

## 陕西关中地区棉花黄萎菌营养亲和性研究

许楠, 张慧霞, 杨家荣\*, 李艳

(西北农林科技大学植保学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 由于陕西关中地区的泾阳菌系被定为致病性最强的生理 I 型, 本试验采用营养亲和性的方法对陕西关中地区采集的 18 个菌株以及陕西省植保所提供的新疆和田菌系、陕西泾阳菌系和河南安阳菌系进行了研究。经不同氮源利用的鉴定, 结果为: 21 个菌株共获得 364 个 nit 突变株, 其中 nit1 289 个, 占总量的 79.40%; nitM 72 个, 占总量的 19.78%; nit3 仅有 3 个。经营养体亲和性配对测试, 21 个菌株可分为 3 个营养亲合群 (VCGs)。新疆和田菌系属于亲合群 2 (VCG<sub>2</sub>), 河南安阳菌系属于亲合群 3 (VCG<sub>3</sub>)。其余的 18 个菌株属于亲和群 1 (VCG<sub>1</sub>)。B18 没有产生突变体。且发现不同菌株营养体亲和产生的亲和带形态有差异, 且具有一定稳定性。由此可见, 造成陕西关中地区棉花黄萎病发生严重并造成经济损失的主要原因是由于主要致病菌属于 VCG<sub>1</sub>。

**关键词:** 营养体亲和性; nit 突变体; 棉花黄萎病菌; 陕西关中

**中图分类号:** S435.621 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-7807(2008)05-0364-04

## Vegetative Compatibility of *Verticillium Dahliae* of Cotton in Guanzhong, Shaanxi

XU Nan, ZHANG Hui-xia, YANG Jia-rong, LI Yan

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

**Abstract:** Because Jingyang strain is the highest aggressive strain which comes from the area of Guanzhong, Shaanxi. We studies on vegetative compatibility tests for the 18 strains of *Verticillium dahliae* of Guanzhong, Shaanxi and the Hetian strain from Xinjiang, Jingyang strain, Anyang strain which supplied by the Institute of Plant Protection Shaanxi Academy of Agricultural Science. According to their phenotypes on the media containing only one of the three different nitrogen sources, respectively, the results are: there were about 364 mutants obtained from 21 strains induced on KPS media, in which 289 mutants were nit1, it accounted for 79.40% of the total; 72 mutants were nitM, 19.78%; only three mutants were nit3. All except three strains, could be assigned to one vegetative compatibility group designated VCG<sub>1</sub>, the Hetian strain belongs to VCG<sub>2</sub>, the Anyang strain belongs to VCG<sub>3</sub>. B18 doesn't product the mutants. The morphological characters of vegetative compatibility zone among different compatible isolate pairs were different and stable. In a word, the main reason for *Verticillium dahliae* of the strains of Guanzhong leading to seriously lost on the economy is that their dominant population belong to the VCG<sub>1</sub>.

**Key words:** vegetative compatibility; nit mutant; *Verticillium dahliae*; Shaanxi guanzhong

棉花黄萎病是由大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae* Kleb.) 引起的一类世界性分布且造成严重经济损失的植物病害。在我国种以下分类是依据致病力的强弱, 将其分为不同的生理型。但这种依据致病性划分生理小种或生理型的方法不仅费时、费力、易受外界因素影响, 而且测定结果又易受温湿度、鉴别寄主种类、接种方法等外界因素影响, 所以仅靠致病性确定病菌的种以下分类地

位有其局限性。许多研究表明营养体亲和群 (vegetative compatibility groups, VCGs) 是鉴别真菌菌株, 特别是缺乏有性世代的菌株不同生理型或是生理小种及其遗传关系的有效方法<sup>[1-3]</sup>。棉花黄萎病菌属半知菌, 未发现存在有性生殖。Puhalla 等最早利用营养亲和群技术对大丽轮枝菌进行了研究, 其原理是通过观察真菌不同菌株之间的突变能否互补形成异核体即营养亲和性来

划分营养亲和群<sup>[4-5]</sup>。该方法开辟了依靠真菌自身的遗传特征而不是寄主与病原间关系进行种以下分类的新途径,使群体中无致病力的部分也参与分类。目前研究营养亲和性的方法主要有3种<sup>[6]</sup>,本实验采用的是硝酸盐缺陷型(nit)突变体互补法。

20世纪70年代以来,我国棉花黄萎病害呈发展和蔓延趋势。棉花黄萎病菌作为一种易发生变异的致病菌,长期的自然选择和人工选择使种内发生了致病力分化,产生了复杂的生理小种。姚耀文等根据我国棉花黄萎菌在3大棉种上的致病性反映,将陕西关中地区的泾阳菌系定为致病性最强的生理I型<sup>[7]</sup>。因此,本实验旨在从生理学的角度研究陕西关中地区棉花产地的18株棉花黄萎菌和3个实验室已保存的标准菌株(陕西泾阳菌系、新疆和田菌系、河南安阳菌系)各菌株之间的遗传关系,为其病害防治提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

