

新疆棉花黄萎病的发生现状及其病原菌的分子鉴定与ISSR分析

刘海洋^{1,2} 王琦² 王伟¹ 张仁福¹ 姚举^{1*}

(1. 新疆农业科学院植物保护研究所, 农业部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室, 农业部库尔勒作物有害生物科学观测实验站, 乌鲁木齐 830091; 2. 中国农业大学植物保护学院, 北京 100193)

摘要: 为掌握新疆主要植棉区棉花黄萎病的发生现状及其病原菌大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 的落叶型菌系分布以及遗传变异情况, 于2015年对26个新疆主要植棉区棉花黄萎病的发生情况进行了随机调查, 统计新疆大丽轮枝菌的培养性状, 利用大丽轮枝菌落叶型特异引物 D1/D2、INTD2F/INTD2R 与非落叶型特异性引物 ND1/ND2、INTNDF/INTNDR 对新疆大丽轮枝菌菌系进行互补鉴定, 并对部分菌系的遗传变异进行简单序列重复区间 (inter simple sequence repeat, ISSR) 分析。结果表明: 2015年新疆棉花黄萎病发病田比例为54.0%, 其中病情指数在10.0以上的发病田与2013年持平, 而病情指数在20.0以上的严重发病田比例为10.8%, 比2013年增加3.8个百分点; 新疆大丽轮枝菌的培养性状以菌核型为主, 比例为70.1%, 菌丝型与中间型比例分别为13.4%和16.5%; 新疆大丽轮枝菌落叶型菌系比例为53.2%, 26株菌株的来源地全部检出落叶型菌系; 聚类分析结果显示, 当遗传相似系数为0.66时, 新疆大丽轮枝菌落叶型与非落叶型菌系聚为2个谱系, 菌系地理来源、培养性状与大丽轮枝菌的遗传分化无明显相关性。

关键词: 大丽轮枝菌; 落叶型菌系; 遗传变异; 聚类分析

Molecular identification and ISSR analysis of *Verticillium dahliae* and the current status of cotton *Verticillium* wilt in Xinjiang

Liu Haiyang^{1,2} Wang Qi² Wang Wei¹ Zhang Renfu¹ Yao Ju^{1*}

(1. Scientific Observing and Experimental Station of Korla, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northwestern Oasis, Ministry of Agriculture; Institute of Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China;

2. College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to ascertain the occurrence of cotton *Verticillium* wilt, and the cultural characters, defoliating pathotype strains distribution, genetic variation of *Verticillium dahliae* in Xinjiang, the occurrence of cotton *Verticillium* wilt in 26 main cotton grow areas of Xinjiang was investigated in 2015, the cultural characters of *V. dahliae* which is the pathogen of cotton *Verticillium* wilt was observed, specific primers D1/D2, INTD2F/INTD2R and ND1/ND2, INTNDF/INTNDR were used to identify the defoliating and nondefoliating pathotypes of *V. dahliae* in Xinjiang, and also the genetic diversity of *V. dahliae* was analyzed by ISSR. The results showed that, the disease field of cotton *Verticillium* wilt accounted for 54.0% in 2015, among them, the cotton field which disease index above 10.0 were flat from 2013, the serious disease cotton field which disease index above 20.0 accounted for 10.8%, 3.8 percentage

基金项目: 农业部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室开放基金(KFJJ20170102), 新疆自治区重点研发计划项目(2016B01001-6)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: yaoju500@sohu.com

收稿日期: 2017-05-12

point higher than that of in 2013. In terms of cultural characters, sclerotia strains account for 70.1%, filamentous and intermediate strains account for 13.4% and 16.5% respectively. The defoliating pathotypes of *V. dahliae* account for 53.2% were detected from all the sample collection regions. At the genetic similarity coefficient of 0.66, defoliating and nondefoliating pathotypes of *V. dahliae* in Xinjiang could be completely divided into two lineages with no obvious genetic correlation in terms of geographical origin and cultural characteristics of *V. dahliae*.

Key words: *Verticillium dahliae*; defoliating pathotypes; genetic variation; cluster analysis

新疆维吾尔自治区(简称新疆)是我国最大的棉花种植区,在国家棉花产业中占有重要的战略地位。自2014年国家取消临时收储政策以来,内地棉区棉花种植面积大幅减少,大量内地棉种、棉纺企业转入新疆。随着全国棉花产业重心向该区转移,新疆棉花种植面积进一步扩大,但是,由于缺乏抗黄萎病品种,且棉花长年连作加之大规模轮作、倒茬困难等突出问题,致使棉花黄萎病在新疆棉区的发生逐年加重(刘海洋等,2015)。

棉花黄萎病是严重威胁棉花生产的土传病害,其病原菌大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 主要划分为落叶型和非落叶型两大类(顾本康等,1993;朱荷琴等,1997),我国大部分植棉区域均存在强致病力的落叶型菌系(吴献忠等,1995;马峙英等,1996;许爱玲,2006)。研究发现,大丽轮枝菌的ISSR指纹图谱与菌株的致病类型或地理来源存在明显的相关性(周兆华等,1999;毛岚等,2009;朱荷琴等,2012)。李国英等(2000)认为在中亚地区新疆大丽轮枝菌菌系属于致病力较强的菌系,但是朱荷琴等(2012)认为新疆大丽轮枝菌菌系的致病力偏弱。韩宏伟等(2011;2012)对2008年新疆南、北部棉区大丽轮枝菌菌系进行监测,发现落叶型菌系分别占33.3%和39.0%,较张莉等(2006)研究结果大幅增加。袁洪波等(2013)研究结果发现石河子市大丽轮枝菌菌系的遗传分化与致病力具有一定的相关性,但是未对全疆范围内大丽轮枝菌菌系的遗传变异进行研究。

