

河北省棉花黄萎菌落叶型和非落叶型菌系初步鉴定

王彦^{1,2}, 鹿秀云², 郭庆港², 李宝庆², 张乃瑾³, 李社增², 马平², 董金皋¹

(1. 河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071000;

2. 河北省农林科学院 植物保护研究所, 河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心, 河北 保定 071000;

3. 河北省石津灌区管理局, 河北 石家庄 050051)

摘要: 利用 PCR 特异性扩增技术对从采自河北省的 228 株棉花黄萎菌 (*Verticillium dahliae*)、四川省的 2 株棉花黄萎菌 (菌株 Sch-1 和 Sch-3)、辽宁省的 1 株黄萎菌 (菌株 Ly-1)、棉花黄萎菌标准菌株 (落叶型标准菌株 T9 和非落叶型标准菌株 V97) 和 3 株棉花枯萎菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*) 菌株进行了落叶型和非落叶型菌系的鉴定。结果表明, 利用 *V. dahliae* 特异性引物 DB19/DB22 从 233 株黄萎菌中均可获得 500 bp 的特异性片段, 而 3 株棉花枯萎菌中不能获得扩增产物。分别利用非落叶型特异性引物 INTNdf/INTNdr 和落叶型特异性引物 INTD2f/INTD2r 对 233 株黄萎菌进行 PCR 扩增。菌株 Sch-1、Sch-3、Ly-1 及非落叶型黄萎菌标准菌株 V97 利用非落叶型特异性引物 INTNdf/INTNdr 可扩增出 1 100 bp 的产物; 采自河北省的 228 株黄萎菌和落叶型标准菌株 T9 利用落叶型特异性引物 INTD2f/INTD2r 可扩增出 450 bp 的产物。结果表明, 目前河北省主要棉区棉花黄萎病菌以落叶型黄萎菌菌株为主。

关键词: 棉花黄萎菌; 落叶型菌系; 非落叶型菌系; 初步鉴定

中图分类号: S435.62 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0196-05

Molecular Identification of Defoliating Pathotype and Non-defoliating Pathotype of *Verticillium dahliae* from Cotton in Hebei Province

WANG Yan^{1,2}, LU Xiu-yun², GUO Qing-gang², LI Bao-qing², ZHANG Nai-jin³,
LI She-zeng², MA Ping², DONG Jin-gao¹

(1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China; 2. Institute of Plant

Protection, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, JPM Centre of Hebei Province,

Baoding 071000, China; 3. Management Bureau of Shijing Irrigation Area in Hebei, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: Two hundred and thirty three strains of *V. dahliae* and three strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* were isolated from cotton of the major cotton production areas in Hebei, Sichuan and Liaoning provinces. The defoliating and nondefoliating pathotypes of these strains were evaluated by PCR amplification. Three pairs of primers, which are specific for identifying *V. dahliae*, defoliating and nondefoliating pathotypes, respectively, were used in the PCR analysis. Results showed that the *V. dahliae*-specific bands were amplified from all the 233 strains of *V. dahliae* isolates, but not the 3 strains of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* by using *V. dahliae* specific primers DB19/DB22. PCR amplification with nondefoliating pathotype-specific primers INTNdf/INTNdr revealed that strains Sch-1, Sch-3 from Sichuan province and strain Ly-1 from Liaoning province are nondefoliating type. Defoliating pathotype-specific DNA bands (450 bp) were amplified with primers INTD2f/INTD2r from all the 228 strains of *V. dahliae* from Hebei province as well as the defoliating standard strain T9. Our results indicated that defoliating pathotype of *V. dahliae* was dominant in the cotton growing area of Hebei province.