从实验室保存的陕西关中地区的棉花黄萎菌的菌株中挑选18株(表1),经PDA多次纯化并用PDA斜面保存备用,以及3株标准菌系:陕西泾阳菌系、新疆和田菌系、河南安阳菌系。

表1 供试菌株的基本情况

Table 1 The original information of *Verticillium dahliae* in Guanzhong

菌株	来源	产地	采集时间	分离时间
C14	棉花	泾阳	2005年8月	2005年8-10月
A25	棉花	三原	2006年8月	2006年8-10月
C8	棉花	三原	2005年8月	2005年8-10月
B23	棉花	乾县	2006年8月	2006年8-10月
C7	棉花	富平	2006年8月	2006年8-10月
B13	棉花	礼泉	2005年8月	2005年8-10月
B5	棉花	大荔	2006年8月	2006年8-10月
A26	棉花	泾阳	2005年8月	2005年8-10月
B17	棉花	三原	2006年8月	2006年8-10月
B18	棉花	大荔	2005年8月	2005年8-10月
C22	棉花	富平	2006年8月	2006年8-10月
A27	棉花	礼泉	2005年8月	2005年8-10月
A24	棉花	泾阳	2006年8月	2006年8-10月
A13	棉花	富平	2006年8月	2006年8-10月
C28	棉花	大荔	2006年8月	2006年8-10月
B24	棉花	乾县	2005年8月	2005年8-10月
C12	棉花	兴平	2006年8月	2006年8-10月
A16	棉花	兴平	2006年8月	2006年8-10月

### 1.2 培养基

培养基的选择,参考了Nadia、Puhalla等的方法配制<sup>[8]</sup>,但对鉴定nit突变体表型用的5种培养基只选用了其中已经能反映出突变体表型差异的3种。本实验中营养亲和性研究所需的主要培养基有以下几种:

1.2.1 PDA培养基。用于分离、纯化、保存菌种。

1.2.2 KPS培养基。1000 mL PDA中加氯酸钾 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,用于诱发nit突变体。

1.2.3 BM培养基(基础培养基)。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。

1.2.4 MM培养基。1000 mL BM培养基加入2 g  $\text{NaNO}_3$ 。

1.2.5  $\text{MO}_2$ 培养基。1000 mL BM培养基加入0.5 g  $\text{NaNO}_2$ 。

1.2.6 MH培养基。1000 mL BM培养基加入0.2 g次黄嘌呤。分别用MM、 $\text{MO}_2$ 、MH 3种培养基鉴别nit突变体表型。

1.2.7 MM培养基。用于两两菌株亲和性配对测验的培养基。

### 1.3 nit突变体的诱发和突变类型的鉴定

1.3.1 将供试菌株在PDA培养基上 $25^\circ\text{C}$ 活化5~7 d,在菌落边缘幼嫩菌丝处打直径为4 mm的菌饼接入KPS培养基上。

1.3.2 将KPS培养基置于 $25^\circ\text{C}$ 恒温暗培养,观察菌落生长情况,10-28 d如在菌落边缘出现快速生长的扇形面,假定其为nit突变体。

1.3.3 在每一个扇形面的边缘挑取少量菌丝,转入MM培养基, $25^\circ\text{C}$  4~7 d,表现出稀疏、无气生菌丝,呈扩展性生长的菌落,证明其形成了硝酸盐营养缺陷型(nit)突变体。之后将其转入MM斜面,保存备用,以便各供试菌株均筛选到突变体后统一进行营养亲和性测试。

1.3.4 nit突变体类型的鉴定如表2。

表2 棉花黄萎菌nit突变体在不同的氮源培养基上的生长情况

Table 2 The growth of nit mutants of *Verticillium dahliae* Kleb. on culture medium with different nitrogen sources

培养基	突变体类型		
	nit1	nitM	nit3
MM	-	-	-
$\text{MO}_2$	+	+	-
MH	+	-	+

注:“+”有气生菌丝生长;“-”无气生菌丝生长。

### 1.4 营养亲和性的测定

前人研究<sup>[9-11]</sup>已证明,在3种突变体类型中nitM与nit1或nit3之间亲和性最强,而许多学者在其诱发的突变体中也没有或是较少鉴别出nit3型<sup>[2,5,12]</sup>,故为了减少误差,本研究直接将各

待测菌株表现型互补的 nit1 和 nitM 在 MM 培养基配对。以第一个菌株的 nit1 作为标准,与全部菌株的 nitM 配对,以此类推。25℃,14~21 d,若两个突变体菌落生长到相接触处时形成了气生菌丝旺盛的异核体亲和带,即说明二者间具有营养亲和性,属于同一 VCG。反之,则不亲和<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 nit 突变株的获得及其突变类型

