涂抹毒素的致萎效果

**2.1.1 黄萎菌毒素对棉花叶片的致萎性。**针刺棉花品种鄂荆3号叶片并涂抹V<sub>991</sub>纯化毒素结果表明：在温室条件下(25℃)大约12 h后，毒素处理部位会出现明显的萎蔫症状，叶肉细胞坏死，严重时处理部位形成透明症状，只剩下叶表皮。而涂抹BSA和清水对照则不会出现萎蔫，只是留下针刺后所形成的斑点。经过层析纯化的毒素比粗提毒素具有更强的致萎力，如纯化毒素含量为20 mg·L<sup>-1</sup>时，对感病品种鄂荆3号仍具有很强的致萎作用，当毒素被稀释到7.3 mg·L<sup>-1</sup>(3000倍)时只对鄂荆3号有致萎作用而对AXMN没有作用。重复试验10次的结果表明该方法的处理成功率可达99.3%以上；未经纯化的粗提毒素在稀释100倍后，致萎力就显著降低。

**2.1.2 毒素致萎程度定量检测。**利用针刺涂抹方法对不同浓度黄萎菌毒素检测结果显示，毒素浓度及棉花品种不同，致萎效果会出现明显差别，这种差异可以作为定量分级的标准(图1)。图中0级和IV级为V<sub>991</sub>纯化毒素(7.3 mg·L<sup>-1</sup>)所致，由此可看出毒素在纯化情况下会具有更强的致萎力。

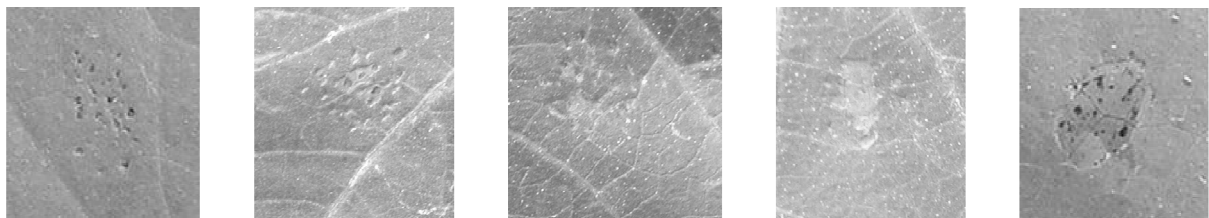


图1 棉花叶片针刺涂抹黄萎菌毒素致萎程度分级(自左至右为0~4级)

Fig. 1 Classes divided according to wilting result caused by picking leaf and spreading phytotoxin after 24 h (0~IV class, from left to right)

**2.1.3 棉花最佳处理时期和处理部位。**试验表明，在棉花出苗期至3叶期均可采用叶片针刺毒素涂抹方法，3叶期后棉花的子叶逐渐萎缩、真叶

厚度也变薄，针刺力量不易掌握，容易将叶片刺穿。

多次重复试验结果表明，棉花的子叶更适合

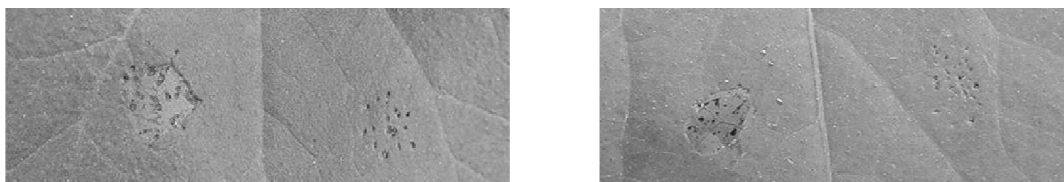


图2 棉花叶片在针刺涂抹纯化毒素24 h后的效果(左为子叶，右为真叶)

Fig. 2 Result of wilting test with leaf by picking leaf and spreading phytotoxin after 24 h (left cotyledon, right is true leaf)

该方法,因其肉质化程度高,针刺的力度容易掌握,不易刺穿;子叶期鉴定还可加快试验进程,子叶为该方法的最佳处理部位(图 2),左半部分的“坏死”为涂抹毒素后出现的,右面为对照。

**2.1.4  $V_{991}$  滤液处理棉花叶片。**结果表明,用  $V_{991}$  滤液也可获得类似纯化毒素的处理效果。当  $V_{991}$  滤液稀释至 60 倍时,即  $0.0124 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时仍可使棉花品种 AXMN 及鄂荆 3 号的子叶出现枯斑,当稀释至 70 倍时 AXMN 失去了致萎效果。