为全面了解新疆棉区棉花黄萎病的发生现状以及大丽轮枝菌落叶型菌系的分布和遗传变异情况,本研究拟调查新疆主要植棉区棉花黄萎病的发生情况,并对新疆大丽轮枝菌菌系进行培养性状的统计、落叶型菌系的分子鉴定以及遗传多样性的简单序列重复区间(inter simple sequence repeat, ISSR)分析,以期明确新疆棉区棉花黄萎病的最新发生动态,对了解新疆棉花黄萎病的成灾规律以及合理布局品种具有重要的指导作用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:于2015年自新疆北部101团、123团、129团、130团、143团、144团、昌吉市、玛纳斯县、石河子市、沙湾县、乌苏市、精河县、博乐市以及新疆南部1团、3团、6团、库尔勒市、轮台县、尉犁县、库车市、阿克苏市、阿拉尔市、阿瓦提县、图木舒克市、莎车县、巴楚县共26个植棉区采集226株大丽轮枝菌菌株,单孢分离纯化后4℃保存备用。

培养基:马铃薯葡萄糖(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、葡萄糖15 g、琼脂粉12 g,去离子水定容至1 L。

试剂及仪器:Solarbio D2300 真菌基因组DNA试剂盒、Glenview DL2000 DNA Marker、Biomed 2×Taq PCR Master Mix,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。5810R型高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;DYCP-31DN电泳仪,北京六一仪器厂;TC-412型PCR仪,英国Techne公司;SYSTEM Gel-Doc XR+凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 棉花黄萎病发生情况调查

于2015年8月10日至9月6日对新疆主要植棉区域棉花黄萎病发生情况进行调查,按临近调查区域划分为10个片区进行统计,其中新疆北部划分为乌苏市-精河县-博乐市、奎屯市-沙湾县、石河子市-玛纳斯县-呼图壁县、五家渠市4个片区,新疆南部划分为库尔勒市-尉犁县-轮台县、沙雅县-新和县-库车县、阿克苏市、图木舒克市、巴楚县-麦盖提县、莎车县6个片区。共调查400块棉田,单块棉田面积约6.67~13.34 km²,每块棉田调查5点,每点调查100株棉花,计算每块调查棉田黄萎病的发病率和病情指数,与2013年调查数据进行对比(刘海洋等,2015),分析新疆棉区棉花黄萎病的发生变化趋势。发病率=发病株数/调查总株数×100%,病情指数=Σ(各级病株数×各级代表值)/(调查总株数×

4)×100, 发病棉田比例=发病棉田数量/调查棉田数量×100%, 平均病情指数=Σ 每块棉田病情指数/调查棉田数量。

1.2.2 大丽轮枝菌的培养性状观察

自供试226株大丽轮枝菌菌株中随机选取127株, 将其接种到PDA平板上活化, 用直径6 mm打孔器打取大丽轮枝菌菌饼, 接种到PDA培养基中央, 置于25℃、相对湿度60%的光照培养箱内培养25 d, 待菌落长满平板后, 观察并统计大丽轮枝菌菌株的培养性状类型。

1.2.3 大丽轮枝菌的分子检测

大丽轮枝菌的特异性检测: 分别提取226株供试大丽轮枝菌的基因组DNA。利用大丽轮枝菌特异性引物DB19(5'-CGGTGACATAATACTGAGAG-3')与DB22(5'-GACGATGCGGATTGAACGAA-3')进行检测, 引物由北京鼎国昌盛生物公司合成。25 μL PCR反应体系: 2×Taq PCR Green Mix 12.5 μL、Template DNA 1.0 μL、10 μmol/L Primer F 0.5 μL、10 μmol/L Primer R 0.5 μL、ddH₂O 10.5 μL。扩增程序: 94℃预变性5 min; 94℃变性45 s, 55℃退火45 s, 72℃延伸1 min, 30个循环; 72℃延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像仪拍照。

大丽轮枝菌落叶型菌系的特异性检测: 分别提取供试226株菌株基因组的DNA, 利用2组大丽轮枝菌落叶型菌系特异性引物D1(5'-CATGTTGCTCTGTTGACTGG-3')/D2(5'-GACACGGTATCTTTGCTGAA-3')和INTD2-F(5'-ACTGGGTATGATGGCTTTCAGGACT-3')/INTD2R(5'-TCTCGACTATTGAAAATCCAGCGAC-3')进行检测, 并由2组非落叶型菌系特异性引物ND1(5'-CAGGGG-

ATACTGGTACGAGACG-3')/ND-2(5'-ATGAGATTGCCGATAAGAACA-3')和INTN-DF(5'-CCAC-CCCAAGCGACAAGAC-3')/INTNDR(5'-TAAAACTCCTTGGGGCCAGC-3')进行互补验证。PCR反应体系同大丽轮枝菌的特异性检测, 引物均由北京鼎国昌盛生物公司合成。扩增程序: 94℃预变性5 min; 94℃变性(D1/D2、ND1/ND2变性1 min; INTD2F/INTD2R、INTNDF/INTNDR变性45 s), 退火(D1/D2 56℃退火1 min; ND1/ND2 58℃退火1 min; INTD2F/INTD2R 55℃退火45 s; INTNDF/INTNDR 65℃退火45 s), 72℃延伸(D1/D2、ND1/ND2延伸3 min; INTNDF/INTNDR、INTD2F/INTD2R延伸1 min), 30个循环; 72℃延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像仪拍照。

根据大丽轮枝菌落叶型菌系的分子检测结果, 对来自新疆不同市县的26个大丽轮枝菌落叶型菌系的区域分布情况进行统计, 明确强致病力大丽轮枝菌落叶型菌系在新疆的分布情况。

1.2.4 大丽轮枝菌的ISSR分析

利用14条ISSR引物(表1)对100株新疆大丽轮枝菌菌株进行PCR扩增, 反应体系同1.2.3, 引物均由北京鼎国昌盛生物公司合成。反应条件: 94℃预变性4 min; 94℃变性30 s, 55℃退火45 s, 72℃延伸1 min, 30个循环; 72℃延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像仪拍照。记录ISSR电泳结果, 将可重复的电泳条带全部列入统计范围, 忽略不能重复者, 筛选出稳定性好、多态性较强的引物。按凝胶同一位置上DNA条带的有无进行统计, 有带的记为1, 无带的记为0, 生成0/1矩阵。采用NYSTS 2.10软件以非加权组平均法进行聚类分析。

