

土壤棉花黄萎病菌致病力分化的初步研究

李 艳, 杨家荣*

(西北农林科技大学植保学院, 杨凌 712100)

摘要:为进一步研究病原菌的变异规律,采用皿内培养和苗期致病力测定方法,2005年8月对陕西三原棉花黄萎病圃中棉花黄萎病菌进行了研究。对26株代表菌系在PDA培养基上菌落培养性状进行的研究结果表明:其存在黑色菌落(菌核型)、白色菌落(菌丝型)和中间型三种培养型。并且在菌落的生长量、微菌核形成的快慢、数量、形状和大小变化以及黑色素的相对量等方面均存在差异。苗期致病力测定表明:26个供试菌系致病力也有差异,从其对5个棉花鉴别寄主侵染的反应型来看,可以划分为强、中、弱3个不同的致病类型。强致病类型菌系12个,占41.6%,中等致病类型的菌系9个,占34.6%,弱致病力菌系5个,占19.2%。

关键词:棉花;黄萎病菌;致病力

中图分类号:S562.02 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2007)04-0291-05

Preliminary Study on Pathogenicity of *Verticillium dahliae* in Soil

LI Yan, YANG Jia-rong*

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

Abstract: In order to explicit the pathogenicity of *Verticillium dahliae* in soil and to provide the theoretical testimony for the aberrance rule of pathogen, in August 2005, the *Verticillium dahliae* in the disease garden in the Doukou county, Shaanxi province have been identified. The cultural characters of 26 representative strains of *V. dahliae* on the PDA substrate showed that there were three cultural type: black (sclerotium type), white (filamentous fungus) and middle. Furthermore, the growth quantity, formation of micro-sclerotium, fabric, color, size and relative amount of melanin for those 26 representative strains of *V. dahliae* were different. In addition, the determination of pathogenicity in the seedling stage had also showed that difference existed among the 26 representative strains. According to the reaction types on five species cottons with different resistance, all strains can be classed into three pathogenic types: type 1 (12 isolates, accounted for 41.6% of the total) was characterize by severe virulence, type 2 (nine isolates, accounted for 34.6%) showed mild virulence and type 3 (five isolates, accounted for 19.2%), an intermediate type.

Key words: cotton; *Verticillium dahliae*; pathogenicity

棉花黄萎病是土传植物微管束病害,病原菌以微菌核的形式在土壤中越冬存活,并成为病害重要的初侵染源。在大田调查中经常发现:相同棉花品种在同一块棉田中发病棉株表现不同的症状类型(即症状多样性),并且棉株的受害程度也表现各异。这是与病原菌在土壤中的分布不均

匀、品种的抗性反应,或寄主植物的阶段抗病性有关,还是与土壤中棉花黄萎病菌的致病力变异或致病力分化有关?关于这个问题,目前国内外尚无报道。因此,将土壤棉花黄萎病菌进行分离并对其致病力进行研究,对进一步揭示病原菌的变异规律具有十分重要的科学意义。2005年8月

收稿日期:2006-12-13

作者简介:李 艳(1981-),女,硕士研究生,liyan00045@163.com;*:通讯作者,yljryang@cnipm.com

基金项目:欧盟科技合作项目(ICA4-CT-2001-10001)

至2006年5月,笔者依据病菌室内培养性状的变异,结合苗期症状类型的特点,研究了棉花黄萎病菌致病力的分化情况。本试验拟从棉田的土壤中检测分离棉花黄萎病菌,并研究这些不同分离菌株的生物学特性和致病力是否发生变异,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月上旬在西北农林科技大学农学院棉花所斗口试验站棉花黄萎病圃(三原西郊棉花所内的多年自然育种圃),采用5点取样法:即用取土器在0~20 cm耕作层内随机多点取样,每个取样点取20个土样。土样在室内自然风干2周,并用制样粉碎机粉碎,过筛(筛孔直径2 mm),装入塑料袋于4~5℃冰箱保存备用。采用改良的MSEA^[1]培养基,经水筛法分离黄萎病菌,待微菌核萌发后,挑到PDA上继续培养,纯化获得26个单孢菌株。