Key words: *Verticillium dahliae*; Defoliating pathotype; Non-defoliating pathotype; Molecular identification

棉花黄萎病 (Cotton *verticillium* wilt) 是棉花生产上危害最为严重的世界性病害之一, 在世界棉花主

收稿日期: 2010-06-02

基金项目: 国家棉花产业技术体系项目; 公益性行业 (农业) 科研专项 (nyhyzx07-052)

作者简介: 王彦 (1983-), 女, 河北邯郸人, 硕士, 主要从事棉花病害研究。

通讯作者: 马平 (1964-), 男, 江苏南京人, 研究员, 博士生导师, 主要从事棉花病害和植物病害生物防治研究。

要棉区均有发生,极大地限制着棉花产量和质量
的提高。在我国,棉花黄萎病是由大丽轮枝菌(*Verti-
cillium dahliae* Kleb.) 引起的,黄萎病菌的发病症状
表现为萎蔫、褪绿、黄化、组织坏死、生长迟缓和导管
褐化等现象^[1]。根据 *V. dahliae* 引起棉花完全落叶
或引起轻微落叶的现象,将其分为落叶型(Defolia-
ting) 和非落叶型(Non-defoliating) 菌系。以往报道
棉花黄萎菌落叶型菌系主要存在于我国南方地区,
而在黄河流域主要以非落叶型菌系为主。但近年来
调查发现,在河北省也发现了由于黄萎病的危害而
造成棉株全株落叶并死亡的现象,并且证实其为落
叶型黄萎病菌^[2]。通过对山西省棉花黄萎病菌致
病力分化研究,发现山西省棉花黄萎病有落叶型菌
系存在^[3]。

为了明确棉花黄萎菌落叶型菌系在河北省出现
的几率和分布,本研究利用国际公认的 *V. dahliae* 特
异性引物、落叶型特异性引物和非落叶型特异性引
物,通过 PCR 技术对采自河北省主要棉区 38 个县
的 228 株棉花黄萎菌菌株、采自四川省的黄萎菌菌

株 Sch-1 和 Sch-3、采自辽宁省的黄萎菌菌株 Ly-1 及
棉花黄萎菌标准菌株 T9(落叶型标准菌株) 和 V97
(非落叶型标准菌株) 进行分子鉴定。明确其菌系
类型和分布,将为棉花黄萎病的预测预报、植物检
疫、抗病育种及品种的合理布局提供理论依据,以控
制落叶型菌株的危害与蔓延,降低棉花的损失。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

本研究共分离收集棉花黄萎菌菌株 233 株,其
中菌株 Sch-1 和 Sch-3 采自四川省,菌株 Ly-1 采自
辽宁省,其他 228 株采自河北省各县市棉田,均通过
单孢分离保存(菌株名称及采集地见表 1,菌株采集
时选取各县代表性地块,尽可能分布均匀,不同菌株
代表不同采样地块) 2 株棉花黄萎菌标准菌株(落
叶型标准菌株 T9 和非落叶型标准菌株 V97) 由河北
农业大学农学院作物遗传育种实验室惠赠。另外,
用于检测 *V. dahliae* 特异性引物特异性的 3 株棉花枯
萎菌株(菌株 1-1、1-2 和 1-3),也由本实验室保存。

表 1 供试黄萎菌菌株代号及来源

Tab.1 The information of tested *V. dahliae* strains and type strains

采集地点 Sampling site	菌株株数 Strains quantity	采集地点 Sampling site	菌株株数 Strains quantity	采集地点 Sampling site	菌株株数 Strains quantity
河北省泊头市	2	河北省唐山市	2	河北省邱县	5
河北省南皮县	16	河北省肥乡县	10	河北省宁晋县	1
河北省东光县	8	河北省馆陶县	1	河北省新河县	1
河北省阜城县	5	河北省盐山县	5	河北省广宗县	3
河北省武邑县	6	河北省魏县	1	河北省河间市	1
河北省吴桥县	8	河北省景县	7	河北省孟村县	1
河北省故城县	5	河北省平乡县	10	河北省威县	22
河北省巨鹿县	7	河北省霸州市	1	河北省高阳县	4
河北省永年县	1	河北省安次县	2	河北省曲周县	14
河北省邯郸市	1	河北省丰南区	8	河北省鸡泽县	5
河北省临西县	9	河北省南宮市	21	河北省冀州市	6
河北省献县	14	河北省辛集市	4	河北省枣强县	5
河北省成安县	2	河北省广平县	4	辽宁省	1
四川省	1	标准菌株	2		

