

河南省不同地区棉花黄萎病菌分离物致病性及其毒素致萎活性测定

桑 茜,袁虹霞,王振跃,李洪连,汪 敏*

(河南农业大学植物保护学院,河南 郑州 450002)

摘要:在河南省不同地区分离并鉴定 33 株棉花黄萎病菌分离物,并进行了致病力和粗毒素致萎活性测定。致病力结果表明,河南省棉花黄萎病菌分离物可分为强、中、弱 3 种致病力类型,分别占 48.5%、21.2%、30.3%。河南省同一地区内不同分离物间致病力差异明显。粗毒素致萎活性测定结果表明,黄萎病菌强致病力分离物分泌的粗毒素对棉苗的致萎力较强,弱致病力分离物分泌的粗毒素对棉苗的致萎力较弱,强、中、弱 3 种致病力类型分离物在 72 h 时对棉苗的平均致萎指数分别为 63.82、52.38、45.83。采用考马斯亮蓝法测定不同分离物粗蛋白含量,结果表明,不同黄萎病菌分离物分泌的粗蛋白含量存在明显差异,且与其所致的病情指数呈显著正相关。

关键词:棉花黄萎病;大丽轮枝菌;致病力;毒素

中图分类号:S435.621 文献标识码:A

文章编号:1002-7807(2010)04-0333-06

Pathogenicity of *Verticillium dahliae* Cotton Isolates in Henan Province and the Wilting Capability of Their Crude Toxins

SANG Xi, YUAN Hong-xia, WANG Zhen-yue, LI Hong-lian, WANG Min*

(College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to research pathogenicity differentiation of *Verticillium dahliae* on cotton in Henan, 33 *Verticillium dahliae* isolates were isolated and identified from the main cotton-producing regions in Henan Province. The results of pathogenicity tests on cotton seedlings indicated that the *V. dahliae* isolates from cotton in Henan could be divided into three pathotypes: the highly aggressive isolates, the moderate aggressive ones and the weakly aggressive ones, accounting for 48.5%, 21.2% and 30.3%, respectively. The results also showed that the pathogenicity of isolates had no significant difference among different regions, but the pathogenicity of isolates from the same region showed significant difference. The wilting capability of the crude toxin secreted by *V. dahliae* isolates were also tested, the results showed that the crude toxin of different isolates had different wilting capability; the crude toxin secreted by the highly aggressive isolates had strong wilting capability. The average wilt index of the highly aggressive isolates, moderate aggressive ones and weakly aggressive ones at 72 h were 63.82, 52.38 and 45.83 respectively at the same concentration. The crude protein contents secreted by different isolates were also tested by the Coomassie Brilliant Blue G250 method. The crude protein contents of different isolates of *V. dahliae* had a significant positive correlation with the pathogenicity index. Highly aggressive isolates secreted more proteins than the weakly aggressive ones.

Key words: cotton *Verticillium* wilt; *Verticillium dahliae*; pathogenicity; toxin

由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)引起的棉花黄萎病是一种世界性病害。据报道,黄萎病在河南省部分地区棉田发病率达 100%,已成为制约河南省棉花生产发展的一个重要因素^[1]。不同

的棉花黄萎病菌菌系之间,存在着致病性差异^[2-3]。美国 Schnathorst 等根据不同菌系对棉花致病的严重程度和症状类型,将其划分为落叶型 T1 和非落叶型 SS4。70 年代全国棉花枯、黄萎病协作

收稿日期:2010-03-23 作者简介:桑 茜(1985-),女,在读硕士研究生,sangxisx@163.com;* 通讯作者,汪 敏(1974-),男,博士,硕士生导师,wangm05@sohu.com

基金项目:国家自然科学基金项目(30700520);农业部公益性行业科研专项(nyhyzx07-052);河南自然科学基金(2008A208015);河南高校博士启动基金项目(30400229)