1.2 固体培养性状的观察

将保存于斜面的菌株分别接入PDA平板上培养15 d后,用直径为0.4 cm的打孔器取菌落置于平板中心,每皿1块,每菌株3皿,25℃培养15 d后测量各菌株菌落直径,观察菌落颜色、质地和形态特征。

1.3 液体培养性状及观察

将斜面培养菌株分别接入PDA平板上培养15 d后,用直径为0.4 cm的打孔器取菌落1块,置于装有100 mL查氏液体培养基的250 mL三角瓶中,同时加入少量氯霉素抑制细菌生长,置于25℃恒温箱中培养30 d,观察各菌株菌落形态。

1.4 苗期致病性测定

1.4.1 供试菌种。实验室分离所得的26个黄萎菌株,以致病性强的陕西泾阳菌、致病性弱的新疆菌系(陕西省植保站提供)为对照,共28个菌株为供试菌种。

1.4.2 鉴别寄主。采用三大棉种,5种鉴别寄主: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保所徐进和简桂良提供,海岛棉7124、泗棉3号由中国农业科学院棉花所提供,陕4080、陕2234为本省品种。

1.4.3 棉苗培育。温室条件下,将脱绒棉种播到

营养钵中,每菌株5个鉴别寄主,每个鉴别寄主播3钵,作为3次重复,即每个菌株鉴别寄主15钵,待棉苗出土后每钵留苗5株。

1.4.5 菌液的制备。将各菌株在PDA平板上培养15 d,将菌落打成7 mm的菌饼,接到查彼得培养液中,每瓶接5个菌饼,黑暗振荡培养15 d,用4层纱布过滤,制成孢子悬浮液,在显微镜下用血球计数板计数将浓度调到 2.7×10^7 个孢子 \cdot mL⁻¹,现配现用。

1.4.6 接菌方法。当棉苗长出1~2片真叶时,参考石磊岩的方法^[2]进行伤根接种,并于当天浇水后置于18~37℃的温室中,2 d灌一次水。

1.4.7 调查记载。在棉株接种菌后的第15 d、20 d、25 d、30 d分别调查各处理的发病率、病级,观察症状类型,按全国统一病情分级标准进行分级调查,记载病情^[3]。并以最后一次调查的结果(接种后第30 d)计算出病情指数和划分品种的抗病类型^[4]。

1.5 数据处理

采用DPS统计软件包处理数据^[5]。

2 结果与分析

2.1 各菌系菌落的培养性状

根据各菌系在PDA培养基上菌落培养性状可将供试棉花黄萎病菌分为3种类型,即:菌核型、菌丝型和中间型(表1)。菌核型(AVH)表现为:菌落黑色,产生大量黑色微菌核,中间常为白色气生菌丝团,供试的26个菌株中有21个菌株属于此类型,占供试菌株的81%;菌丝型(AVS):菌落白色或浅黄色,气生菌丝发达绒毛状,培养2周后仍未出现黑色微菌核。供试的26个菌株中有3个菌株属于此类型,即C13, A34, A23,占供试菌株的11.5%;中间型(AVM),菌落边缘光滑,微菌核产生少,供试的26个菌株中仅A7和C20属于此类型,占供试菌株的7.7%。

另外,棉花黄萎病菌的液体培养性状与固体培养性状很相似,即在平板上不产生菌核的菌丝型菌株,培养液的颜色呈淡黄色;产生微菌核的菌核型菌株培养液颜色则为黑色。

2.2 黄萎病菌的培养性状与致病力的关系

26个菌系在PDA平皿培养基上,菌落生长大多为圆形和椭圆形,但微菌核的形状却差异较大。在显微镜下观察,81.4%的微菌核呈单个散

表 1 黄萎病菌的培养性状与致病力的关系

Table 1 Relationship between culture character and pathogenicity of *Verticillium dahliae*

