

马铃薯黄萎病病原菌营养亲和群、生理小种、交配型鉴定以及致病力差异分析

赵晓军 张 键 张 贵 张园园 周洪友 赵 君*

(内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 为明确引起马铃薯黄萎病的大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 的遗传变异和致病力的差异, 对从内蒙古及其周边地区马铃薯发病株上分离得到的29株大丽轮枝菌的营养亲和群、生理小种和交配型进行了测定, 利用伤根接种法进行致病力分化研究。结果表明, 供试的29株马铃薯大丽轮枝菌菌株被划分为VCG2B、VCG4B和VCG4A三个营养亲和群, 其菌株数分别为11、2和16株; 供试的29株菌株均鉴定为单一的2号生理小种和MAT1-2-1交配型。供试的29株大丽轮枝菌菌株间致病力存在一定的差异, 其中NCP-1菌株的致病力最强, 病情指数为83.33; 而NWS-5菌株的致病力最弱, 病情指数仅为10.85; 不同营养亲和群菌株的平均致病力也存在显著差异, VCG4B型菌株的平均致病力最高, 平均病情指数为67.18; 其次为VCG2B型菌株, 平均病情指数为42.50, 而VCG4A型菌株致病力最弱, 平均病情指数仅为20.54。

关键词: 马铃薯黄萎病; 营养亲和群; 生理小种; 交配型; 致病力分化

Identification of the vegetative compatibility groups (VCGs), races, mating types, and pathogenicity differentiation of pathogenic bacteria of potato *Verticillium* wilt

Zhao Xiaojun Zhang Jian Zhang Gui Zhang Yuanyuan Zhou Hongyou Zhao Jun*

(Department of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018,
Inner Mongolia Autonomous Region, China)

Abstract: In order to clarify the genetic variation and pathogenicity differentiation in the pathogenic bacteria of potato *Verticillium* wilt, 29 strains were isolated from diseased samples which were collected from different potato fields in Inner Mongolia and their surrounding areas, and then the VCG types, physiological races, mating types and pathogenicity differentiation were measured and the pathogenicity of all tested strains was studied by using root-drenching method. The results showed that 29 strains could be divided into three VCGs, namely VCG2B (11 strains), VCG4B (two strains), and VCG4A (16 strains), which were identified as Race 2 and MAT1-2-1. There were significant differences among the tested strains, and the pathogenicity of NCP-1 strain was the highest, with a disease index of 83.33; the pathogenicity of NWS-5 strain was the lowest, with a disease index of 10.85. There was significant difference between the pathogenicity of the three VCGs, and the pathogenicity of VCG4B was the highest, with an average disease index of 67.18, followed by VCG2B group, with an average disease index of 42.50, and the lowest pathogenicity was observed in VCG4A, with an average disease index of 20.54.

Key words: potato *Verticillium* wilt; vegetative compatibility groups (VCGs); physiological race; mating type; pathogenicity differentiation

马铃薯黄萎病又称早死病或早熟病,是由大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 引起的典型土传兼种传维管束病害,在全世界温带地区广泛分布。1944年马铃薯黄萎病首次在我国四川省发生(彭学文, 2003);随后该病害在河北、贵州和新疆等省区相继发生。近年来,随着马铃薯种植面积的扩大,马铃薯连作使得马铃薯黄萎病的发生日益加重,产量损失轻者为20%~30%,重者可达50%以上(张成礼, 2004)。

真菌营养亲和群(vegetative compatibility groups, VCGs)是指真菌营养菌丝体通过菌丝连接和融合相互生长在一起形成稳定的异核体的能力,能够反映融合个体间的亲缘关系(余仲东等, 2002),特别适合于缺乏有性世代的病原菌生理型或是生理小种与遗传变异之间关系的研究(Joaquim & Rowe, 1990)。目前,国际上利用硝酸盐营养缺陷型突变体已鉴定出大丽轮枝菌的4个营养亲和群(VCG1~VCG4型)及一些亚群VCG4A和VCG4B型,且它们之间的致病力存在一定差异(Joaquim & Rowe, 1990; Strausbaugh, 1993)。研究结果表明,来自不同寄主的大丽轮枝菌菌系可被划分为不同的营养亲和群,如从希腊西瓜上分离到的大丽轮枝菌菌株属于VCG2型(Elena, 2000),从北美洲马铃薯上分离的大丽轮枝菌菌株大多属于VCG4型(Omer et al., 2000),从美国园艺植物上分离到的大丽轮枝菌菌株主要是VCG1型(Chen, 1994),从美国加利福尼亚州生菜上分离到的22株大丽轮枝菌菌株中,VCG2A型21株,仅1株为VCG2B型(Iglesias-Garcia et al., 2013)。国内有关大丽轮枝菌VCG型的研究也有相关报道,如王雪薇和喻宁莉(2000)从棉花上分离得到的19株大丽轮枝菌中,17株为VCG2型,仅2株为VCG1型;景岚等(2014)从向日葵上分离得到的120株大丽轮枝菌,主要为3个营养亲和群,其中VCG1、VCG2和VCG3型分别为89、1和7株。大丽轮枝菌的营养亲和群与病原菌的致病力及寄主范围有一定关系,如Daayf et al. (1995)研究结果表明,鉴定为VCG1型的4株菌株全部为落叶型菌株,而鉴定为VCG2和VCG4型的9株菌株全部为非落叶型菌株,营养亲和群可能是引起棉花落叶型和非落叶型菌株致病力差异的主要原因。