1.2 棉花黄萎菌的分子鉴定

1.2.1 棉花黄萎菌菌丝的培养 将保存的棉花黄
萎菌菌株接种在 PDA 平板上活化,打孔器(直径:
0.6 cm) 打孔,取 1 块棉花黄萎菌菌饼接种在 PDA
培养基上,25℃ 黑暗培养 15 d,待菌落长满平皿后,
用灭菌刀刮取菌丝(约 0.3 g) 至 1.5 mL 离心管中
(内置 0.1 mL 灭菌石英砂和 1 粒直径 3 mm 的玻璃
珠),置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 棉花黄萎菌总 DNA 的提取 棉花黄萎菌总
DNA 的提取参照 Fast DNA 提取试剂盒所用的方法

进行提取。

加 1 mL DNA 提取缓冲液至装有棉花黄萎菌菌
丝的 1.5 mL 离心管中,室温静置 30 min,在核酸提
取仪上震动 2 次,每次 30 s,频率为每秒 5 下,12 000
r/min 离心 5 min,取 750 μ L 上清液至新的 1.5 mL
离心管中,加 125 μ L 去蛋白液 PPS(Protein precipita-
tion solution),颠倒混匀 5 次,12 000 r/min 离心 5
min,取 700 μ L 上清液到另一个 1.5 mL 离心管中,
加入等体积的冰异丙醇,-20℃ 沉淀 1 h,12 000
r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀用 500 μ L -20℃ 的

80% 乙醇冲洗一次,12 000 r/min 离心,弃上清,沉淀在超净工作台中吹干后,加入 50 μ L TE 溶解,

表 2 PCR 扩增所用引物及其序列

Tab. 2 Nucleotide sequence of PCR primers

引物 Primer	引物类型 Primer types	引物序列 Primer sequence	目的片段大小 Fragments size
DB19/DB22 ^[4]	<i>V. dahliae</i> 特异性引物	5'-CGGTGACATAATACTGAGAG-3' 5'-GACGATGCGGATTGAACGAA-3'	539
INTD2f/INTD2r ^[5]	落叶型菌系特异性引物	5'-ACTGGGTATGGATGGCTTTCAGGACT-3' 5'-TCTCGACTATTGGAATCCAGCGAC-3'	462
INTNDf/INTNDr ^[6]	非落叶型特异性引物	5'-CCACCGCCAAGCGACAAGAC-3' 5'-TAAAACTCCTTGGGGCCAGC-3'	1 162

1.2.3 PCR 扩增体系和扩增条件 根据文献[7, 8]报道,选择 *V. dahliae* 特异性引物(DB19/DB22)、落叶型菌系特异性引物(INTD2f/INTD2r)和非落叶型菌系特异性引物(INTNDf/INTNDr)对供试棉花黄萎菌菌株进行检测。引物序列见表 2,引物由北京诺赛基因有限公司合成。

PCR 扩增反应体系为 20 μ L,包括 10 \times Buffer 2 μ L,2.5 mmol/L dNTP 2 μ L,引物 1 μ L,*Taq* 酶 1.25 U,模板 1 μ L,水 13.5 μ L。反应液在 PCR 仪(Biometra Tg)中进行扩增。扩增循环为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,55 $^{\circ}$ C (INTD2f/INTD2r 和 DB19/DB22)或 65 $^{\circ}$ C (INTNDf/INTNDr)退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 棉花黄萎菌的分子检测