组以病情指数为指标,将不同棉花品种对棉花黄萎病菌的反应分为抗、感、耐3种反应型,并以此为依据将我国棉花黄萎病菌划分为3个生理型^[4]。

目前,研究表明黄萎病菌侵染棉花后产生的糖蛋白毒素,是棉花黄萎病菌主要的致病因子^[5]。Keen等^[6]报道,棉花品种对毒素的敏感性与对病原菌的敏感性密切相关。章元寿等^[7]研究揭示棉花黄萎病菌落叶型菌系产生毒素比非落叶型菌系高2~3倍,其落叶型菌株分泌毒素蛋白质和多糖的含量也明显大于非落叶型菌株,研究认为不同菌系产生的毒素量的差异是引起致病力差异的主要因素。

黄萎病菌作为典型的土传性病原菌,致病力容易变异,出现强致病力类型。强致病力落叶型菌系大量存在是棉花黄萎病严重发生的重要原因之一。宋晓轩、朱荷琴等相继报道河南安阳出现强致病力落叶型菌系^[8-9]。本课题组研究也表明

河南不同地区的35个棉花黄萎病菌分离物致病力存在明显差异^[10]。但对河南棉花黄萎病菌致病性分化及其致病力类型尚缺乏系统、深入的研究。为此,2008—2009年进一步分离并鉴定了33个河南省不同地区棉花黄萎病菌分离物,测定其致病力和毒素致萎活性,研究黄萎病菌致病性分化情况,以期为棉花黄萎病抗病品种的选育和推广以及棉花黄萎病的综合防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试棉花黄萎病菌分离物

2008年从河南省主要产棉区棉花黄萎病株中分离获得33个单孢分离物,经鉴定后采用滤纸片法将单孢分离物保存于-20℃冰箱(表1)。对照分离物T9、V991、V246分别由中国农业科学院植保所简桂良和中国农业大学齐俊生提供。

表1 河南省棉花黄萎病菌采集地点

Table 1 The collecting locations of *V. dahliae* isolates from cotton in Henan

分离物名称	采集地点	分离物名称	采集地点	分离物名称	采集地点
T9	中国农科院植保所	HNNY-3	河南南阳市社旗县	HNXX-6	河南新乡市新乡县
V991	中国农科院植保所	HNNY-4	河南南阳市唐河县	HNXX-7	河南新乡市卫辉市
V246	中国农业大学植保系	HNNY-5	河南南阳市新野县	HNXX-8	河南新乡市延津县
HNAY-5	河南安阳市滑县	HNNY-6	河南南阳市卧龙区	HNXX-9	河南新乡市延津县
HNAY-6	河南安阳市内黄县	HNNY-7	河南南阳市宛城区	HNZK-4	河南周口市淮阳县
HNAY-7	河南安阳市安阳县	HNSQ-6	河南商丘市睢阳区	HNZK-5	河南周口市太康县
HNQX-1	河南开封市杞县	HNSQ-7	河南商丘市民权县	HNZK-6	河南周口市鹿邑县
HNQX-2	河南开封市杞县	HNSQ-8	河南商丘市民权县	HNZK-7	河南周口市扶沟县
HNQX-3	河南开封市杞县	HNSX-1	河南商丘市睢县	HNPY-1	河南濮阳市郊区
HNQX-4	河南开封市杞县	HNSX-2	河南商丘市睢县	HNJZ-1	河南焦作市武陟县
HNKF-4	河南开封市开封县	HNSX-3	河南商丘市睢县	HNHFQ-1	河南黄泛区农场
HNKF-5	河南开封市金明区	HNXX-5	河南新乡市原阳县	HNXC-1	河南许昌市鄢陵县

1.2 棉花黄萎病菌致病力测定

供试棉花品种为银山1号,为感棉花黄萎病品种,种子由河南省农科院棉花油料研究所提供。将棉种脱绒催芽后,播种到装有灭菌土的纸杯(高90 mm,直径75 mm,杯底剪掉)中,每杯播6粒种子,种植在温室中。待棉苗长至1~2片真叶时,采用石磊岩等^[11]纸钵撕底蘸根法进行苗期致病力测定,接种黄萎病菌孢子浓度为 1.0×10^7 个·mL⁻¹。选择棉苗根系生长良好的棉苗进行接种,每个分离物接种6钵,每钵6株棉苗,接种温