## 2.2 不同菌系滤液对陆地棉品种的致萎反应

**2.2.1 各菌系间致萎力差异。**实验结果表明,各菌系滤液在针刺涂抹处理情况下,所表现的致萎力(用病指来衡量)与传统方法结果基本一致。在检测的各菌系中,  $V_{120}$  的致萎力最强,病指为 58.33,其毒素蛋白含量也较高,为  $148.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 1)。此外致萎力较强的有  $V_{3-10-1}$  和  $T_9$ ,病指分别为 56.25 和 50.00。传统方法鉴定认为属于强致病力的  $V_{56}$  病指最低为 35.42,同时  $V_{991}$  病指也较低(45.83),但  $V_{991}$  的滤液浓度为  $0.0113 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,显著低于其它菌系。黄萎菌滤液的致萎力与稀释倍数有一定相关性,同时与品种有选择性互作。在 1~300 倍内,100 倍处理对新陆早 7 号 and B99261 具有最强的致萎力(表 2),病指分别为 65.63 和 62.50。而中棉所 12 的各浓度处理没有显著的差异。

**2.2.2 不同棉花品种间抗致萎力差异。**传统方法鉴定结果认为 3 个品种对黄萎病具有不同程度的抗性,分别代表了高耐、耐和高感黄萎病 3 种不同类型。2003 年中国农业科学院植物保护研究所棉病组田间病圃鉴定结果表明,中棉所 12、B99261、新陆早 7 号的黄萎病指分别为 18.76, 19.60, 22.43。

不同棉花品种,对不同黄萎菌毒素致萎性抗性具有较大差异。如 B99261 品种在针刺涂抹不同黄萎菌毒素后的病指为 44.53,在 3 个品种中最低;新陆早 7 号最高,为 49.22。尤其当用最佳稀释倍数(30 倍)衡量各品种的抗致萎力时,以中棉所 12 的抗致萎力最强,其最高病指为 53.12;新陆早 7 号(100 倍)的抗致萎力最弱,最高病指为 65.63;B99261 的最高病指介于两者之间,出现在不稀释及 100 倍稀释两个处理。这一结果与中国农业科学院植物保护研究所 2003 年的鉴定结果相一致。

表 1 各菌系滤液中的蛋白浓度

Table 1 Concentration of protein of each strain on *Verticillium dahliae*

滤液	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>230</sub>	蛋白质含量 /(g · L <sup>-1</sup> )
$V_{991}$	0.0559	0.0363	0.0963	0.0113**
$T_9$	0.2325	0.1970	0.3329	0.1136
$V_{56}$	0.2644	0.2287	0.4024	0.1360
$V_{120}$	0.2909	0.2504	0.4399	0.1478
$V_{3-10-1}$	0.1859	0.1608	0.3497	0.0956
$V_{110}$	0.2256	0.1915	0.3279	0.1107
$V_{246}$	0.3704	0.3080	0.5058	0.1725*
$V_{250}$	0.1837	0.1595	0.3285	0.0957

注:OD 值为菌液过滤、离心,稀释 50 倍后的检测数据。

## 2.3 针刺涂抹方法与毒素浸泡方法的比较

**2.3.1 不同菌系毒素浸泡棉花不同品种叶片的致萎性。**将 8 种黄萎菌滤液稀释 50 倍,分别浸泡中棉所 12、B99261 和新陆早 7 号 3 个棉花品种的叶片,结果 3 个品种在分别用不同滤液浸泡时,表型症状有较大差异,同样表现了菌系与品种的选择性。例如中棉所 12 只有  $V_{991}$  和  $V_{56}$  2 个菌系滤液可以使其叶片致萎,而 B99261 除了  $V_{991}$ 、 $V_{120}$  之外还可被  $T_9$  和  $V_{246}$  4 个菌系滤液致萎,新陆早 7 号也有相似结果,只是该品种可被更多的菌系致萎。从试验结果还可看出浸泡 72 h 后,  $V_{991}$  可导致 3 个棉花品种叶片干枯,其它菌系的滤液则只能使其中的 1~2 个品种的叶片致萎或造成干枯。

**2.3.2 针刺毒素涂抹与浸泡方法致萎性比较。**利用针刺涂抹方法得出  $V_{120}$ 、 $V_{3-10-1}$  及  $T_9$  具有较强的致萎性,与传统方法鉴定结果相符合;表 2 中  $V_{991}$  是阳性对照,由于摇菌时间短(7d)产毒素量少,在同样稀释倍数情况下浓度明显偏低,因此致萎力(病指 45.83)也相应低于其它几个菌系,似乎与毒素浸泡方法不一致。但将  $V_{991}$  滤液浓缩重新稀释后补充试验结果表明,当  $V_{991}$  滤液为  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  可使 3 个品种严重致萎,新陆早 7 号、B99261、中棉所 12 病指分别为 69.15、66.21、63.56。由此可知针刺涂抹方法与浸泡法具有较高的一致性。

## 3 结论与讨论

多次重复试验证明,本方法以处理刚出土的子叶效果更好,只要针刺力度合适(不刺穿叶片)、毒素或滤液稀释倍数合适,可确保全部处理的效果显现,排除可能造成的系统误差;处理后发病迅

表2 各菌系滤液针刺涂抹对不同棉花品种的致萎力差异

Table 2 Wilting characters differentials by picking leaf and daubing *V. dahliae* strains' crude phytotoxin on varieties of upland cotton