利用 *V. dahliae* 特异性引物(DB19/DB22),分别以 231 株棉花黄萎菌供试菌株、2 株棉花黄萎菌标准菌株(落叶型标准菌株 T9 和非落叶型标准菌株 V97)和 3 株棉花枯萎菌菌株(菌株 1-1、1-2 和 1-3)的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,部分结果如图 1 所示,除 3 株棉花枯萎菌菌株外,231 株棉花黄萎菌供试菌株和 2 株棉花黄萎菌标准菌株均扩增到大小约为 500 bp 的特异性片段。结果表明,231 株棉花黄萎菌供试菌株均为棉花黄萎菌。

2.2 棉花黄萎菌非落叶型菌系的分子检测

利用 *V. dahliae* 非落叶型特异性引物(INTNDf/INTNDr)对所有棉花黄萎菌供试菌株进行 PCR 检测。结果仅在棉花黄萎菌株 Ly-1、Sch-1、Sch-3 和黄萎菌非落叶型标准菌株 V97 中扩增到大小约为 1 100 bp 的特异性片段,而落叶型标准菌株 T9 及其他供试菌株均未扩增出相应片段(图 2)。以上结果表明,采集自辽宁省的菌株 Ly-1 和采集自四川省的菌株 Sch-1、Sch-3 为棉花黄萎菌非落叶型菌株。



泳道 1~24 依次为菌株 Sch-1、Ly-1、15-2、165-3、190、194、204、210、212、218、234、239、Marker、254、270、323、315-3、320、T9、V97、321、322-1、CK、FOV1、FOV2。

Lane 1~24. Sch-1, Ly-1, 15-2, 165-3, 190, 194, 204, 210, 212, 218, 234, 239, Marker, 254, 270, 323, 315-3, 320, T9, V97, 322-1, CK, FOV1, FOV2.

图 1 特异性引物(DB19/DB22)对标准菌株和部分供试菌株 PCR 扩增产物的电泳图谱
Fig. 1 Electrophoresis of PCR products to standard strains and the partial tested strains using specific primers DB19/DB22



泳道 1~24 依次为菌株 CK、FOV1、FOV2、15-2、165-3、190、194、204、210、212、218、234、Marker、239、254、270、323、315-3、320、Sch-1、Ly-1、321、322-1、V97、T9。

Lane 1~24. CK, FOV1, FOV2, 15-2, 165-3, 190, 194, 204, 210, 212, 218, 234, Marker, 239, 254, 270, 323, 315-3, 320, Sch-1, Ly-1, 321, 322-1, V97, T9.

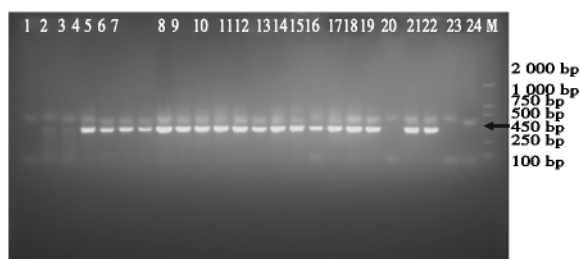
图 2 特异性引物(INTNDf/INTNDr)对标准菌株和部分供试菌株的电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis of PCR products to standard strains and the partial tested strains using specific primers INTNDf/INTNDr

2.3 棉花黄萎菌落叶型菌系的分子检测

利用 *V. dahliae* 的落叶型菌系特异性引物(INTD2f/INTD2r)对所有棉花黄萎菌供试菌株进行 PCR 检测,除棉花黄萎菌非落叶型菌株 Ly-1、Sch-1、Sch-3 和非落叶型标准菌株 V97 外,其他供试菌株和棉花黄萎菌落叶型标准菌株 T9 均扩增到大小约为 450 bp 的特异性片段(图 3)。以上结果表明,除

采自辽宁省和四川省棉田的菌株(菌株 Ly-1、Sch-1、Sch-3)外,其他 228 株采自河北省棉田的供试菌株均为棉花黄萎菌落叶型菌株。



泳道 1~24 依次为菌株 CK、Sch-1、Ly-1、15-2、165-3、190、194、204、210、212、218、234、239、254、270、323、315-3、320、T9、V97、321、322-1、FOV1、FOV2、Marker。
Lane 1~24. CK, Sch-1, Ly-1, 15-2, 165-3, 190, 194, 204, 210, 212, 218, 234, 239, 254, 270, 323, 315-3, 320, T9, V97, 321, 322-1, FOV1, FOV2, Marker.