生理小种是病原菌种或变种下的一个分类单位。生理小种的变化能够反映病原菌遗传变异程度。Vallad et al. (2006)研究结果表明,来源于生菜和番茄的大丽轮枝菌都存在2个生理小种的分化。

Usami et al. (2012)和Gurung et al. (2014)研发了1号和2号生理小种的特异性引物,并且将其用于大丽轮枝菌生理小种的鉴定。利用上述鉴定方法,Usami et al. (2007)对自番茄上分离得到的25株大丽轮枝菌进行了生理小种鉴定,其中12株为1号生理小种,其余均为2号生理小种;Short et al. (2014)从番茄黄萎病株上分离得到的大丽轮枝菌菌株主要为2号生理小种;Maruthachalam et al. (2010)从棉花、菠菜、辣椒分离得到的大丽轮枝菌菌株混合存在1号和2号生理小种。目前国内缺少对马铃薯大丽轮枝菌生理小种的相关报道。

除生理小种外,一些真菌交配型的变化也间接地反应了菌株的遗传变异。在子囊菌和担子菌亚门中,调控交配型的基因决定性亲和表现型,其编码的蛋白作为转录因子能够调控与有性交配相关基因的表达(Metzenberg & Glass, 1990)。大丽轮枝菌隶属于子囊菌亚门,是一种具有MAT1-1-1和MAT1-2-1两种交配型的异宗配合真菌(Usami et al., 2012)。如果2株性兼容的菌株进行有性生殖,它们必需分别携带有MAT1-1和MAT1-2交配基因(Usami et al., 2007; Maruthachalam et al., 2010; Short et al., 2014)。因此,通过交配基因的序列设计引物可鉴定出大丽轮枝菌的交配型。Atallah et al. (2010)研究结果表明,从美国加州生菜上分离得到的大丽轮枝菌种群中,MAT1-1-1交配型菌株所占的比例仅为30%,其余70%菌株均为MAT1-2-1交配型;Usami et al. (2009)研究结果表明,从番茄、辣椒和茄子上分离得到的61株大丽轮枝菌中,5株是MAT1-1-1交配型,其余56株均为MAT1-2-1交配型;Gurung et al. (2014)研究结果表明,从生菜中分离得到的大丽轮枝菌中,99%菌株均为MAT1-2-1交配型。

内蒙古自治区由于其高海拔和夏季冷凉的气候特点成为我国重要的马铃薯种薯、商品薯和加工专用薯的生产基地,而马铃薯连作使得马铃薯黄萎病的发生日益加重。因此,本研究利用国际亲和群鉴定的标准菌株和生理小种、交配型通用引物测定该区以及周边地区马铃薯大丽轮枝菌的营养亲和群、生理小种以及交配型;对马铃薯大丽轮枝菌不同菌株以及不同营养亲和群的致病力分化进行研究,期为该区马铃薯黄萎病的防治奠定坚实的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物和菌株:马铃薯黄萎病病原菌由内蒙

古农业大学农学院周洪友教授提供。供试的29株马铃薯大丽轮枝菌菌株分别于2013年和2014年8月采自黑龙江、河北和内蒙古3个省(区)的马铃薯地块。从内蒙古自治区共采集到23株马铃薯大丽轮枝菌菌株,其中包头市1株、乌兰察布市16株、呼和浩特市2株、锡林郭勒盟4株;从黑龙江省齐齐哈尔市采集到2株马铃薯大丽轮枝菌菌株;从河北省张家口市采集到4株马铃薯大丽轮枝菌菌株。VCG型测试标准突变体1A、2A、2B、4A、4B均由华盛顿州立大学陈卫东教授提供;进行生理小种鉴定所用的1号生理小种的对照菌株番茄大丽轮枝菌JR2和2号生理小种的对照菌株DVDs26由荷兰瓦赫宁根大学Bart Thomma教授惠赠。供试马铃薯品种为费乌瑞它,内蒙古正丰公司提供。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:去皮马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂粉15 g、蒸馏水1 000 mL;氯酸盐(water agar chlorate, WAC)培养基:氯酸钾50 g、葡萄糖0.2 g、琼脂粉20 g、蒸馏水1 000 mL;查比克(Czapek-Dox agar, CDA)培养基:硝酸钠2 g、磷酸氢二钾1 g、硫酸镁0.5 g、氯化钾0.5 g、硫酸亚铁0.01 g、葡萄糖30 g、琼脂粉15 g、蒸馏水1 000 mL;含亚硝酸盐(chlorate nitrite, CO)培养基:CDA培养基中不加入硝酸钠,加入亚硝酸钠0.5 g;含次黄嘌呤(chlorate hypoxanthine, CH)培养基:CDA培养基中不加入硝酸钠,加入次黄嘌呤0.2 g;麦麸培养基:麦麸经蒸馏水浸润后分装到300 mL广口瓶中,高压灭菌40 min。

试剂及仪器:10×Taq Buffer、dNTPs、Taq酶、Maker DL2000,天根生化科技(北京)有限公司;其它试剂均为国产分析纯。TC-25H PCR扩增仪,杭州博日科技有限公司;DYY-12凝胶电泳仪,北京六一仪器厂;UVP Biospectrum 310 Manual Platform凝胶成像系统,美国UVP公司。