室湿度控制在70%~90%,温度保持在20~25℃左右,接菌后2 d浇水1次。

接种30 d后,采用棉花苗期分级标准进行病情调查,并记载病情^[11],即:0级:健株,无症状;1级:1~2片子叶发病;2级:1片真叶发病;3级:2片以上真叶发病或脱落仅剩心叶;4级:植株生长点或全株枯死。根据病情指数将黄萎病菌致病力分为强、中、弱3种类型,强:平均病指35.1~100;中:平均病指20.1~35.0;弱:平均病指0.1~20.0;无致病力:平均病指为0。

1.3 棉花黄萎病菌分离物分泌粗蛋白含量测定

将待测黄萎病菌分离物及对照菌株 T9、V991、V246 接种于 Czapek 液体培养基中^[12],在 25℃ 黑暗条件下,120 r·min⁻¹ 震荡培养 15 d。将培养好的菌液,用 4 层脱脂纱布过滤后,滤液在 8℃ 下 15000×g 离心 20 min,取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤,得毒素粗滤液^[7,13]。采用 Bradford 考马斯亮兰法^[14]测定毒素粗滤液 OD₅₉₅ 值,以牛血清蛋白(BSA)作标准曲线,并根据标准曲线方程估测样品粗蛋白含量。

1.4 棉花黄萎病菌分离物粗毒素致萎活性检测

将各黄萎病菌分离物的粗滤菌液稀释成相同浓度为 8.8 μg·mL⁻¹ 的粗毒素滤液。棉种脱绒并用次氯酸钠消毒催芽后,播种到灭菌细沙的穴盘中,25℃ 温室中培养,待真叶长出后浇 White 水培液和无菌水。待棉花长至 1~2 片真叶时,将棉苗放入含不同黄萎病菌分离物毒素滤液的试管内,每个分离物 7 管,每管 2 株棉苗,分别在 48 h 和 72 h 观察粗毒素致萎情况^[15-17],并设无菌水、未接菌的培养液为对照。

幼苗萎蔫分级标准:0 级:幼苗无症状;1 级:两子叶下垂、失水,真叶无变化;2 级:两子叶下垂、黄化、失水,真叶轻度下垂、卷曲;3 级:两子叶下垂、黄化、失水,真叶下垂、失水、干枯;4 级:全

株萎蔫,真叶脱落。

致萎指数 = (致萎级值 × 该级株数) / (调查总株数 × 4) × 100 %。

1.5 数据分析

采用 SPSS 软件对数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 不同黄萎病菌分离物致病力测定

利用伤根法测定了河南省不同地区棉花黄萎病菌分离物致病力。河南省不同棉区 33 个黄萎病菌分离物中,强致病力的黄萎病菌分离物为 16 株,占 48.5 %,这些分离物在棉苗上表现为发病早、侵染快,造成植株叶片大量脱落;中等致病力的黄萎病菌分离物有 7 个,占 21.2 %,表现为发病较晚,侵染较慢,死苗较少;弱致病力的黄萎病菌分离物有 10 个,占 30.3 %,表现为发病迟缓,侵染慢,一般不造成落叶死苗(表 2)。

从病情指数来看,河南省同一地区的不同分离物间致病力存在明显差异(表 2)。如河南新乡市延津县 2 个黄萎病菌分离物 HNXX-8 和 HNXX-9 病情指数分别为 46.60 和 18.39,分别属于强致病力黄萎病菌分离物和弱致病力黄萎病菌分离物;河南商丘市民权县分离物 HNSQ-7 和 HNSQ-8 平均病情指数分别为 51.04 和 21.18,分