表1 本试验所用14条ISSR引物序列

Table1 Sequences of 14 primers for the experiment

引物名称Primer	引物序列Primer sequence (5'-3')	引物名称Primer	引物序列Primer sequence (5'-3')
4	ACACACACACACACAG	825	ACACACACACACACT
24	ACACACACACACACTC	834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
25	ACACACACACACACCA	836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA
47	ACACACACACACACGT	842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
60	AGAGAGAGAGAGAGAGGG	885	GAGGAGAGAGAGAGAGA
815	CTCTCTCTCTCTCTG	888	CACCACACACACACACA
818	CACACACACACACACAG	889	DBDACACACACACACAC

2 结果与分析

2.1 新疆主要植棉区棉花黄萎病的发生情况

2.1.1 不同棉区棉花黄萎病的调查结果

在调查的400块棉田中, 发病棉田216块, 所占

比例为54.0%。其中, 巴楚县-麦盖提县片区、五家渠市、莎车县发病棉田所占比例分别为37.5%、21.7%和18.8%, 发病较轻。其它片区发病田比例均超过51.9%, 其中阿克苏市、石河子市-玛纳斯县-呼

图壁县片区、乌苏市-精河县-博乐市片区发病棉田比例均超过74.4%,发病较重。阿克苏市、图木舒克市、库尔勒市-尉犁县-轮台县片区以及石河子市-玛纳斯县-呼图壁县片区、乌苏市-精河县-博乐市片区、沙湾县-奎屯市片区平均病情指数较高,均在5.3以上(表2)。

表2 2015年新疆主要植棉区发病棉田比例与平均病情指数
Table 2 Ratio of disease field and the average disease index of the main cotton planting areas in Xinjiang in 2015

调查区域 Investigation region	发病棉田比例 (%) Ratio of disease field	平均病情指数 Average of disease index
阿克苏市 Akesu City	77.3	12.9
石河子市-玛纳斯县-呼图壁县 Shihezi City-Manasi County-Hutubi County	74.5	9.6
乌苏市-精河县-博乐市 Wusu City-Jinghe County-Bole City	74.4	6.5
图木舒克市 Tumushuke City	66.7	6.1
沙雅县-新和县-库车县 Shaya County-Xinhe County-Kuche City	56.5	3.8
库尔勒市-尉犁县-轮台县 Kuerle City-Yuli County-Luntai County	54.2	5.3
沙湾县-奎屯市 Shawan County-Kuitun City	51.9	6.2
巴楚县-麦盖提县 Bachu County-Maigaiti County	37.5	1.6
五家渠市 Wujiaqu City	21.7	1.0
莎车县 Shache County	18.8	0.8

2.1.2 不同发病程度棉田的分布
2015年,0.0<病情指数≤5.0的发病棉田最多,有112块,所占比例为28.0%,5.0<病情指数≤10.0的发病棉田有39块,所占比例为9.8%,10.0<病情指数≤20.0的发病棉田有22块,所占比例为5.5%,病情指数>20.0的发病棉田有43块,所占比例为10.8%(表3)。2015年无病棉田比例比2013年增加了4.2个百分点;0.0<病情指数≤5.0、5.0<病情指数≤10.0以及10.0<病情指数≤20.0的发病棉田比例分别降低2.0个百分点、1.9个百分点和3.9个百分点;病情指数>10.0的发病棉田与2013年接近,而病情指数>20的发病棉田较2013年增加了3.8个百分点,表明重度发病棉田呈增多的趋势。

表3 2013年和2015年新疆棉区不同发病程度棉田的分布
Table 3 Distribution of cotton field with different disease degrees in Xinjiang in 2013 and 2015

调查时间 Investigation time		病情指数范围 Disease index range				
		0.0	(0.0, 5.0]	(5.0, 10.0]	(10.0, 20.0]	>20.0
2013	田块数 Numbers of cotton field	89	64	25	20	15
	所占比例 Rate of disease field (%)	41.8	30.0	11.7	9.4	7.0
2015	田块数 Numbers of cotton field	184	112	39	22	43
	所占比例 Rate of disease field (%)	46.0	28.0	9.8	5.5	10.8

2.2 大丽轮枝菌的培养性状
127株新疆大丽轮枝菌分为菌核型、菌丝型和中间型3种类型。菌核型菌系能产生大量黑色的微菌核,该类菌株有89株,所占比例为70.1%;中间型菌系气生菌丝少,环边缘均匀产生少量微菌核,该类菌株有21株,所占比例为16.5%;菌丝型菌系表面产生浓密的白色菌丝,长时间培养不产生微菌核,该类菌株有17株,所占比例为13.4%(图1)。此外,部分新疆大丽轮枝菌菌系培养形态存在不稳定现象,在继代培养的过程中菌核型与菌丝型之间会相互转变。

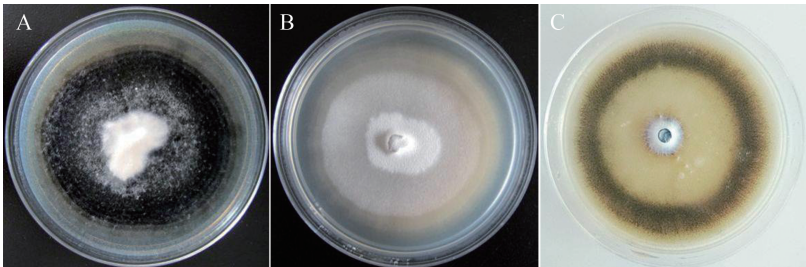


图1 新疆大丽轮枝菌菌系的培养性状
Fig. 1 Cultural characteristics of *Verticillium dahliae* on PDA medium in Xinjiang
A: 菌核型; B: 菌丝型; C: 中间型。A: Sclerotia type; B: filamentous type; C: intermediate type.