1.2 方法

1.2.1 马铃薯大丽轮枝菌突变体筛选和鉴定

将从内蒙古自治区、黑龙江省和河北省采集的29株马铃薯大丽轮枝菌菌株接种到诱变培养基WAC上,置于24℃恒温培养箱中暗培养3 d,观察菌落生长状况。挑取扇形透明菌落区域的菌块接种到CDA培养基上培养保存,即得到硝酸盐利用缺陷型突变体(nitrate non-utilizing mutant, Nit)。分别将Nit突变体转接到CDA、CO及CH培养基上,24℃黑暗培养3 d,根据突变体在3种培养基上的不同生长情况确定大丽轮枝菌Nit突变体的类型,鉴定标准如

下:在CH和CO培养基上形成气生菌丝而在CDA培养基上未形成气生菌丝的突变体类型为Nit1;仅在CH培养基上形成气生菌丝,而在CO和CDA培养基上未形成气生菌丝的突变体类型为NitM;仅在CO培养基上形成气生菌丝,而在CH和CDA培养基上未形成气生菌丝的突变体类型为Nit3。

1.2.2 马铃薯大丽轮枝菌VCG型的测定

将待测菌株的Nit1或NitM型突变体与标准菌株的NitM或Nit1型突变体在CDA培养基上于24℃下进行互补配对培养,即Nit1×NitM或NitM×Nit1。暗培养7 d后观察待测菌株突变体和互补标准菌株突变体融合生长的情况。若待测菌株突变体与互补标准菌株突变体在菌丝接触处长出茂盛气生菌丝和微菌核,说明待测菌株与标准菌株属于同一个亲和型;反之,属于不同类型的亲和型。

1.2.3 马铃薯大丽轮枝菌生理小种和交配型的鉴定

将马铃薯大丽轮枝菌接种到PDA培养基上暗培养7 d后刮取菌丝,采用溴化十六烷基三甲铵(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)法提取供试菌株的DNA(Stewart & Via, 1993)。以此为模板,利用大丽轮枝菌1号生理小种引物、2号生理小种引物、MAT1-1-1交配型引物和MAT1-2-1交配型引物对供试菌株进行PCR扩增。1号生理小种引物为vdr1(5'-TGAAGTAGCCGATAGCTTTCTTGCCCG-3')和vdr2(5'-TGTCTGGATTAATCGCCGCAAG-GACG-3');2号生理小种引物为vd2F(5'-ACTTA-ACGAAAGCATGCGC-3')和vd2R(5'-CTTGACT-TGCCGGCTCC-3');MAT1-1-1交配型引物为Alf3(5'-CGATCGCGATATCGGCAAGG-3')和MAT11r(5'-CAGTCAGATCCAACCTGCTGGCC-3');MAT1-2-1交配型引物为HMG21f(5'-CGGCCGC-CCAATTCGTACATCC-3')和MAT21r(5'-CTAGC-CTTCCATGCCATTAGTAGCC-3')(Usami et al., 2007; Short et al., 2014)。25 μL PCR反应体系:H₂O 19 μL、10×Taq Buffer 2.5 μL、2.5 mmol/L dNTPs 1.25 μL、10 μmol/L引物0.5 μL、2.5 U/μL Taq酶0.25 μL、模板DNA 1 μL。PCR反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性45 s,退火45 s(1号生理小种引物和2号生理小种引物的退火温度分别为59℃和58℃,MAT1-1-1和MAT1-2-1交配型引物的退火温度均为57℃),72℃延伸45 s,35个循环;72℃延伸10 min。PCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。1号生理小种引物、2号生理小种引物、MAT1-1-1和MAT1-2-1交配型引物扩增目的片段大小分别为

600、256、600 和 300 bp。所用引物委托北京厚生博泰生物技术有限公司合成。

1.2.4 马铃薯大丽轮枝菌致病力的测定

将供试的 29 株马铃薯大丽轮枝菌菌株分别置于 PDA 培养基上培养 2 周,用无菌水冲洗菌落表面,将冲洗液加入到灭菌的麦麸培养基中,24℃ 下暗培养 10 d。用无菌水冲洗麦麸培养基,通过纱布过滤以获得供试菌株的分生孢子液。利用血球计数板计数,将分生孢子液浓度调整至 1×10^7 个/L,备用。

将费乌瑞它马铃薯块茎切成 $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$ 带芽眼的薯块,用 75% 酒精浸泡 2 min,用无菌水冲洗 3~5 次,将薯块播种到装有无菌土和营养土(体积比为 1:1)、直径为 15 cm、高度为 13 cm 的营养钵中。待马铃薯植株长到 10~15 cm 高度后,将其连根拔出,用无菌水冲洗后浸入到浓度为 1×10^7 个/L 的分生孢子液中,浸泡 30 min;取出后将植株转到装有无菌土和营养土(体积比为 1:1)、直径为 15 cm、高度为 13 cm 的营养钵中,以接种清水为对照。每株菌株设置 4 个重复,对照设置 2 个重复。接种 30 d 后调查马铃薯植株的发病情况,并按照分级标准(Alkher et al., 2009)确定发病等级。分级标准:0 级:健株,植株叶片无褪绿及枯死;1 级:植株叶片表现褪绿, <1% 叶片枯死症状;2 级:40% 植株叶片表现褪绿, 1%~20% 叶片枯死症状;3 级:植株叶片表现褪绿, 21%~35% 叶片枯死症状;4 级:植株叶片表现褪绿, 36%~70% 叶片枯死症状;5 级:植株叶片表现褪绿, 71%~100% 叶片枯死症状。按照公式计算病情指数,病情指数 = $100 \times \sum (\text{各级病叶数} \times \text{各级代表值}) / (\text{调查总叶数} \times \text{最高级代表值})$,并对不同亲和型菌株的病情指数进行统计。