表 2 36 个棉花黄萎病菌分离物致病力测定结果

Table 2 The results of pathogenicity of 36 *V. dahliae* isolates on cotton

分离物名称	平均病情指数	是否为落叶型	分离物名称	平均病情指数	是否为落叶型
T9	51.88	是	HNQX-4	36.63	否
V991	40.18	是	HNXX-6	32.95	否
V246	54.25	否	HNNY-4	32.75	否
HNNY-3	66.40	是	HNKF-4	29.02	否
HNPY-1	64.84	是	HNNY-5	25.00	否
HNZK-7	60.86	是	HNXX-7	27.31	否
HNAY-5	59.72	是	HNSX-1	24.24	否
HNXX-5	59.38	是	HNSQ-8	21.18	否
HNJZ-1	59.24	是	HNAY-6	19.10	否
HNZK-4	58.75	否	HNXX-9	18.39	否
HNXC-1	58.68	是	HNHFQ-1	16.71	否
HNSQ-7	51.04	否	HNSX-2	14.81	否
HNSQ-6	50.40	否	HNKF-5	14.68	否
HNXX-8	46.60	否	HNNY-6	10.65	否
HNQX-1	44.70	否	HNAY-7	9.26	否
HNQX-2	44.61	否	HNZK-6	8.33	否
HNQX-3	40.83	否	HNNY-7	6.67	否
HNZK-5	39.58	否	HNSX-3	0.83	否

别属于强致病力黄萎病菌分离物和中等致病力黄萎病菌分离物；河南周口地区的4个分离物HNZK-7、HNZK-4、HNZK-5和HNZK-6病情指数分别为60.86、58.75、39.58和8.33,前3个属于强致病力黄萎病菌分离物,HNZK-6属于弱致病力黄萎病菌分离物。从整体看来,河南开封市杞县黄萎病菌分离物致病力较强,病情指数分别为44.7、44.61、40.83和36.63,均为强致病力黄萎病菌分离物。

2.2 不同黄萎病菌分离物粗毒素蛋白含量与其致病力测定

利用考马斯亮兰法测定了33个黄萎病菌分离物和3个对照黄萎病菌分泌的粗蛋白含量,结果表明,不同黄萎病菌分离物分泌的粗蛋白含量存在差异,且粗蛋白含量与其病情指数极显著正相关($r=0.8643^{**}$)(表3)。黄萎病菌分离物致病力越强,粗毒素蛋白含量越高,反之,黄萎病菌分离物致病力越弱,粗毒素蛋白含量越低。

表3 36个棉花黄萎病菌分离物粗蛋白含量

Table 3 The crude protein contents of cultural fluid from 36 *V. dahliae* cotton isolates

分离物名称	蛋白含量 /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	分离物名称	蛋白含量 /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	分离物名称	蛋白含量 /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
T9	48.96	HNSQ-6	61.46	HNSX-1	43.75
V991	45.83	HNXX-8	71.88	HNSQ-8	38.54
V246	85.45	HNQX-1	68.75	HNAY-6	35.42
HNNY-3	102.08	HNQX-2	57.29	HNXX-9	45.83
HNPY-1	84.38	HNQX-3	52.08	HNHFQ-1	34.38
HNZK-7	88.54	HNZK-5	51.04	HNSX-2	31.25
HNAY-5	77.08	HNQX-4	58.33	HNKF-5	34.38
HNXX-5	120.83	HNXX-6	47.92	HNNY-6	37.50
HNJZ-1	87.50	HNNY-4	42.71	HNAY-7	37.50
HNZK-4	90.63	HNKF-4	43.75	HNZK-6	33.33
HNXC-1	47.92	HNNY-5	40.63	HNNY-7	23.96
HNSQ-7	59.38	HNXX-7	37.50	HNSX-3	17.71

2.3 粗毒素致萎活性测定

为测定不同棉花黄萎病菌分离物粗蛋白毒素对棉花幼苗的致萎作用,用同一浓度的粗蛋白毒素处理棉花幼苗,在48 h、72 h分别调查致萎活性。结果表明,不同致病力的黄萎病菌分离物粗蛋白毒素致萎力存在差异,且致萎程度随时间的增加而增加,48 h开始呈现萎蔫症状,在72 h达到高峰,而后症状趋向稳定。同等浓度 $8.8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 下,绝大多数强致病力黄萎病菌分离物致萎活性较强,72 h时的平均致萎指数为63.82;中等致病力黄萎病菌分离物72 h时的平均致萎指数为52.38;弱致病力黄萎病菌分离物致萎活性较弱,平均致萎指数为45.83(表4)。