在 KPS 平板上生长的菌落边缘突然出现菌

表 3 各菌株获得 nit 突变体的数量及其营养亲和群

Table 3 The numbers of nit mutants and Vegetative compatibility groups of strains

菌株	nit 突变体类型			营养亲和群	菌株	nit 突变体类型			营养亲和群
	nit1	nitM	nit3			nit1	nitM	nit3	
泾阳	17	4		VCG <sub>1</sub>	B17	25	11		VCG <sub>1</sub>
安阳	23	2		VCG <sub>3</sub>	B18	0	0		—
和田	11	2		VCG <sub>2</sub>	C22	0	2		VCG <sub>1</sub>
C14	6	2		VCG <sub>1</sub>	A27	9	2		VCG <sub>1</sub>
A25	16	7		VCG <sub>1</sub>	A24	12	3		VCG <sub>1</sub>
C8	21	5		VCG <sub>1</sub>	A13	15	4	2	VCG <sub>1</sub>
B23	19	4		VCG <sub>1</sub>	C28	22	0		VCG <sub>1</sub>
C7	5	2		VCG <sub>1</sub>	B24	21	4		VCG <sub>1</sub>
B13	13	3		VCG <sub>1</sub>	C12	13	2		VCG <sub>1</sub>
B5	7	2		VCG <sub>1</sub>	A16	16	5	1	VCG <sub>1</sub>
A26	18	6		VCG <sub>1</sub>					
					总计	289	72	3	

### 2.2 nit 突变体的稳定性

nit 突变体在 MM 斜面培养基上保存过程中,发现部分突变体恢复成野生型。其中,在恢复为野生型的突变体中 nit1 有 141 个,占恢复突变体总量的 48.79%; nitM 有 9 个,占总量的 12.5%; nit3 没有。即各突变类型的恢复率由高至低,依次为 nit1>nitM>nit3,说明 nit1 是最不稳定,易回复成野生型的突变体。

### 2.3 菌株间的营养亲和性

分别对各菌株表现型互补的 nit1 与 nitM 在 MM 培养基上进行等距离配对,培养 14~21 d 后进行观察记录。结果显示(图 1),所测试的菌株基本可分为 3 个亲和群(VCGs),新疆和田菌系属于亲合群(VCG<sub>2</sub>),河南安阳菌系属于亲合群(VCG<sub>3</sub>),其余的 18 个菌株属于亲和群(VCG<sub>1</sub>)。

## 3 讨论

经营养亲和性测定,可将供试 21 个菌株划分为 3 个营养亲和群,新疆和田菌株属于 VCG<sub>2</sub>,河南安阳菌株属于 VCG<sub>3</sub>,其余的 18 个菌株属于 VCG<sub>1</sub>,B18 没有鉴别出来突变体。与杨家荣等在前人工作的基础上,应用 nit 突变体营养亲和性技术,选用有代表性的属于不同生理型的菌系,将供试的代表菌株划分为 4 个营养亲和群,陕西泾

阳、新疆和田、河南安阳菌株、江苏 VD-8 和美国 T-9 菌株则分别属于第 1,2,3,4 营养亲和群<sup>[3]</sup>的结论相同。并且发现不同菌株营养亲和性产生的亲和带形态有差异,且具有相对的稳定性。

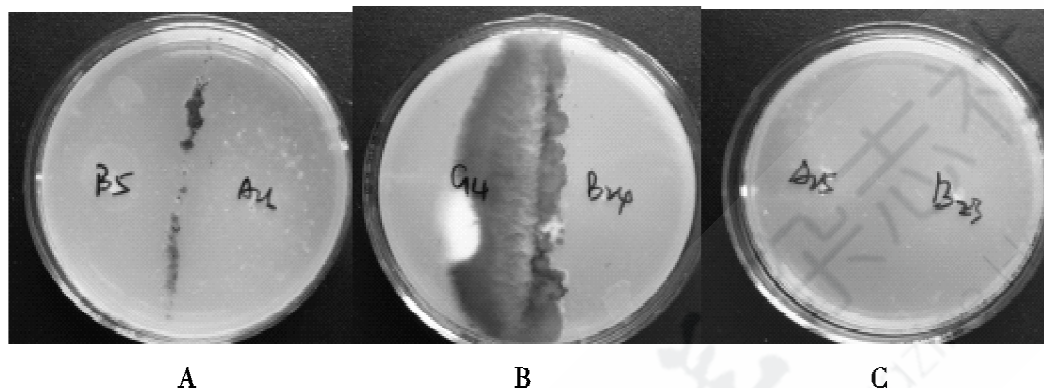
在一些真菌中,营养亲和性是受着称之为 vic 或 het 的多个位点所调控,若两株真菌是营养亲合的,在大多数情况下,它们是受一个或多个 vic 或 het 位点的等位基因控制的,而这些基因也具有突变的性质<sup>[5,11]</sup>。本试验中 nit 突变体在 MM 斜面培养基保存过程中,发现部分突变体恢复成野生型,这可能是由于发生新的突变或突变基因的修复而造成。这也在一定程度上表明该位点高频率的突变特性。