图 3 特异性引物(INTD2f/INTD2r)对标准菌株和供试菌株 PCR 扩增产物的电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis of PCR products to standard strains and the partly tested strains using specific primers INTD2f/INTD2r

3 讨论

1966 年 Schnathorst 在美国首次报道棉花黄萎菌落叶型菌株,该菌株的毒力相当于非落叶型普通菌株 SS-4 的 10 倍,一旦侵入棉株,叶片很快出现萎蔫症状,并迅速脱落^[9]。Mercado-Blanco 从 2000 年以来一直致力于落叶型和非落叶型黄萎菌的分子检测工作,其设计的 *V. dahliae* 特异性引物、落叶型特异性引物和非落叶型特异性引物^[4-6],得到国际同行的认可。2008 年 Navas-Cortés 利用该引物对分离自西班牙南部橄榄树的黄萎菌进行了鉴定,结果表明,供试菌株的 87.2% 属于落叶型^[10]。2009 年高峰^[11]也利用上述黄萎菌特异性引物对人工接种土壤中的黄萎菌进行检测,结果表明 PCR 引物对黄萎菌不同菌系均具有较高的特异性。

我国关于棉花黄萎菌致病力分化研究主要是在 20 世纪 90 年代,如吴献忠等^[12]、马峙英等^[2]分别报道在山东、河北棉区发现落叶型菌系。1999 年石磊岩等^[13]采用 RAPD 扩增与温室致病性测定 2 种方法对我国北方棉区 6 个省(自治区)的 34 个棉花黄萎病菌株(其中 9 个菌株采自河北省)致病力分化进行研究,结果均发现其中 26 个菌株为落叶型菌株,7 个菌株采自河北省,占河北省供试菌株的 78%,落叶型菌株占有供试菌系的 76%,表明测试菌系中北方棉区尤其是河北省棉区棉花黄萎病菌落叶型菌系比例大幅度增加。2003 年邹亚飞^[14]等通过 AFLP 分析及温室致病力测定对 41 株棉花黄

萎菌进行研究,结果发现,落叶型菌株占供试菌株的 75%,其中所选取的河北省的棉花黄萎菌均为落叶型菌株。本研究从河北省、辽宁省和四川省等地主要棉区采集病株进行分离,经形态学和分子生物学鉴定 231 株均为棉花黄萎菌,利用 *V. dahliae* 落叶型菌系特异性引物和非落叶型菌系特异性引物对分离到的棉花黄萎菌单孢培养物的基因组 DNA 进行 PCR 检测,结果发现,除了采自辽宁省的黄萎菌菌株 LY-1 及四川省的黄萎菌菌株 Sch-1 和 Sch-3 为非落叶型菌株以外,从河北省采集的 228 株棉花黄萎菌菌株均为落叶型菌株。分析认为,目前生产上的棉花品种抗黄萎病或耐黄萎病水平和以往相比普遍提高,如 2000 年以来通过国家鉴定的兼抗枯、黄萎病的品种中棉所 2 号、邯 5158、冀杂 1 号,抗枯萎病耐黄萎病的品种中棉所 41、中棉所 49、中棉所 51、中棉所 52、中棉所 57 等^[15],抗病或耐病水平均有较大提高,这些品种的广泛应用,可能会使得棉田强致病力菌系——落叶型黄萎菌增加。另外,我们通过室内生测初步证明,经 PCR 检测为落叶型的菌株在同一棉花品种上,有的造成典型的落叶型症状,而有些菌株则造成非落叶型症状,说明同是落叶型菌株其致病力存在差异。这与邹亚飞^[14]和朱荷琴^[16]所报道的棉花黄萎菌落叶型菌系内存在致病性分化相一致。