3 讨论

通过对来自河南省不同产棉区的33个棉花黄萎病菌分离物的致病力测定,再一次证实了河南省不同地区棉花黄萎病菌分离物之间存在致

病力差异,其中强致病力黄萎病菌分离物、中等致病力黄萎病菌分离物和弱致病力黄萎病菌分离物分别占48.5%、21.2%、30.3%,该结果与杨凤祥等^[10]的报道基本一致。研究结果发现,河南省同一地区的不同分离物间致病力存在明显差异。另外,宋晓轩、朱荷琴、杨凤祥等^[8-10]报道河南扶沟县、新野县、原阳县、鄢陵县和安阳地区存在落叶型强致病力黄萎病菌菌株。本研究进一步发现河南南阳社旗县、焦作武陟县、濮阳县也相继出现了强致病力的落叶型菌株,说明河南主要产棉区均出现了强致病力菌株,对这些地区应进一步加强棉花黄萎病菌的监测预警工作。

黄萎病菌侵染棉株后,分泌的轮枝菌素(VD)是导致黄萎病的关键因子。本研究表明黄萎病菌分离物分泌的粗毒素蛋白含量与其病情指数呈显著正相关,该结果与章元寿、甘莉等^[7,18]报道的结论一致,说明棉花黄萎病菌毒素可用于病原菌的致病力测定。研究还表明同一浓度下黄

表 4 不同棉花黄萎病菌分离物粗毒素对棉苗致萎活性测定
Table 4 Wilting capability of crude toxins from *V.dahliae* isolates on cotton seedlings

分离物	致萎指数		分离物	致萎指数	
	48 h	72 h		48 h	72 h
T9	45.83	66.67	HNQX-4	33.33	58.33
V991	37.50	58.33	HNXX-6	33.33	58.33
V246	33.33	37.50	HNNY-4	29.17	58.33
HNNY-3	50.00	66.67	HNKF-4	29.17	41.67
HNPY-1	45.83	66.67	HNNY-5	20.83	58.33
HNZK-7	45.83	66.67	HNXX-7	25.00	58.33
HNAY-5	41.67	66.67	HNSX-1	25.00	41.67
HNXX-5	41.67	66.67	HNSQ-8	29.17	50.00
HNJZ-1	41.67	66.67	HNAY-6	25.00	66.67
HNZK-4	45.83	66.67	HNXX-9	29.17	66.67
HNXC-1	45.83	66.67	HNHFQ-1	25.00	33.33
HNSQ-7	41.67	66.67	HNSX-2	20.83	41.67
HNSQ-6	37.50	66.67	HNKF-5	29.17	58.33
HNXX-8	37.50	66.67	HNNY-6	25.00	50.00
HNQX-1	37.50	66.67	HNAY-7	20.83	33.33
HNQX-2	37.50	66.67	HNZK-6	20.83	33.33
HNQX-3	33.33	58.33	HNNY-7	16.67	33.33
HNZK-5	33.33	66.67	HNSX-3	16.67	41.67

萎病菌分泌的粗毒素对棉苗的致萎力不同,强致病力黄萎病菌分离物的粗毒素致萎力较强,弱致病力黄萎病菌分离物的粗毒素致萎力较弱,该结果与甘莉、吕金殿等^[18]的结论一致,同时也表明强致病力黄萎病菌分泌蛋白中可能存在较强致萎性的效应蛋白分子。最近 El-Bebany^[19]利用蛋白质组学途径对不同侵染力的番茄黄萎病菌进行了研究,结果表明强侵染力的黄萎病菌存在着独特的蛋白质因子,该因子能抑制寄主植物抗病信号水杨酸(SA)的合成。近年来越来越多的植物病原真菌分泌的效应蛋白分子功能被鉴定^[20]。黄萎病菌分泌的总蛋白中,可能含有多种具有致病作用的效应蛋白分子。本研究仅对黄萎病菌分泌的总蛋白含量及其致萎作用进行了测定,有必要深入研究不同侵染力的黄萎病菌分泌蛋白组学,探讨棉花黄萎病菌致病的分子机理。