菌株	直径	各菌系的培养形状					色素 相对量	病指/%
		培养类型	表面	底部	菌落质地,特征	微菌核		
B15	33.5	菌核型	圆形,灰白	黑色	菌丝发达致密,放射状	多	0.75	34.7
A9	31.0	菌核型	圆形,灰白	黑色	菌丝发达致密,放射状	多	0.50	21.8
B22	35.5	菌核型	圆形,灰白	黑色	菌丝疏松,同心轮纹	多	0.72	42.8
C17	33.5	菌核型	椭圆,灰白	黑色	菌丝疏松,同心轮纹	多	0.75	43.3
C9	30.0	菌核型	圆形,灰白	黑色	菌丝发达疏松,同心纹	多	0.75	32.5
B11	32.0	菌核型	椭圆,灰白	黑色	菌丝发达疏松,同心轮纹	多	0.80	50.2
C2	38.0	菌核型	椭圆,灰白	黑色	菌丝发达致密,同心轮纹	多	0.77	47.6
B19	38.0	菌核型	圆形,灰白	黑色	菌丝发达致密,同心轮纹	多	0.73	39.3
A8	23.0	菌核型	椭圆,灰白	黑色	菌丝发达致密,放射状	多	0.74	42.5
B23	30.5	菌核型	椭圆,灰白	黑色	菌丝发达疏松,放射状	多	0.74	43.6
C14	25.5	菌核型	椭圆,灰白	黑色	菌丝发达致密,放射状	多	0.77	50.4
B1	35.0	菌核型	圆形,灰白	黑色	菌丝发达致密,同心轮纹	多	0.73	43.3
A17	36.5	菌核型	圆形,灰白	黑色	菌丝疏松,同心轮纹	多	0.76	36.3
A7	33.0	中间型	圆形,灰白	黑色	菌丝发达疏松,放射状	少	0.69	39.7
B13	30.0	菌核型	圆形,灰白	黑色	菌丝发达致密,同心轮纹	多	0.73	43.1
C18	34.5	菌核型	圆形,灰白	黑色	菌丝发达致密,放射状	多	0.70	32.5
C3	38.0	菌核型	圆形,灰白	黑色	菌丝发达致密,同心轮纹	多	0.87	52.1
C20	27.0	中间型	圆形,灰白	黑色	菌丝不发达,放射状	少	0.65	35.9
B22	26.5	菌核型	圆形,灰白	黑色	菌丝致密发达,放射状	少	0.87	23.1
C6	28.5	菌核型	圆形,灰白	黑色	菌丝致密发达,同心轮纹	多	0.72	24.5
B2	23.5	菌核型	椭圆,灰白	黑色	菌丝致密,同心轮纹	多	0.69	20.4
B4	32.1	菌核型	圆形,灰白	黑色	气生菌丝致密 同心轮纹	多	0.74	23.6
B8	24.2	菌核型	椭圆,灰白	黑色	气生菌丝疏松 同心轮纹	多	0.71	35.8
A34	40.0	菌丝型	圆形,灰白	浅黄	致密绒毛状,无条纹	无	0	37.4
C13	35.5	菌丝型	圆形,灰白	浅黄	致密绒毛状,无条纹	无	0	32.8
A23	36.1	菌丝型	圆形,灰白	浅黄	致密绒毛状,无条纹	无	0	37.9

生瘤状,18.6%的微菌核为长条形并列成串。在观察中还看到,PDA上大多数菌落都有同心轮纹,还有的小菌核呈从内向外的放射状,如B22、C18、C14、B23、A8、B15、C20、A9;而菌丝型的菌落既无同心轮纹也没有放射状生长的菌核。从菌落的厚、薄、稀、疏来看:菌落厚而密的致病性较强,薄而疏的致病性较弱。

此外,5个棉花品种的平均发病指数与各菌株在PDA平皿上垂直测量菌落直径的平均增长值之间存在明显的正相关,相关系数 $r=0.8031$,达显著水平;而与黑色素相对量(黑色素直径与菌落直径之比值)无显著相关性($r=0.1987$)。从直线相关显著性测定来看,菌落生长越快,致病力越强,菌落生长较慢者,致病力也较弱。

2.3 黄萎病菌不同菌系致病力测定

对26个供试菌系和2个对照菌系的致病力结果用DPS软件作方差分析,其结果表明:不同菌系间和不同品种间显著水平P值分别为0.0001和0.0303,均小于0.05,说明各品种之间、