2.3 大丽轮枝菌菌系的分子鉴定

2.3.1 大丽轮枝菌菌系的特异性鉴定

供试的 226 株新疆大丽轮枝菌中, 212 株能利用

特异性引物 DB19/DB22 扩增到 500 bp 左右的特异性条带, 16 株未扩增到任何条带, 扩增率为 93.8% (图 2)。

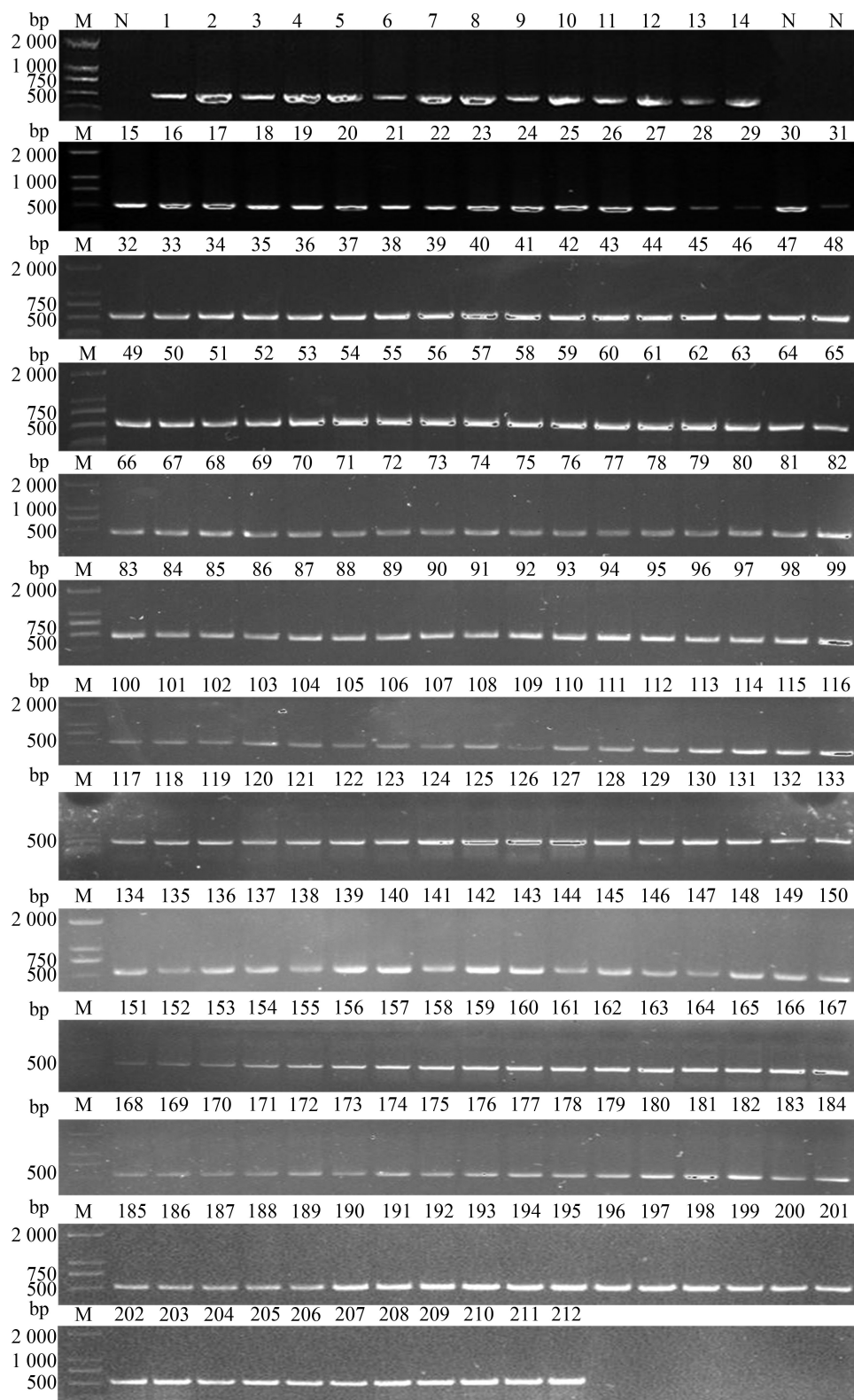


图 2 特异性引物 DB19/DB22 对新疆 212 株供试大丽轮枝菌菌株的扩增图谱

Fig. 2 Electrophoresis of PCR products for 212 tested strains of *Verticillium dahliae* using specific primers DB19/DB22 in Xinjiang

M: 标记 DL2000; N: 阴性对照; 1~212: 大丽轮枝菌菌株。M: DL2000 marker; N: negative control; 1~212: *V. dahliae* strains.

2.3.2 大丽轮枝菌落叶型菌系的鉴定结果

2组引物对212株大丽轮枝菌共扩增出200条特异条带,其中102条落叶型特异条带,98条非落叶型特异条带,所占比例分别为51.0%和49.0%;2组引物互补检测到154条共有特异性条带,其中落叶型特异条带82条,非落叶型特异条带72条,所占比

例分别为53.2%和46.8%。引物D1/D2和ND1/ND2单独扩增出落叶型特异条带98条(图3),非落叶型特异性条带数73条(图4),所占比例分别为57.3%和42.7%;引物INTD2F/INTD2R和INTNDF/INTNDR单独扩增出落叶型特异性条带87条,非落叶型特异性条带数97条,所占比例分别为47.3%和52.7%。