1.3 数据分析

采用 SAS 9.0 软件进行数据统计,应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 马铃薯大丽轮枝菌突变体的筛选

29 株供试马铃薯大丽轮枝菌菌株共筛到 315 个突变体,且每个菌株突变体的数目介于 7~15 个之间。Nit1 型突变体数目最多,为 298 个,占突变体总数的 94.6%;NitM 型突变体数为 17 个,所占比例为

5.4%;未筛选到 Nit3 型突变体(表 1)。

2.2 马铃薯大丽轮枝菌 VCG 型的鉴定

根据大丽轮枝菌突变体和国际标准菌株突变体互补配对的结果将供试的 29 株马铃薯大丽轮枝菌划分为 3 个亲和群,即 VCG2B、VCG4A 和 VCG4B,其中鉴定为 VCG4A 型的菌株数量最多,为 16 株,所占比例为 55.2%,主要分布于内蒙古自治区、黑龙江省以及河北省;鉴定为 VCG2B 型的菌株有 11 株,所占供试菌株的比例为 37.9%,主要分布在内蒙古自治区的乌兰察布市、呼和浩特市和锡林郭勒盟以及与内蒙古自治区紧邻的河北省张家口市张北县;鉴定为 VCG4B 型的菌株仅有 2 株,所占比例为 6.9%,主要分布在内蒙古自治区的包头市达茂旗和乌兰察布市察哈尔右翼前旗。采自内蒙古自治区的 23 株菌株中,VCG2B、VCG4A 和 VCG4B 型菌株分别为 9、11 和 3 份;采自黑龙江省的 2 株菌株均为 VCG4A 型,采自河北省张家口尚义县的 2 株菌株和张北县的 2 株菌株分别为 VCG4A 和 VCG2B 型。表明 VCG4A 型是内蒙古自治区及其周边地区马铃薯大丽轮枝菌的优势营养亲和群(表 1)。

2.3 马铃薯大丽轮枝菌生理小种和交配型的鉴定

利用大丽轮枝菌生理小种引物对所有供试菌株进行生理小种鉴定,29 株菌株均能扩增出与 2 号标准生理小种 DVDs26 相同的带型(256 bp),因此均被鉴定为 2 号生理小种(图 1)。

利用引物 HMG21f/MAT21r 对所有供试菌株进行 PCR 扩增,均能扩增到 300 bp 大小的片段,而利用引物 Alf3/MAT11r 对供试菌株进行 PCR 扩增后在 600 bp 未扩增到任何条带,因此,确定供试 29 株马铃薯大丽轮枝菌菌株均为单一交配型,即 MAT1-2-1 型(图 2)。

2.4 马铃薯大丽轮枝菌致病力的测定

采自内蒙古自治区察哈尔右翼前旗平地泉镇的菌株 NCP-1,致病力最强,其病情指数为 83.33;而采自内蒙古自治区商都县十八顷镇的菌株 NWS-5,致病力最弱,其病情指数仅为 10.85;其余供试菌株的致病力介于二者之间(表 2)。VCG4B 型菌株的致病力最高,平均病情指数为 67.18,其次为 VCG2B 型菌株,平均病情指数为 42.50,VCG4A 型菌株的致病力最低,平均病情指数仅为 20.54(图 3)。

表 1 29株马铃薯大丽轮枝菌菌株采集地点、突变体类型和营养亲和群信息表

Table 1 The information of collection sites, mutant types and VCGs for 29 strains of potato *Verticillium dahliae*

采集地点 Collection site			菌株编号 Isolate code	突变体数量 Mutant number			营养亲和群 Vegetative compatibility group
				Nit1	NitM	总数 Sum	
黑龙江省 Heilongjiang Province 内蒙古自治区 Inner Mongolia Autonomous Region	齐齐哈尔市 Qiqihar City	依安县 Yian County	HQY-1	9	0	9	VCG4A
		克山县 Keshan County	HQK-1	12	1	13	VCG4A
	包头市 Baotou City	达茂旗 Damao Banner	NBD-1	6	2	8	VCG4B
		卓资山县 Zhuozishan County	NWZ-1	8	0	8	VCG4A
	乌兰察布市 Ulanchap City	兴和县 Xinghe County	NWX-1	12	0	12	VCG4A
		化德县 Huade County	NWH-1	11	0	11	VCG2B
		四子王旗 Siziwang Banner	NWH-2	11	2	13	VCG2B
			NWS-1	13	0	13	VCG4A
			NWS-2	14	0	14	VCG2B
			NWS-3	7	0	7	VCG4A
			NWS-4	10	1	11	VCG2B
			NWS-5	12	0	12	VCG4A
		察哈尔右翼前旗 Qahar Right Front Banner	NCP-1	12	3	15	VCG4B
		察哈尔右翼中旗 Chahar Right Middle Banner	NCB-1	10	1	11	VCG2B
		察哈尔右翼中旗 Qahar Right Middle Banner	NCT-1	12	0	12	VCG2B
		商都县 Shangdu County	NWD-1	11	0	11	VCG4A
		凉城县 Liangcheng County	NWD-2	7	1	8	VCG4A
		和林县 Helin County	NWL-1	11	0	11	VCG4A
	呼和浩特市 Hohhot City	武川县 Wuchuan County	NHH-1	10	3	13	VCG4A
		锡林郭勒盟 Xilingol League	NHW-2	9	0	9	VCG2B
		正蓝旗 Zhenglan Banner	NXZ-1	12	2	14	VCG4A
			NXZ-2	9	0	9	VCG2B
			NXZ-3	11	0	11	VCG2B
		多伦县 Duolun County	NXD-1	6	1	7	VCG4A
	河北省 Hebei Province	尚义县 Shangyi County	HS-1	10	0	10	VCG4A
		张北县 Zhangbei County	HS-2	9	0	9	VCG4A
			HZ-1	13	0	13	VCG2B
			HZ-2	11	0	11	VCG2B