本研究仅通过 PCR 技术对所采集到的棉花黄萎菌菌株进行了鉴定,虽然 PCR 技术可以快速对棉花黄萎落叶型与非落叶型致病菌进行区分,但也不能完全反映其致病力强弱。为进一步明确河北省棉花黄萎菌落叶型和非落叶型菌株鉴定的分布,一方面需要继续扩大样本的采集,另一方面还将采用鉴别寄主测定棉花黄萎菌菌株致病力的分化情况,为棉花黄萎病菌预警监测体系提供技术支持,同时也为棉花黄萎病的综合防治提供理论依据。

参考文献:

- [1] Fradin E F, Thomma B P H J. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum* [J]. Molecular Plant Pathology, 2006; 7(2): 71-86.
- [2] 马峙英, 王省芬, 张桂寅, 等. 河北省棉花黄萎病菌致病性的研究[J]. 棉花学报, 1997, 9(1): 15-20.
- [3] 许爱玲. 山西省棉花黄萎病菌致病力分化研究[J]. 山西农业科学, 2006, 34(1): 58-60.
- [4] Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Parrilla-Araujo S, et al. Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive

- plants by duplex ,nested polymerase chain reaction [J].
Plant Disease 2003 87(12) : 1487 – 1494.
- [5] Mercado-Blanco J , Rodriguez-Jurado D , Perez-Artes E *et al.* Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR [J]. European Journal of Plant Pathology 2002 108: 1 – 13.
- [6] Mercado-Blanco J , Rodriguez-Jurado D , Perez-Artes E , *et al.* Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR [J]. Plant Pathology 2001 50: 609 – 619.
- [7] Melania Collado-Romero , Jesús Mercado-Blanco , Concepción Olivares-García *et al.* Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers [J]. Phytopathology 2006 96(5) : 485 – 495.
- [8] Perez-Artes E , Mercado-Blanco J , Rodriguez-Jurado D *et al.* Detection of the defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* in artificial and natural soils by nested PCR [J]. Plant and Soil 2005 268: 349 – 356.
- [9] 董金皋. 农业植物病理学(北方本) [M]. 北京: 中国农业出版社 2001.
- [10] Navas-Cortés J A , Landa B B , Mercado-Blanco J *et al.* Spatiotemporal analysis of spread of infections by *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree density olive orchard in Southern Spain [J]. Phytopathology 2008 98(2) : 167 – 180.
- [11] 高峰, 刘培源, 马江峰, 等. 土壤中棉花黄萎病菌快速检测技术研究 [J]. 植物病理学报, 2009, 39(3) : 310 – 313.
- [12] 吴献忠, 李凤玲, 郑长英, 等. 山东棉花黄萎病菌致病力分化的研究 [J]. 植物保护, 1995 21(6) : 2 – 5.
- [13] 王莉梅, 石磊岩. 北方棉区棉花黄萎病菌落叶型菌系鉴定 [J]. 植物病理学报, 1999 29: 165 – 389.
- [14] 邹亚飞, 简桂良, 马 存, 等. 棉花黄萎病菌致病型的 AFLP 分析 [J]. 植物病理学报, 2003 33(2) : 135 – 141.
- [15] 朱荷琴, 冯自力, 刘雪英, 等. 转基因棉田黄萎病发生特点及控制技术 [J]. 中国棉花 2009 5: 20 – 21.
- [16] 朱荷琴, 简桂良, 宋晓轩. 棉田黄萎病菌致病型群落结构研究 [J]. 棉花学报 2004 16(3) : 147 – 151.