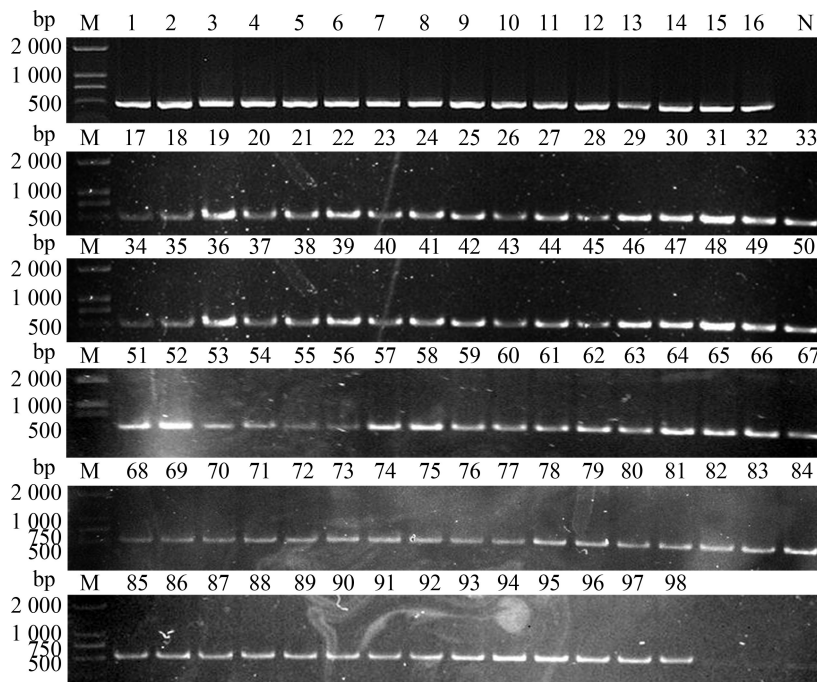


图3 特异性引物D1/D2对新疆98株大丽轮枝菌落叶型菌株的扩增图谱

Fig. 3 Electrophoresis of PCR products for 98 defoliating pathotype strains of *Verticillium dahliae* using specific primers D1/D2 in Xinjiang

M: 标记DL2000; 1~98: 大丽轮枝菌落叶型菌株; N: 阴性对照。M: DL2000 marker; 1~98: defoliating pathotype strains of *V. dahliae*; N: negative control.

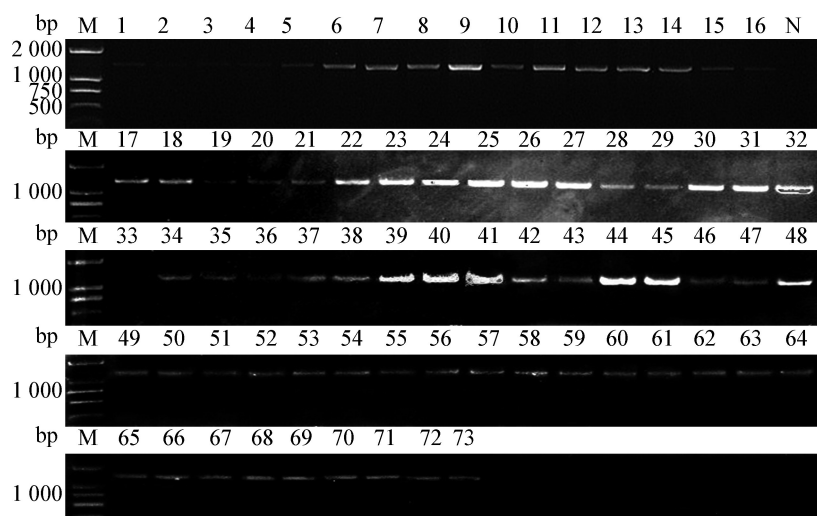


图4 特异性引物ND1/ND2对73株供试大丽轮枝菌非落叶型菌株的扩增图谱

Fig. 4 Electrophoresis of PCR products for 73 nondefoliating pathotype strains of *Verticillium dahliae* using specific primers ND1/ND2

M: 标记DL2000; 1~73: 大丽轮枝菌非落叶型菌株; N: 阴性对照。M: DL2000 marker; 1~73: nondefoliating pathotype strains of *V. dahliae*; N: negative control.

2.3.3 大丽轮枝菌落叶型菌系的分布

26株新疆植棉区全部检测到落叶型菌株(表4),表明落叶型大丽轮枝菌菌系在新疆主要植棉区

已经普遍存在。其中,新疆北部的石河子市、精河县以及新疆南部图木舒克市、库车市等传统植棉区落叶型菌系检出量较高。

表 4 2015 年新疆大丽轮枝菌落叶型菌株的分布

Table 4 The distribution of defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* strains in Xinjiang in 2015

地点 Location	落叶型菌株 Defoliating pathotype	地点 Location	落叶型菌株 Defoliating pathotype
昌吉市 Changji City	1	库尔勒市 Kuerle City	2
玛纳斯县 Manasi County	6	轮台县 Luntai County	3
石河子市 Shihezi City	8	尉犁县 Yuli County	3
101团 101 Regiment	1	库车市 Kuche City	8
143团 143 Regiment	5	阿克苏市 Akesu City	4
144团 144 Regiment	2	1团 1 Regiment	4
123团 123 Regiment	2	3团 3 Regiment	1
129团 129 Regiment	3	6团 6 Regiment	6
130团 130 Regiment	2	阿拉尔市 Alaer City	2
沙湾县 Shawan County	4	图木舒克市 Tumushuke City	13
乌苏市 Wusu City	2	阿瓦提县 Awati County	2
精河县 Jinghe County	9	莎车县 Shache County	2
博乐市 Bole City	2	巴楚县 Bachu County	3

2.4 大丽轮枝菌菌系遗传变异的ISSR分析

ISSR引物25、60、885、888、889对大部分供试菌株的扩增产物条带清晰,多态性、重复性好,对100株大丽轮枝菌菌株共扩增出37条稳定条带,多态性标记27个,所占比例为73%,平均每条引物扩增出5条多态性片段,长度主要分布在250~2 000 bp范围内。

部分ISSR引物针对落叶型和非落叶型菌系能稳定扩增到不同的条带(图5),ISSR 25对落叶型菌系能够稳定扩增出5条明显条带,而对非落叶型菌系能够稳定扩增出3条明显条带,相比落叶型菌系,非落叶型菌系缺失1 400 bp和750 bp两个片段。