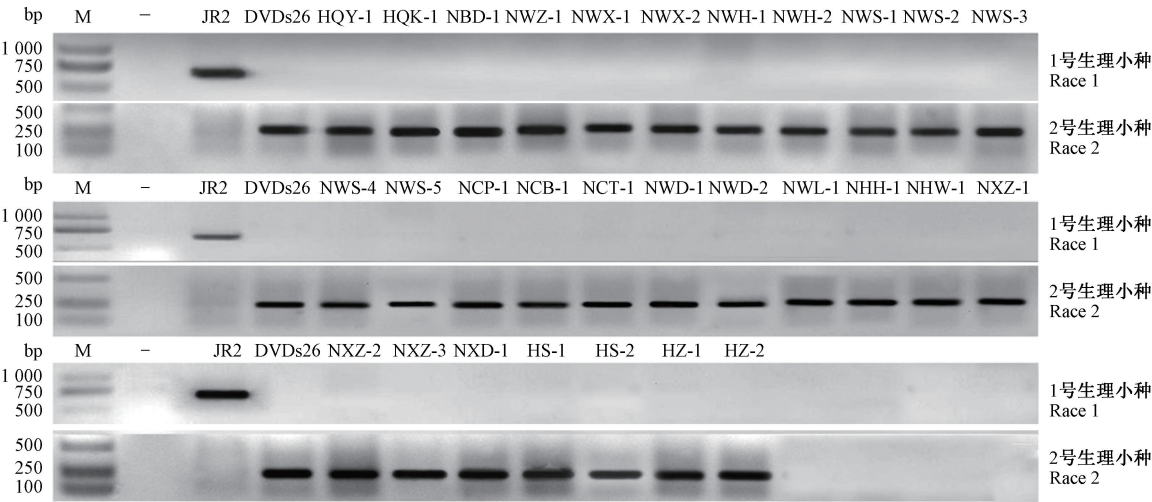


图 1 29株马铃薯大丽轮枝菌菌株生理小种的PCR鉴定结果

Fig. 1 The identification result of race types for 29 strains of potato *Verticillium dahliae* by PCR

M: DL2000; -: 负对照; JR2: 1号生理小种菌株; DVDs26: 2号生理小种菌株; 其它均为大丽轮枝菌菌株。M: DL2000; -: negative control; +: positive control; JR2: the isolate of race 1; DVDs26: isolate of race 2; the others are strains of *Verticillium dahliae*.

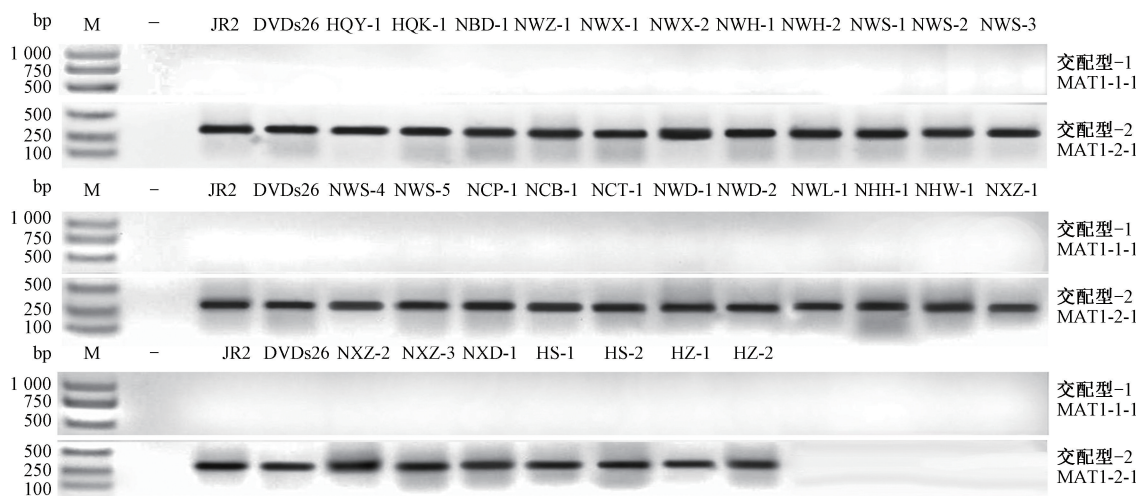


图2 29株马铃薯大丽轮枝菌菌株交配型的PCR鉴定

Fig. 2 The identification result of mating types for 29 strains of potato *Verticillium dahliae* by PCR

M: DL2000; -: 负对照; JR2: 1号生理小种菌株; DVDs26: 2号生理小种菌株; 其它均为大丽轮枝菌菌株。M: DL2000; -: negative control; +: positive control; JR2: the isolate of race 1; DVDs26: isolate of race 2; the others are strains of *Verticillium dahliae*.