目前,黄萎病接种方法有纸钵撕底蘸根法、液体培养棉花苗期孢子悬浮液浸根法和针刺接种法等^[11,21-22]。纸钵撕底蘸根法接种时可能出现伤根不均匀造成发病不均匀情况。叶片针刺涂抹法可准确、快速检测棉花黄萎病菌毒素致萎活性,但存在接种时针刺力度大小不一、大批量接种较繁琐的不足。本研究采用纸钵撕底蘸根法测定黄萎病菌致病力,并利用棉花黄萎病菌粗毒素接种

棉苗进行进一步验证。研究发现中等致病力黄萎病菌 HNAY-6、HNXX-9 致萎指数偏高,可能与纸钵撕底蘸根接种时伤根不均匀有关,对两者致病力需进一步确认。

参考文献:

- [1] 张改英,徐恒玉. 棉花黄萎病及其综合防治技术[J]. 河南农业科学, 2002(9): 27-28.
ZHANG Gai-ying, Xu Heng-yu. Cotton *Verticillium* wilt and its integrated prevention and control technique[J]. Henan Agricultural Sciences, 2002(9): 27-28.
- [2] 景忆莲,刘耀斌,万法,等. 棉花黄萎病及其抗性育种研究进展[J]. 西北农业学报, 1999, 8(3): 106-110.
JING Yi-lian, Liu Yao-bin, Fan Wan-fa, et al. Advance in the study on *Verticillium* wilt of cotton and its breeding for resistance [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 1999, 8 (3): 106-110.
- [3] 朱荷琴,宋晓轩,简桂良. 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.
ZHU He-qin, Song Xiao-xuan, Jian Gui-liang. The preliminary study of variation mechanism of pathogenic type of *Verticillium dahliae* Kleb[J]. Cotton Science, 2004, 16(5): 275-279.
- [4] 刘学堂,宋晓轩,郭金城. 棉花黄萎病菌的研究及最新进展[J]. 棉花学报, 1998, 10(1): 6-13.
LIU Xue-tang, Song Xiao-xuan, Guo Jin-cheng. Studies and advances on cotton *Verticillium* wilt[J]. Cotton Science, 1998, 10 (1): 6-13.