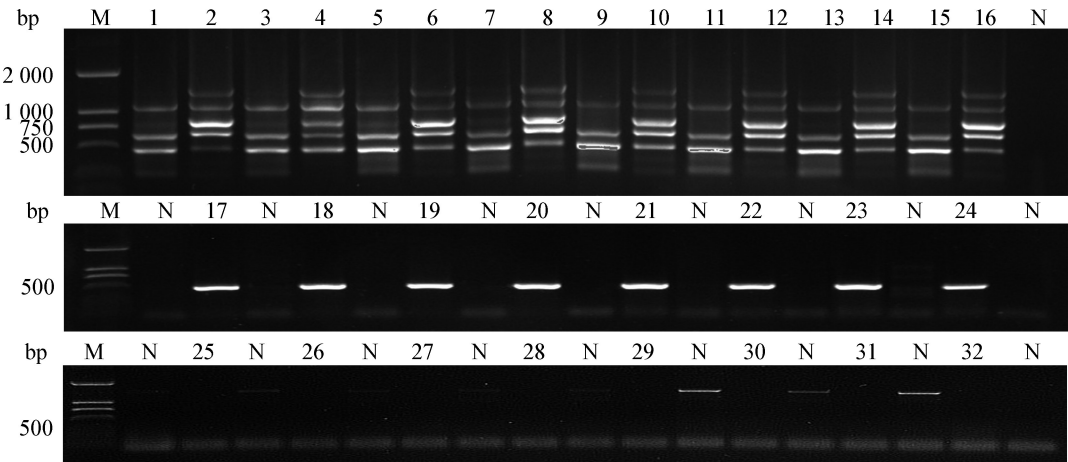


图 5 ISSR 引物 25 对大丽轮枝菌部分落叶型和非落叶型菌株的扩增图谱

Fig. 5 ISSR primers 25 PCR amplifications for part of defoliating and nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* strains
M: 标记 DL2000; 1~16: 大丽轮枝菌菌株 ISSR 图谱; 17~24、25~32: 落叶型和非落叶型菌株图谱; N: 阴性对照。M: DL2000 marker; 1~16: ISSR electrophoretogram of *V. dahliae* strains; 17~24, 25~32: amplifications electrophoretogram of defoliating and nondefoliating pathotype strains of *V. dahliae*; N: negative control.

聚类分析结果表明,100株大丽轮枝菌菌株在遗传相似系数0.66处分为2个遗传谱系,谱系1包括c1、c4、c15等46株菌株,全部为落叶型菌系;谱系2

包括c3、c5、c6等54株菌株,全部为非落叶型菌系。2个谱系中均包含采自新疆各主要植棉区的大丽轮枝菌菌株,由此表明,新疆大丽轮枝菌菌株的ISSR

指纹图谱与菌系落叶类型有明显的相关性,而与菌株的地理来源、培养性状无明显相关性(图6)。

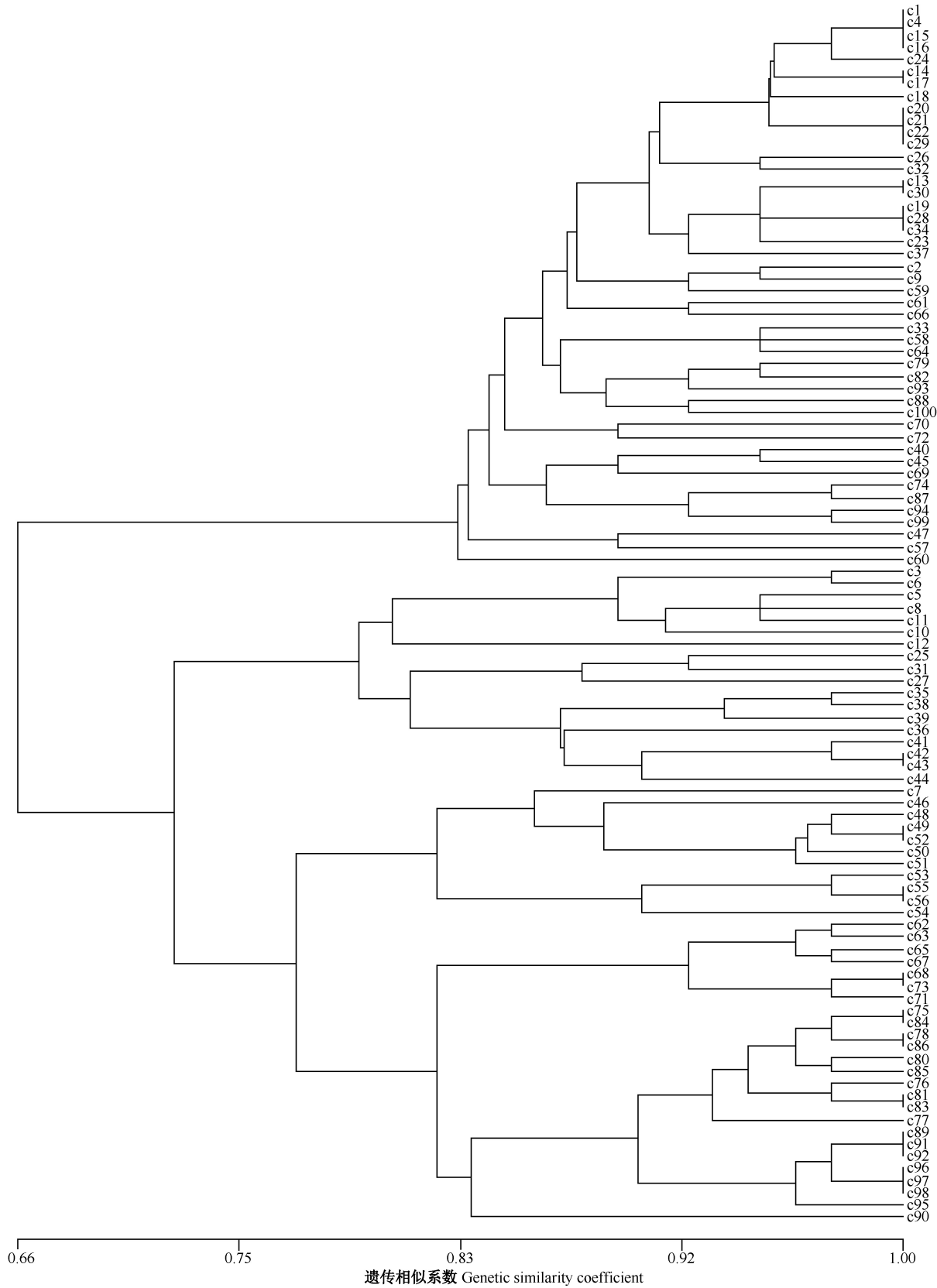


图6 100株新疆大丽轮枝菌菌株的聚类分析

Fig. 6 Cluster analysis of genetic distances among 100 *Verticillium dahliae* strains in Xinjiang
c1~c100: 大丽轮枝菌菌株。c1~c100: *V. dahliae* strains.