表2 29株马铃薯大丽轮枝菌菌株的致病力测定结果

Table 2 Measurement of the pathogenicity for 29 strains of potato *Verticillium dahliae*

菌株编号 Strain code	病情指数 Disease index	菌株编号 Strain code	病情指数 Disease index	菌株编号 Strain code	病情指数 Disease index
HQY-1	17.51±2.34 mn	NWS-3	21.97±2.08 ijk	NWL-1	15.78±2.91 n
HQK-1	20.97±1.87 jk	NWS-4	39.31±1.52 d	NXZ-1	20.57±1.82 kl
NBD-1	63.34±2.54 b	NWS-5	10.85±2.13 p	NXZ-2	42.85±2.13 c
NWZ-1	27.54±2.55 g	NCP-1	83.33±2.45 a	NXZ-3	40.60±2.48 d
NWX-1	22.91±2.67 ij	NCB-1	40.20±3.66 d	NXD-1	13.73±2.17 o
NWX-2	18.64±3.65 lm	NCT-1	40.17±2.83 d	HS-1	25.06±1.55 h
NWH-1	21.20±1.83 jk	NWD-1	27.92±1.87 g	HS-2	20.25±3.42 kl
NWH-2	37.18±3.98 e	NWD-2	20.40±2.98 kl	HZ-1	34.30±1.96 f
NWS-1	23.92±2.81 hi	NHH-1	20.52±1.97 kl	HZ-2	41.23±2.60 cd
NWS-2	41.23±3.10 cd	NHW-2	37.52±1.73 e		

表中数据为平均数±标准差。不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

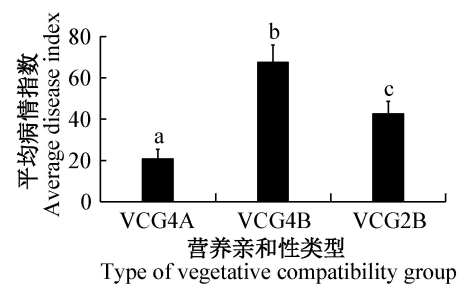


图3 3种马铃薯大丽轮枝菌营养亲和群的致病力测定结果

Fig. 3 Measurement of the pathogenicity of three VCGs of potato *Verticillium dahliae*

图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

本研究对采自内蒙古自治区及其周边地区的29株马铃薯大丽轮枝菌菌株进行Nit突变体筛选,发现Nit1为供试菌株的优势突变体类型,其所占比例为94.6%,而NitM突变体的比例仅为5.4%。该结果和Korolev & Katan(1997)在WAC培养基上筛选来源于不同寄主的大丽轮枝菌Nit突变体结果相似,即94.0%的突变体类型为Nit1,而6.0%的突变体类型为NitM。在对棉花大丽轮枝菌Nit突变体的筛选试验中,Nit1突变体比例为79.1%,NitM突变体仅为19.5%(李卫等,2010);在对马铃薯大丽轮枝菌Nit突变体的筛选试验中,NitM突变体比例为35%

(Joaquim & Rowe, 1990);而在不同寄主大丽轮枝菌 NitM 突变体的筛选试验中, NitM 突变体所占比例高达 45% (Chen, 1994)。不同筛选试验中, NitM 突变体比例差异较大, 其原因可能是培养条件以及供试菌株寄主来源不同。

本研究结果表明 29 株来自内蒙古自治区以及周边地区不同采集地点的马铃薯大丽轮枝菌菌株被划分为 3 个不同的营养亲和群, 其中 VCG4A 为优势亲和群, 所占比例为 55.2%, 而 VCG2B 也是一个重要的亲和群类型, 占比为 37.9%。鉴定为 VCG4B 型的马铃薯大丽轮枝菌最少, 仅有 2 株菌株。该研究结果与已有的研究报道有所不同, 如 Bhat et al. (2003) 将辣椒大丽轮枝菌划分为 3 个营养亲和群, 分别为 VCG2、VCG4 和 VCG6; 而西瓜上分离得到的大丽轮枝菌被鉴定为 4 个营养亲和群, 其中 VCG2A 和 VCG2B 为主要的营养亲和群 (Elena, 2000); 在采自以色列棉花种植区的大丽轮枝菌中, VCG2B 和 VCG4B 是比较常见的营养亲和群 (Korolev et al., 2000)。此外, 本研究还发现被鉴定为不同营养亲和群的马铃薯大丽轮枝菌菌株与其采集地点无明显的相关性, 该结果与 Korolev et al. (2000) 的研究结果一致, 即营养亲和群类型与菌株地理分布的一致性较差, 甚至同一地区可能存在多种亲和群类型或者同一亲和群分布于多个地理区域 (Daayf et al., 1998)。