品种 处理	新陆早7号					中棉所12					B99261					病指
	CK	300	100	30	1	CK	300	100	30	1	CK	300	100	30	1	
V <sub>991</sub>	0	0	2	4	0	0	1	0	2	4	0	0	4	1	4	45.83
T <sub>9</sub>	0	3	2	3	2	0	3	3	4	2	0	0	0	1	1	50.00
V <sub>56</sub>	0	2	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	4	2	4	35.42
V <sub>120</sub>	0	3	4	2	2	0	4	3	4	0	0	0	1	2	3	58.33
V <sub>3-10</sub>	0	1	4	1	4	0	4	0	4	3	0	2	2	2	0	56.25
V <sub>110</sub>	0	1	4	3	4	0	1	3	1	0	0	0	1	0	0	37.50
V <sub>246</sub>	0	0	1	0	1	0	1	4	1	4	0	1	4	1	4	45.83
V <sub>250</sub>	0	2	3	3	0	0	1	1	0	0	0	3	4	1	4	45.83
病指	0	37.50	65.63	53.13	40.63	0	50.00	43.75	53.12	40.63	0	21.88	62.50	31.25	62.50	
平均	0			49.22		0			46.88		0			44.53		-

注:各菌系的平均病指=不同处理(300~1倍)的病级之和/(12×4)×100

各处理的平均病指=不同菌株(V<sub>991</sub>~V<sub>250</sub>)的病级之和/(8×4)×100

速,适合快速大量检测;经过与毒素浸泡方法比较,本方法具有较高的准确性,可以客观地反映棉花与黄萎菌毒素的互作关系,从而推断出棉花对黄萎菌的抗、感病性,因此可作为棉花品种资源抗黄萎病鉴定的方法之一,同时也可利用一套鉴别寄主鉴定黄萎菌株的致萎力、作为划分不同生理型的依据之一。棉花黄萎病抗病性鉴定时所受到的影响因子较多,因此减少从处理到发病的中间环节,有利于更准确地鉴定寄主植物对病原菌的抗性反应。黄萎菌是否存在生理小种始终没有定论,其中一个重要原因是鉴定寄主及方法不统一、环境等影响因子多、处理的黄萎菌难以定性和定量等,本研究克服了其中的多种因素的影响,可否作为划分黄萎菌生理型乃至生理小种的辅助方法,还有待进一步研究。

涂抹黄萎菌毒素后出现枯斑的快慢、下限致萎量等,与棉花品种的抗病性强弱有关,本研究用的海岛棉品种比陆地棉品种具有较高的抗致萎力,因此出现症状的时间较晚,这与常规的抗病性鉴定结果一致,由此推测利用毒素致萎方法可以检测不同品种的抗致萎能力,换言之,该方法可望用于检测棉花不同品种对黄萎病的抗性;同时不同品种在毒素处理后出现症状的快慢,也与处理时间、当时的温度有关。如中午处理,由于日光较强,出现枯斑的时间比其它时间段提早6~12h;处理后,若空白与处理同在一片叶子上,对照也可能出现枯斑,这可能与处理叶片大小有关,若几个不同浓度处理针刺涂抹在同一叶片会出现此现象,因此最好不要在同一植株上面设置不同的处理;用针刺与浸泡两种方法同时鉴定相同的3个

棉花品种时发现菌系与品种间存在专化选择作用,各黄萎菌系毒素对各棉花品种的致萎力差异达到显著水平,因此在鉴定棉花品种资源对黄萎病抗性水平时应选用一套固定的菌系,既不能只用单一菌系,也不宜用菌系混合处理。

为探讨该方法的适用范围,在珊西烟和拟南芥上进行了相应试验,结果表明叶片针刺涂抹毒素的致萎性检测方法同样适用于烟草和拟南芥。将稀释30倍的V<sub>991</sub>滤液涂抹于珊西烟叶片上,24h之内可形成明显的枯斑,当稀释倍数为60倍时仍然出现肉眼可辨别的枯斑。拟南芥对黄萎菌毒素的反应不太敏感,涂抹24h后,整片叶子发黄。

#### 参考文献:

- [1] 吕金殿,甘莉,阎龙飞.棉花黄萎病菌毒素的纯化与特性研究[J].植物病理学报,1991,21(2):129-133.
- [2] 王彦霞,高会东.棉花抗黄萎病中处理方法的探讨[J].江西棉花,1998(3):13-14.
- [3] 马存,简桂良,孙文姬.我国棉花品种黄萎病鉴定存在地问题及对策[J].棉花学报,1999,11(3):163-166.
- [4] 司军,李成琼,肖崇刚,等.甘蓝根肿病处理方法的研究[J].西北农业大学学报,2003,25(3):216-219.
- [5] 李社增,马平, Huang H C,等.相对病情指数划分棉花品种抗病性的统计学基础[J].2003,15(6):344-347.
- [6] 李成葆.棉花品种资源抗黄萎病鉴定[J].中国棉花,1990,17(3):40-42.
- [7] 朱荷琴,冯自力.一种防治棉花黄萎病的新型施药方法—茎部划伤注射法[J].中国棉花,2006,33(6):7-8.