3 讨论

本研究结果表明,新疆部分传统棉区棉花黄萎病危害较重,且重度发病棉田呈增加的趋势,需要引起棉花从业者的高度重视。李国英等(2000)研究结果表明,新疆大丽轮枝菌菌系以菌核型为主,中间型和菌丝型菌系为辅,与本研究结果一致,而袁洪波等(2013)研究发现石河子棉区黄萎病病原菌菌系以菌丝型为主,所占比例为60%;惠慧等(2017)研究发现新疆北部棉区棉花黄萎病病原菌菌系均为菌核型,后两者的研究与本研究结果差异较大,表明新疆不同棉区的大丽轮枝菌菌系存在明显的形态差异,多样性丰富。

大丽轮枝菌落叶型菌系致病力强,危害极大。韩宏伟等(2011;2012)研究结果表明,新疆南、北部棉区落叶型菌系分别占39.0%和33.3%;袁洪波等(2013)研究发现石河子菌系中落叶型菌系占33.3%;而本研究发现新疆大丽轮枝菌落叶型菌系占53.2%,落叶型菌系比例呈现大幅增加的趋势,且在所有样本采集地区均检测到,表明强致病力的落叶型菌系在新疆已普遍分布。

大丽轮枝菌的ISSR指纹图谱与菌株的致病力、地理来源或者落叶类型存在相关性。周兆华等(1999)、朱荷琴等(2012)认为大丽轮枝菌的ISSR指纹图谱与菌系的致病力分化存在明显的相关性,而与菌株的地理来源无明显相关性。袁洪波等(2013)研究发现,石河子市大丽轮枝菌的遗传分化与菌株致病力有相关性,但是部分遗传关系相近的菌系其致病力又存在明显差异。另有研究认为,大丽轮枝菌的遗传分化与菌系地理来源存在相关性,而与致病力分化关系不大(邹亚飞等,2003;毛岚等,2009;刘燕霞等,2010)。本研究结果发现,新疆大丽轮枝菌菌系存在明显的遗传差异,落叶型与非落叶型菌系完全归属到2个分支,但与菌株的地理来源无明显相关性。该结论与王莉梅和石磊岩(1999)、宋培玲等(2011)研究结果基本一致,区别在于王莉梅和石磊岩(1999)以大丽轮枝菌的盆栽接种测定结果作为划分落叶型与非落叶型的依据,而本研究则采用了特异引物扩增结果作为菌株类型划分标准。

新疆棉花种植面积200余万 hm^2 ,本研究仅对400块棉田的棉花黄萎病发生情况进行了抽样调查,代表性不足,还需加大棉田调查面积,以提高数据的准确性和代表性。本研究中新疆大丽轮枝菌菌系遗传分化与其地理来源无明显相关性,可能与菌

系全部来自新疆有关,下一步拟收集其它省区的大丽轮枝菌菌系并进行分析,以明确大丽轮枝菌遗传变异与地理分布的关系。本研究仅对大丽轮枝菌的遗传变异进行了ISSR分析,后续还需结合随机扩增多态性DNA(random amplification polymorphic DNA, RAPD)、简单重复序列分析(simple sequence repeats, SSR)以及基因测序技术对新疆大丽轮枝菌进行遗传背景分析,以充分探明新疆棉花黄萎病的发生现状。

参 考 文 献 (References)

- Gu BK, Xia ZJ, Lu X, Li JY, Wu AM. 1993. Vegetative compatibility among strains of *Verticillium dahliae* Kleb. in Jiangsu Province. *Acta Gossypii Sinica*, 5(2): 79–86 (in Chinese) [顾本康, 夏正俊, 陆迅, 李经仪, 吴嵩民. 1993. 江苏大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)营养亲和性研究. 棉花学报, 5(2): 79–86]
- Han HW, Liu PY, Gao F, Ren YZ, Li C, Li GY. 2011. The pathogenicity differentiation and variability of *Verticillium dahliae* from cotton in northern Xinjiang. *Journal of Plant Protection*, 38(2): 121–126 (in Chinese) [韩宏伟, 刘培源, 高峰, 任毓忠, 李春, 李国英. 2011. 新疆北部棉区黄萎病菌种群致病性分化及变异. 植物保护学报, 38(2): 121–126]
- Han HW, Ren YZ, Liu PY, Zhang L, Li C, Li GY. 2012. Pathogenicity differentiation and variability of *Verticillium dahliae* Kleb. from cotton in southern Xinjiang. *Cotton Science*, 24(2): 147–152 (in Chinese) [韩宏伟, 任毓忠, 刘培源, 张莉, 李春, 李国英. 2012. 新疆南部棉区黄萎病菌种群致病性分化及变异. 棉花学报, 24(2): 147–152]
- Li GY, Huo XD, Tian XL, Zhang S, Zhang Y. 2000. A study on culturing characters and pathogenic differentiation of *Verticillium dahliae* from cotton in Xinjiang. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 4(1): 9–15 (in Chinese) [李国英, 霍向东, 田新莉, 张升, 张云. 2000. 新疆棉花黄萎病菌的培养特性及致病性分化的研究. 石河子大学学报(自然科学版), 4(1): 9–15]
- Liu HY, Wang W, Zhang RF, Wu G, Yao J. 2015. Occurrence overviews of cotton *Verticillium* wilt in Xinjiang. *Plant Protection*, 41(3): 138–142 (in Chinese) [刘海洋, 王伟, 张仁福, 武刚, 姚举. 2015. 新疆主要棉区棉花黄萎病发生概况. 植物保护, 41(3): 138–142]
- Liu YX, Hou LJ, Li W, Yang JR, Xiao R. 2010. Optimization of ISSR reaction and analysis of genetic diversity of *Verticillium dahliae* in cotton. *Journal of Plant Protection*, 37(5): 425–430 (in Chinese) [刘燕霞, 侯丽娟, 李卫, 杨家荣, 肖蕊. 2010. 棉花黄萎病菌ISSR反应体系优化及其遗传多样性分析. 植物保护学报, 37(5): 425–430]
- Ma ZY, Li XH, Sun JZ, Liu JL. 1996. Review on the differentiation of *V. albo-atrum* and *V. dahliae* and the resistance inheritance in cotton. *Acta Gossypii Sinica*, 8(4): 172–176 (in Chinese) [马峙英, 李兴红, 孙济中, 刘金兰. 1996. 棉花黄萎病菌致病力分化与寄主抗病性遗传研究进展. 棉花学报, 8(4): 172–176]
- Mao L, Song PL, Yang JR. 2009. Pathogenicity differentiation and ge-