营养亲和性测定是一种十分有用的病菌群体遗传分析手段,其稳定性好<sup>[14]</sup>,反映了两菌株间的亲缘关系,即使菌株的致病性发生了退化,其营养亲和群也并不发生变异,常常被用来研究病菌群体的遗传变异程度和深入了解病菌的群体结构<sup>[6]</sup>。但是进行营养亲和性测定时,需有标准菌系,或有些菌系难以产生 nit 突变体等,或是在 nit 突变体鉴别过程中容易受到人为因素的影响,使其应用也受到一定限制。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>[15]</sup>。本次试验中, nitM 和 nit3 产生的较少, 可能是因为: 一方面, 受培养基中所含的氮源影响; 另一方面, 人为划分鉴定 nit 突变体培养基上形成的气生菌丝有无或多少的标准不一造成的。

本实验发现在较小的区域内营养亲合群基本表现一致<sup>[16]</sup>, 并没有其他致病力较弱的营养亲合群占主导地位, 所以在陕西关中植棉地区采集的

菌株大部分都属于棉花黄萎病中致病力强的陕西泾阳菌系, 造成经济损失严重。如果采用生物防治中的拮抗作用, 引进致病力较弱的营养亲合群使棉花具有一定的抵抗作用, 从而不会使致病力强的陕西泾阳菌系棉花黄萎病在此地区大发生, 尚有待进一步研究。



A: nit 突变体菌株有较弱的野生型生长; B: nit 突变体菌株产生茂密的野生型生长; C: nit 突变体菌株无野生型生长

图 1 棉花黄萎病菌营养亲和性反应

Fig. 1 The vegetative compatibility reactions of *V. dahliae*

#### 参考文献:

- [1] 杨家荣, 吕金殿, 吉冉中. NIT 突变体营养亲和性技术在棉花黄萎病菌生理型测定中的应用[J]. 植物病理学报, 1994, 24(3): 257-258.
- [2] JOAQUIM T R, Row R C. Reassessment of vegetative compatibility relationships among strains of *Verticillium dahliae* using nitrate nonutilizing mutants [J]. phytopathology, 1990, 80: 1160-1166.
- [3] 杨家荣, Harris D C. 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.
- [4] PUHALLA J E. Classification of isolates of *Verticillium dahliae* based on heterokaryon incompatibility [J]. Canadian Journal of Botany, 1979, 69: 1186-1189.
- [5] PUHALLA J E, Hummel M. Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae* [J]. Phytopathology, 1993, 73: 1305-1308.
- [6] LESLIE J F. Fungal vegetative compatibility[J]. Annual Review of Phytopathology, 1993, 31: 127-150.
- [7] 姚耀文, 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): 145-148.
- [8] NADIA Korolev, Talma Katan. Improved medium for selecting nitrate-nonutilizing (nit) mutants of *Verticillium dahliae*[J]. Phytopathology, 1997, 87: 1067-1070.
- [9] 李延军. 中国棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*) 营养亲和性的研究[D]. 北京: 北京农业大学, 1989.
- [10] 王克荣, 罗向群, 孟爱忠. 中国大丽轮枝菌营养亲和群[J]. 南京农业大学学报, 1994, 17(增刊): 128-133.
- [11] 王克荣. 植物病原真菌的营养亲和性[C]. 微生物遗传学综述文集. 上海: 复旦大学出版社, 1993: 203-216.
- [12] STRAUSBAUGH C A. Assessment of Vegetative compatibility and virulence of *Verticillium dahliae* isolates from Idaho potatoes and tester strains [J]. Phytopathology, 1993, 83: 1253-1258.
- [13] ROWE R C. Recent progress in understanding relationships between *Verticillium* species and subspecific groups [J]. Phytoparasitica, 1995, 23(1): 31-38.
- [14] PUNJA Z K. Sclerotium (*Athelia*) *rolfsii*, A pathogen of many plant species [J]. Advances in plant pathology, 1988, 6: 523-524.
- [15] 霍向东, 李国英, 张莉. 新疆棉花黄萎病菌营养亲和性的研究[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 1999, 12(3): 269-272.
- [16] MESAK Tombe, Kiroku Kobayashi, Akira Ogoshi. Vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* in Indonesia [J]. Indonesian Journal of Crop Science, 1994, 9(2): 29-39. ●