本研究利用国际通用的马铃薯大丽轮枝菌生理小种的特异性引物将供试菌株鉴定为单一的 2 号生理小种, 该结果与 Short et al. (2014) 从番茄植株上分离的大丽轮枝菌菌株主要为 2 号生理小种的结果一致, 但与 Usami et al. (2012) 对采自生菜的 329 株大丽轮枝菌的研究结果相反, 即 311 株供试菌株均被鉴定为 1 号生理小种, 所占比例为 94.52%, 仅有 18 株菌株被鉴定为 2 号生理小种。目前我国采自棉花、茄子和向日葵的大丽轮枝菌均被鉴定为 2 号生理小种, 本研究将采自马铃薯的大丽轮枝菌全部鉴定为 2 号生理小种也是预期的结果。至于为什么我国不同寄主来源的大丽轮枝菌都鉴定为单一的 2 号生理小种还需要进行深入研究。本研究供试菌株均被鉴定为 MAT1-2-1 交配型, 表明无性生殖是目前内蒙古自治区及其周边地区马铃薯大丽轮枝菌的主要繁殖方式, 该结果与 Gurung et al. (2014) 的研究结果一致, 即采自生菜的 329 株大丽轮枝菌菌株中, 328 株被鉴定为 MAT1-2-1 交配型, 占供试菌株的 99.69%, 仅有 1 株被鉴定为 MAT1-1-1 交配型。Usami et al.

(2009) 对采自日本番茄、甜椒和茄子上的 61 株大丽轮枝菌菌株进行交配型鉴定, 其中 5 株被鉴定为 MAT1-1-1 型, 其余 56 株均被鉴定为 MAT1-2-1 型。

关于大丽轮枝菌 VCG 型与致病力相关的研究已有报道 (Joaquim & Rowe, 1990; Strausbaugh et al., 1992; Daayf et al., 1995)。Korolev et al. (2008) 研究结果表明 VCG1/D 型大丽轮枝菌在棉花和秋葵上有较高的致病力, 而在其它寄主上表现出中等致病水平; 在茄子上, VCG4B 型大丽轮枝菌的致病力明显强于其它 VCG 型。本研究结果表明, VCG4B 型菌株致病力整体高于 VCG2B 型和 VCG4A 型菌株, 该结果与 Korolev et al. (2008) 研究结果一致, 即在采自茄子大丽轮枝菌中, VCG4B 型菌株的致病力最强。Dervis et al. (2009) 研究结果表明 VCG2B 型菌株的致病力最强, VCG4B 型菌株的致病力中等, 而 VCG4A 型菌株的致病力最弱, 与本研究结果 VCG4A 型菌株致病力最弱的结果相一致, 但与 VCG4B 型菌株的整体致病力最高的结果不符。因此, 不同寄主来源的大丽轮枝菌营养亲和群的致病力差异很大的原因可能是菌株的寄主来源、接种条件以及鉴定所用寄主品种的抗性水平不同。

参 考 文 献 (References)

- Alkher H, El Hadrami A, Rashid KY, Adam LR, Daayf F. 2009. Cross-pathogenicity of *Verticillium dahliae* between potato and sunflower. *European Journal of Plant Pathology*, 124(3): 505–519
- Atallah ZK, Maruthachalam K, du Toit L, Koike ST, Michael Davis R, Klosterman SJ, Hayes RJ, Subbarao KV. 2010. Population analyses of the vascular plant pathogen *Verticillium dahliae* detect recombination and transcontinental gene flow. *Fungal Genetics and Biology*, 47(5): 416–422
- Bhat RG, Smith RF, Koike ST. 2003. Characterization of *Verticillium dahliae* isolates and wilt epidemics of pepper. *Plant Disease*, 87(7): 789–797
- Chen W. 1994. Vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* from ornamental woody plants. *Phytopathology*, 84(2): 214–219
- Daayf F, Nicole M, Belanger BR, Geiger JP. 1998. Hyaline mutants from *Verticillium dahliae*, an example of selection and characterization of strains for host-parasite interaction studies. *Plant Pathology*, 47(4): 523–529
- Daayf F, Nicole M, Geiger JP. 1995. Differentiation of *Verticillium dahliae* populations on the basis of vegetative compatibility and pathogenicity on cotton. *European Journal of Plant Pathology*, 101(1): 69–79
- Dervis S, Yetisir H, Tok F, Kurt S, Karaca F. 2009. Vegetative compatibility groups and pathogenicity of *Verticillium dahliae* isolates from watermelon in Turkey. *African Journal of Agricultural Re-*