- netic diversity of *Verticillium dahliae* of cotton in Shaanxi. Journal of Plant Protection, 36(1): 27–31 (in Chinese) [毛岚, 宋培玲, 杨家荣. 2009. 陕西棉花黄萎病菌致病力分化及其遗传多样性. 植物保护学报, 36(1): 27–31]
- Song PL, Li ZQ, Yang JR. 2011. Genetic diversity of *Verticillium dahliae* of cotton with ISSR markers. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 39(1): 113–118 (in Chinese) [宋培玲, 李子钦, 杨家荣. 2011. 棉花黄萎病菌遗传多样性的ISSR分析. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 39(1): 113–118]
- Wang LM, Shi LY. 1999. Identification of defoliating strains of *Verticillium dahliae* from cotton in north China. Acta Phytopathologica Sinica, 29(2): 181–189 (in Chinese) [王莉梅, 石磊岩. 1999. 北方棉区棉花黄萎病菌落叶型菌系鉴定. 植物病理学报, 29(2): 181–189]
- Wu XZ, Li FL, Zheng CY, Wang YY, Zhu YZ. 1995. Pathogenic differentiation of the *Verticillium dahliae* in Shandong Province. Plant Protection, 21(6): 2–5 (in Chinese) [吴献忠, 李凤玲, 郑长英, 王贻勇, 朱有钊. 1995. 山东棉花黄萎菌致病力分化的研究. 植物保护, 21(6): 2–5]
- Xi H, Zhang XK, Zhao JJ, Ai NJ. 2017. Study on biological characteristics of *Verticillium dahliae* in early-maturing cotton area of northern Xinjiang. Jiangsu Agricultural Sciences, 45(4): 66–69 (in Chinese) [惠慧, 张学坤, 赵建军, 艾尼江. 2017. 北疆早熟棉区棉花黄萎病菌的生物学特性. 江苏农业科学, 45(4): 66–69]
- Xu AL. 2006. Study on the pathogenicity differentiation of *Verticillium dahliae* Kleb. in Shanxi Province. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 34(1): 58–60 (in Chinese) [许爱玲. 2006. 山西省棉花黄萎病菌致病力分化研究. 山西农业科学, 34(1): 58–60]
- Yuan HB, Ai NJ, Zhao JJ, Chen TZ, Yang YW, Liu AM, Zhang BL. 2013. Pathogenicity differentiation and ISSR genetic variation analysis of *Verticillium dahliae* isolates from cotton in Shihezi, Xinjiang. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 28(5): 84–89 (in Chinese) [袁洪波, 艾尼江, 赵建军, 陈天子, 杨郁文, 刘蒿民, 张保龙. 2013. 棉花黄萎病菌致病力分化与ISSR遗传变异分析. 华北农学报, 28(5): 84–89]
- Zhang L, Duan WJ, Li GY, Yang ZW. 2006. Population monitoring study of *Verticillium dahliae* in cotton in Xinjiang. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 34(11): 189–193 (in Chinese) [张莉, 段维军, 李国英, 杨之为. 2006. 新疆棉花黄萎病菌病原种群监测研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 34(11): 189–193]
- Zhou ZH, Guo WZ, Pan JJ, Zhang TZ. 1999. Analyses on the genetic variation of cotton *Verticillium dahliae* isolate populations in China. Scientia Agricultura Sinica, 32(2): 60–65 (in Chinese) [周兆华, 郭旺珍, 潘家驹, 张天真. 1999. 我国棉花黄萎病菌群体的遗传变异分析. 中国农业科学, 32(2): 60–65]
- Zhu HQ, Feng ZL, Yin ZX, Li ZF, Zhao LH, Shi YQ, Yang JR. 2012. Pathogenicity differentiation and ISSR fingerprint analysis of cotton *Verticillium dahliae* in China. Acta Phytopathologica Sinica, 42(3): 225–235 (in Chinese) [朱荷琴, 冯自力, 尹志新, 李志芳, 赵丽红, 师勇强, 杨家荣. 2012. 我国棉花黄萎病菌致病力分化及ISSR指纹分析. 植物病理学报, 42(3): 225–235]
- Zhu HQ, Song XX, Guo JC, Yao XH. 1997. The relationship between hapha protein of *Verticillium dahliae* Kleb. and its pathotype. Acta Gossypii Sinica, 9(6): 329–333 (in Chinese) [朱荷琴, 宋晓轩, 郭金城, 姚献华. 1997. 棉花黄萎病菌菌体蛋白与其致病类型的关系. 棉花学报, 9(6): 329–333]
- Zou YF, Jian GL, Ma C, Shi LY, Wang LP, Liu HJ. 2003. AFLP analysis of pathotype of *Verticillium dahliae* of cotton. Acta Phytopathologica Sinica, 33(2): 135–141 (in Chinese) [邹亚飞, 简桂良, 马存, 石磊岩, 王立平, 刘慧君. 2003. 棉花黄萎病菌致病型的AFLP分析. 植物病理学报, 33(2): 135–141]

(责任编辑: 张俊芳)