菌系之间整体存在显著差异。另外,用Duncan新复极差法做多重比较也可以看出品种之间的变异大于品种内的变异,菌系之间的变异大于菌系内的变异。由于菌系致病力强弱反映在寄主发病程度的差异上,因此从26个菌系对5个棉花鉴别寄主侵染的反应型来看,总的可以划分为强、中、弱3个不同的致病类型(表2,3,4)。强致病类型(I型)菌系的有12个,占46.1%,分别是B19、A19、B1、B13、C2、B4、C3、B11、B12、A23、A34、C13,其症状表现和对照泾阳菌系很相似,均表现为发病早,侵染快,棉株受害严重,致病性强。除了中棉石系亚表现抗(耐)病外,其它4个品种均表现为感病(耐)病。致病力弱(III型)的菌系有5个,占19.2%,分别为B22、A8、B2、C6、B8,和对照菌系新疆菌系类似,表现为发病迟缓,侵染慢,致病力弱,一般不形成死苗。其余的为中等致病类型(II型),有9个,占34.6%,分别为C14、C17、C20、A9、C9、A7、B23、B15、C18,其表现为发病稍晚,侵染较慢,死苗较少,致病性居中。中棉

石系亚、海 7124、泗棉、陕 2234、陕 4080 大多均表现为耐(抗)病型。

表 2 13 个 I 型棉花黄萎病菌系对 5 个棉花品种的致病性

Table 2 Pathogenicity testing with 12 strains of *V. dahliae* defined as Patho-type I to five cotton cultivars

菌系	陕 2234		中棉石系亚		泗棉 3 号		海 7124		陕 4080	
	病指	反应型	病指	反应型	病指	反应型	病指	反应型	病指	反应型
B19	34.4	T	25.0	T	35.0	S	56.2	S	45.8	S
A19	80.0	S	30.6	T	37.6	S	33.3	T	30.0	T
B1	80.2	S	35.7	S	50.8	S	25.0	T	25.0	T
B13	32.1	T	47.2	S	60.2	S	26.0	T	20.0	T
C2	12.5	R	50.0	S	45.0	S	41.5	S	60.0	S
B4	12.5	R	51.2	S	34.0	T	47.1	S	32.1	T
B11	8.3	R	15.0	R	70.0	S	39.6	S	51.2	S
C3	68.8	S	35.0	S	75.0	S	62.5	S	58.3	S
B12	31.3	T	25.0	T	39.3	S	45.0	S	32.5	T
A23	45.6	S	28.1	T	38.6	S	35.0	S	42.3	S
A34	36.1	S	20.0	T	37.2	S	51.6	S	42.1	S
C13	42.0	S	33.5	T	21.3	T	16.5	R	50.7	S
泾阳	32.9	T	50.2	S	60.2	S	26.0	T	25.5	T

表 3 6 个 III 型黄萎病菌系对 5 个棉花品种的致病性

Table 3 Pathogenicity testing with six strains of *V. dahliae* defined as Patho-type III to five cotton cultivars

菌系	陕 2234		中棉石系亚		泗棉 3 号		海 7124		陕 4080	
	病指	反应型	病指	反应型	病指	反应型	病指	反应型	病指	反应型
B22	16.7	R	18.8	R	25.0	T	21.3	T	33.5	T
A8	12.5	R	21.4	T	16.7	R	31.9	T	15.0	R
B2	10.0	R	25.0	T	20.5	T	20.0	R	25.0	T
C6	25.0	T	9.7	R	27.8	T	34.1	T	16.6	R
B8	12.5	R	8.3	R	34.7	T	31.2	T	12.5	R
新疆	10.0	R	25.0	T	20.5	T	32.4	T	24.5	T

表 4 9 个 II 型黄萎病菌系对 5 个棉花品种的致病性

Table 4 Pathogenicity testing with nine strains of *V. dahliae* defined as Patho-type II to five cotton cultivars

菌系	陕 2234		中棉石系亚		泗棉 3 号		海 7124		陕 4080	
	病指	反应型	病指	反应型	病指	反应型	病指	反应型	病指	反应型
C14	6.2	R	10.0	R	30.0	T	36.2	S	43.7	S
C17	25.0	T	31.1	T	57.1	S	15.4	R	47.1	S
C20	26.3	T	41.8	S	34.4	T	15.0	R	20.1	R
A9	41.7	S	15.0	R	34.6	T	25.4	T	16.7	R
C9	14.3	R	10.5	R	50.2	S	12.5	R	40.1	S
A7	29.2	T	29.0	T	15.4	R	25.0	R	50.0	S
B23	18.8	R	15.6	R	32.1	T	35.7	S	30.1	T
B15	25.1	T	12.5	R	50.0	S	31.2	T	55.0	S
C18	43.7	S	33.3	T	10.7	R	15.6	R	51.2	S