- [5] WANG Jian-ying, Yu Cai, Gou Jing-ying, et al. VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70 (8): 4989-4995.
- [6] KEEN N T, Erwin D C. Endopolygalacturonase: evidence against involvement in *Verticillium* wilt of cotton [J]. Phytopathology, 1971, 61: 198-203.
- [7] 章元寿, 王建新, 刘经芬, 等. 大丽轮枝菌毒素的分离、提纯及生物测定 [J]. 真菌学报, 1989, 8(2): 140-147.
ZHANG Yuan-shou, Wang Jian-xin, Liu Jing-fen, et al. Studies on the isolation, purification and bioassay of toxin from *Verticillium dahliae* Kleb [J]. Acta Mycologica Sinica, 1989, 8(2): 140-147.
- [8] 宋晓轩, 朱荷琴, 郭金城. 棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae* Kleb.) 安阳分离物致病力分化研究 [J]. 中国农业科学, 1997, 30(1): 13-18.
SONG Xiao-xuan, Zhu He-qin, Guo Jin-cheng. Study on pathogenicity differentiation for *Verticillium dahliae* Kleb. Anyang strains in cotton [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1997, 30 (1): 13-18.
- [9] 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 [J]. 棉花学报, 1999, 11(6): 312-317.
ZHU He-qin, Song Xiao-xuan, Sun Jun-ling, et al. Study on pathogenic type in Anyang strains of *Verticillium dahliae* Kleb [J]. Cotton Science, 1999, 11(6): 312-317.
- [10] 杨凤祥, 桑茜, 马奇祥, 等. 河南省棉花黄萎病菌培养特性与致病力分化研究 [J]. 河南农业科学, 2009 (6): 85-89.
YANG Feng-xiang, Sang Xi, Ma Qi-xiang, et al. Study on the cultural characteristics and pathogenic differentiation of *Verticillium dahliae* from cotton in Henan [J]. Henan Agricultural Sciences, 2009(6): 85-89.
- [11] 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.
SHI Lei-yan, Wang Bo, Wen Xue. Study on type differentiation and cultural characteristics of cotton *Verticillium* wilt in China [J]. Acta Phytologica Sinica, 1993, 20(3): 247-252.
- [12] 甘莉, 吕金殿. 棉花黄萎病菌毒素的分离提纯及致萎活性测定 [J]. 西北农业大学学报, 1991, 19(1): 49-56.
GAN Li, Lü Jin-dian. Studies on the isolation, purification and wilting activity determination of toxin from *Verticillium dahliae* Kleb [J]. Acta Universitatis Agriculturae Boreali-occidentalis, 1993, 20(3): 247-252.
- [13] 张慧霞, 许楠, 杨家荣, 等. 棉花黄萎病菌毒素的提取及其生物活性测定 [J]. 西北农业学报, 2008, 17 (3): 312-314.
ZHANG Hui-xia, Xu Nan, Yang Jia-rong, et al. Extraction and bioassay of the toxin produced by *Verticillium dahliae* [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2008, 17(3): 312-314.
- [14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [15] LI Ying-zhang, Zheng Xiao-hua, Tang Hai-lin, et al. Increase of β -1,3-glucanase and chitinase activities in cotton callus cells treated by salicylic acid and toxin of *Verticillium dahliae* [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(7): 802-808.
- [16] 吕金殿, 甘莉, 阎龙飞. 棉花黄萎病菌毒素的纯化及特性研究 [J]. 植物病理学报, 1991, 21 (2): 129-133.
LÜ Jin-dian, Gan Li, Yan Long-fei. Purified toxin of *Verticillium dahliae* from cotton and its properties [J]. Acta Phytologica Sinica, 1991, 21(2): 129-133.
- [17] WHITE P R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium [J]. Plant Physiology, 1934, 9: 585-600.
- [18] 甘莉, 吕金殿, 汪沛洪. 棉花黄萎病菌分泌的糖蛋白毒素与其致病力的关系 [J]. 中国农业科学, 1995, 28(2): 58-65.
GAN Li, Lü Jin-dian, Wang Pei-hong. The relationship between glycoprotein toxin secreted from *Verticillium dahliae* of cotton and its pathogenicity [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1995, 28(2): 58-65.
- [19] EL-BEBANY A F, Rampitsch C, Daayf F. Proteomic analysis of the phytopathogenic soilborne fungus *Verticillium dahliae* reveals differential protein expression in isolates that differ in aggressiveness [J]. Proteomics, 2010, 10(2): 289-303.
- [20] ELLIS J G, Rafiqi M, Gan P, et al. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(4): 399-405.
- [21] 彭珊, 吕学莲, 高峰, 等. 一种新的棉花黄、枯萎病快速接种方法的研究 [J]. 棉花学报, 2008, 20(3): 174-178.
PENG Shan, Lü Xue-lian, Gao Feng, et al. Study on a new rapid inoculation method for *Verticillium* wilt and *Fusarium* wilt of cotton [J]. Cotton Science, 2008, 20(3): 174-178.
- [22] 齐俊生, 李怀方. 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 [J]. 棉花学报, 2006, 18(4): 228-232.
QI Jun-sheng, Li Huai-fang. A new detection method of wilting induction by phytotoxin from *Verticillium dahliae* on cotton through leaf pricking and spreading [J]. Cotton Science, 2006, 18 (4): 228-232. ●