- search, 4(11): 1268–1275
- Elena K. 2000. Vegetative compatibility among *Verticillium dahliae* isolates from watermelon in Greece. *Phytoparasitica*, 28(2): 115–120
- Gurung S, Short DP, Atallah ZK, Subbarao KV. 2014. Clonal expansion of *Verticillium dahliae* in lettuce. *Phytopathology*, 104(6): 641–649
- Iglesias-Garcia AM, Villarroel-Zeballos MI, Feng CD, du Toit LJ, Correll JC. 2013. Pathogenicity, virulence, and vegetative compatibility grouping of *Verticillium* isolates from spinach seed. *Plant Disease*, 97(11): 1457–1469
- Jing L, Pei X, Yang LQ, Li L, Zhou HY, Zhao J. 2014. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium dahliae* isolates from sunflower. *Chinese Journal of Oil Crop Science*, 36(1): 106–112 (in Chinese) [景岚, 裴旭, 杨柳青, 李莉, 周洪友, 赵君. 2014. 向日葵黄萎病菌营养亲和性及致病力分化. *中国油料作物学报*, 36(1): 106–112]
- Joaquim TR, Rowe RC. 1990. Reassessment of vegetative compatibility relationship among strains of *Verticillium dahliae* using nitrate-nonutilizing mutants. *Phytopathology*, 80(11): 1160–1166
- Korolev N, Katan J, Katan T. 2000. Vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in Israel: their distribution and association with pathogenicity. *Phytopathology*, 90(5): 529–536
- Korolev N, Katan T. 1997. Improved medium for selecting nitrate-nonutilizing (nit) mutants of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 87(10): 1067–1070
- Korolev N, Pérez-Artés E, Mercado-Blanco J, Bejarano-Alcázar J, Rodríguez-Jurado D, Jiménez-Díaz RM, Katan T, Katan J. 2008. Vegetative compatibility of cotton-defoliating *Verticillium dahliae* in Israel and its pathogenicity to various crop plants. *European Journal of Plant Pathology*, 122: 603–617
- Li W, Hou LJ, Liu YX, Mao L, Yang JR, Yu Z. 2010. Pathogenicity differentiation and vegetative compatibility determination of cotton *Verticillium dahliae* in Shanxi. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 19(8): 90–94, 110 (in Chinese) [李卫, 侯丽娟, 刘燕霞, 毛岚, 杨家荣, 俞征. 2010. 陕西棉花黄萎病菌致病力分化及其营养亲和性. *西北农学报*, 19(8): 90–94, 110]
- Maruthachalam K, Atallah ZK, Vallad GE, Klosterman SJ, Hayes RJ, Davis M, Subbarao KV. 2010. Molecular variation among isolates of *Verticillium dahliae* and polymerase chain reaction-based differentiation of races. *Phytopathology*, 100(11): 1222–1230
- Metzenberg RL, Glass NL. 1990. Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *Bioessays*, 12(2): 53–59
- Omer MA, Johnson DA, Rowe RC. 2000. Recovery of *Verticillium dahliae* from North American certified seed potatoes and characterization of strains by vegetative compatibility and aggressiveness. *American Journal of Potato Research*, 77(5): 325–331
- Peng XW. 2003. The investigation of potato disease of Hebei Province and research on major fungal disease of potato. Master Thesis. Baoding: Agricultural University of Hebei (in Chinese) [彭学文. 2003. 河北省马铃薯病害调查及主要真菌病害研究. 硕士学位论文. 保定: 河北农业大学]
- Short DP, Gurung S, Maruthachalam K, Atallah ZK, Subbarao KV. 2014. *Verticillium dahliae* race 2-specific PCR reveals a high frequency of race 2 strains in commercial spinach seed lots and delineates race structure. *Phytopathology*, 104(7): 779–785
- Stewart CN Jr., Via L. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*, 14(5): 748–750
- Strausbaugh CA. 1993. Assessment of vegetative compatibility and virulence of *Verticillium dahliae* isolates from Idaho potatoes and tester strains. *Phytopathology*, 83(11): 1253–1258
- Strausbaugh CA, Schroth MN, Weinhold AR, Hancock JG. 1992. Assessment of vegetative compatibility of *Verticillium dahliae* tester strains and isolates from California potatoes. *Phytopathology*, 82(1): 61–68
- Usami T, Itoh M, Amemiya Y. 2009. Asexual fungus *Verticillium dahliae* is potentially heterothallic. *Journal of General Plant Pathology*, 75: 422–427
- Usami T, Itoh M, Morii S, Miyamoto T, Kaneda M, Ogawara T, Amemiya Y. 2012. Involvement of two different types of *Verticillium dahliae* in lettuce wilt in Ibaraki Prefecture, Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 78(5): 348–352
- Usami T, Shu I, Takashina H, Matsubara H, Amemiya Y. 2007. Cloning of DNA fragments specific to the pathotype and race of *Verticillium dahliae*. *Journal of General Plant Pathology*, 73(2): 89–95
- Vallad GE, Qin QM, Grube R, Hayes RJ, Subbarao KV. 2006. Characterization of race-specific interactions among isolates of *Verticillium dahliae* pathogenic on lettuce. *Phytopathology*, 96(12): 1380–1387
- Wang XW, Yu NL. 2000. Vegetative compatibility group of *Verticillium dahliae* from cotton in Xinjiang. *Acta Phytopathologica Sinica*, 30(2): 192 (in Chinese) [王雪薇, 喻宁莉. 2000. 新疆棉花黄萎病菌营养体亲和群的研究. *植物病理学报*, 30(2): 192]
- Yu ZD, Cao ZM, Gao AQ, Zhang GL. 2002. Advances in the studies of fungal vegetative compatibility group. *Journal of Northwest Forestry University*, 17(3): 80–85 (in Chinese) [余仲东, 曹支敏, 高爱琴, 张刚龙. 2002. 真菌营养体亲和性的研究. *西北林学院学报*, 17(3): 80–85]
- Zhang CL. 2004. Occurrence and control of potato *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Doctor*, 17(5): 6 (in Chinese) [张成礼. 2004. 马铃薯黄萎病的发生与防治. *植物医生*, 17(5): 6]

(责任编辑: 张俊芳)