3 讨论

棉花黄萎菌菌落培养类型与致病性强弱有一定的相关性,就供试棉花黄萎菌而言,菌丝型菌株

为致病性较强的类型,这一研究结果与宋晓轩^[6]报道的结果相一致。国内外研究认为,棉花黄萎病菌的形态和致病力变异很大。根据固体培养性状的的不同,从同一棉田分离的 26 个棉花黄萎病菌

菌株也可分为 3 种培养类型,其中大多为菌核型,菌丝型和中间型所占比例小,且致病力差异很大。

关于同一棉田中发病棉株表现不同的症状类型(即症状多样性),且植株的受害程度表现各异这一现象,本实验已经证明:在同一块棉田中棉花黄萎病菌致病力存在着分化。但关于品种的抗性反应,寄主植物的阶段抗病性等方面还有待于进一步研究。

包括本实验在内的已有研究大多是根据鉴别寄主的表现型^[7-10],还有的借助于病菌的培养特性、营养亲和性方面研究黄萎病菌的致病类型^[9,11-12]。标记技术如 RFLP、RAPD 等在植物病原菌群体分类、遗传与进化研究中的成功报道已有很多^[13-15]。因此有必要采用分子标记手段或营养亲和性手段进一步研究黄萎病菌菌系间的变异以及这种变异与致病性的关系。

参考文献:

- [1] 杨家荣,商鸿生. 分离土壤棉花黄萎病菌选择性培养基的筛选[J]. 植物病理学报,2002,32(3):236-240.
- [2] 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[J]. 植物保护学报,1993, 20(3): 247-252.
- [3] 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.
- [4] 吉贞芳,许爱玲,刘惠民,等. 山西棉花黄萎病菌致病性研究[J]. 棉花学报,2004,16(5):280-285.
- [5] 马峙英,王省芬,刘占国,等. 棉花黄萎病不同致病群系在河北省的分布[J]. 河北农业大学学报,1998(7): 8-11.
- [6] 朱荷琴,宋晓轩,简桂良,等. 棉花黄萎病菌致病力变异生理机制的初步研究[J]. 棉花学报,2004,16(5): 275-279.
- [7] 王 杰,郭金城,李 为. 河南省棉花黄萎病菌致病力测定初报[J]. 棉花学报,1993,5(1):95.
- [8] 朱荷琴,宁晓轩,孙君灵,等. 棉花黄萎病菌安阳菌系致病类型研究[J]. 棉花学报,1999, 11(6): 312-317.
- [9] 刘西钊,陈长永,王昌军. 湖北省棉花黄萎病菌菌系致病力测定[J]. 华中农业大学学报,1989,8(3):227-230.
- [10] 王清和,吴洵耻,潘大陆,等. 山东省棉花黄萎病菌生理型鉴定(二)生理型的划分[J]. 植物病理学报,1982,12(1):19-22.
- [11] 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.
- [12] 王 兰,冯宏祖,武 刚,等. 南疆棉花枯萎病菌对长绒棉致病力分化的研究[J]. 棉花学报,2006,18(5):317-318.
- [13] 冉鸿昌,肖炎农,姜道宏,等. 湖北省棉花黄萎病菌致病力分化和遗传多样性分析[J]. 华中农业大学学报,2005,24(5):442-447.
- [14] PAPLOMATASE J B, Broome D M, Devay J E. Incidence of *Verticillium* wilt and yield losses of cotton cultivars based on soil inoculum density of *Verticillium dahliae* [J]. Phytopathology, 1992, 82:1417-1420.
- [15] XIA Z J, Achar I P N, Gu B. Vegetative compatibility groupings of *Verticillium dahliae* from cotton in mainland China [J]. European Journal of Plant Pathology, 1998, 104: 871-876. ●