

# 新疆棉花枯萎病菌营养亲和群的初步研究\*

张莉 李国英 丁之铨 孙文姬

(石河子大学农学院 新疆 832003) (中国农科院植保所 北京 100069)

**摘要** 从新疆各植棉区采集棉花枯萎病病株,经分离纯化获 49 个单孢菌株。接种试验表明: 49 个菌株均使棉花产生枯萎病症状。利用氯酸钾诱变棉花枯萎病菌,产生抗氯酸盐的硝酸盐营养突变株(nit mutant),49 个菌株共诱发获得 336 个 nit 突变株。将获得的 nit 突变株作营养亲和性配对反应,可将 49 个菌株分为 4 个亲和群,其中 46 个菌株属同一亲和群,它们均与 7 号小种的 nit 突变株相亲和,其余 3 个菌株分别属于其它亲和群。

**关键词** 新疆; 棉花枯萎病菌; nit 突变株; 营养亲和群

国内外研究表明,棉花枯萎病菌具有较强的生理专化性。依据致病性可将世界范围的棉花枯萎病菌划分为 1 2 3 4 5 6 7 8 号生理小种<sup>[1]</sup>,但是,利用病原物对不同寄主的致病性来划分生理小种存在费时、费力,结果易受外界因素影响且不能反映不同菌株间亲缘关系等问题。Puhalla<sup>[2~4]</sup>首先确定用不能还原硝酸盐作唯一氮源生长的突变体(nit 突变体)做营养亲和性研究,对种下单位进行分类,开辟了一条依靠真菌自身的遗传特性而不是病原与寄主的关系进行种下分类的新途径。本文对新疆各植棉区采集分离的棉花枯萎病菌作了硝酸盐营养突变株及其亲和群的研究,旨在了解新疆棉花枯萎病菌的遗传特征,为探索新疆棉花枯萎病菌营养亲和群与生理小种的关系奠定基础。

## 1 材料与方 法

1.1 供试菌株 1995~1996 年自新疆各主要植棉区采集棉花枯萎病病株,用常规组织分离法作病原菌的分离,并用稀释法进行单孢分离,获得 49 个单孢菌株。依 B. ooth. C 分类标准<sup>[5]</sup>鉴定为尖孢镰刀菌,同时进行致病性测定。结果表明,各菌株均可使棉花表现棉枯萎病症状。

标准菌株 Ag2 Ag84 Ag16 属于 3 7 8 号生理小种,由中国农科院植保所赠送

1.2 培养基 基本培养基、KPS 培养基和用于突变体类型鉴别的 5 种培养基均按 Correll<sup>[6]</sup>、鲍建荣等<sup>[7]</sup>的方法配制

1.3 nit 突变体的获得 将 PSA 培养基上的菌块移入 KPS 平板培养基上,每皿 3 块,每菌株 2 皿,25℃ 下暗培养,5~7 d 后,发现从最初受抑制的菌落上出现快速生长的扇形面,立即将其转到 MM 培养基上,与野生菌株对照,在 MM 培养基上生长稀薄并无气生菌丝的即为 nit 突变体,将其转于 MM 斜面培养基于 4℃ 冰箱保存备用。

1.4 nit 突变体类型的鉴定 已知尖孢镰刀菌 nit 突变株有 4 种不同的表现型: nit1 nit3 nit8 nitM (表 1) 依据 nit 突变体对 5 种氮源的利用可鉴定出 nit1 和 nitM 依据亚硝酸反应可区分 nit3 和 nit8 亚硝酸反应参照鲍建荣等<sup>[8]</sup>的方法进行。

1.5 营养亲和性测定 自身营养亲和性测定 将同一菌株的 nit 突变株置 MM 培养基于 25℃ 下配对培养(间距约 2 cm),根据菌块间菌落接触处野生型菌落是否恢复生长(形成茂盛的气生菌丝带)确定菌

株自身是否亲和

不同菌株间营养亲和性测定 选用一个亲和性较强的 nitM 突变体作为测试菌株,首先用测试菌株与各菌株 nit 突变体进行营养亲和性测定,不与测试菌株亲和的菌株再进行全组合排列测定亲和性。再用标准菌株 Ag2 Ag84 Ag16 的 nit 突变株分别与各菌株 nit 突变株进行营养亲和性测定。根据菌块间菌落接触处野生型菌落是否恢复生长(形成茂盛的气生菌丝带)确定菌株间是否亲和

表 1 尖孢镰刀菌 nit 突变体类型鉴定

Table 1 Identification of nit mutant phenotypes in Fusarium oxysporum

Table with 6 columns: Phenotype, Growth on nitrogen sources (MM, MO2, MA, MH, MU), and Nitrite reaction. Rows include Wild-type, nit1, nit8, nit3, and nitM.

“+”野生型生长,菌丝体茂盛 Wild-type growth, mycelium dense. “-”无气生菌丝的突变型生长,菌丝体稀疏 Thin and expansive growth with no aerial mycelium, mycelium thin

2 结果与分析

2.1 nit 突变体的产生和筛选

参试的 49 个棉花枯萎病菌的菌株都产生了抗 KClO3 的扇形角变区,共 387 个。将这些扇形角变区移植于 MM 培养基上培养,其中 336 个(表 2)无气生菌丝的匍匐生长,说明它们是不能利用硝酸盐的突变体。另外 51 个扇形角变区在 MM 培养基上有气生菌丝的旺盛生长,表明它们既抗 KClO3 又可利用硝酸盐。不同菌株产生突变体的难易程度不同,有些菌株较易产生角变区,如和-6 喀-3 昌-1,分别产生 12 10 9 个扇形角变区;有些菌株则较难产生扇形角变区,如塔-2 石-7 喀-2,仅分别诱得 2 2 5 个扇形角变区。说明不同来源的菌株间在遗传上有一定差异。

标准菌株 Ag2 Ag84 Ag16 较易产生扇形角变区,分别产生 10 8 8 个扇形角变区,移植于 MM 培养基上

Table 2 Phenotype, number, and vegetative compatibility group of nit mutant in Fusarium oxysporum

Large table with 12 columns: Strains, Collected region, nit1, nitM, nit3, nit8, nitX, Total VCGs, Strains, Collected region, nit1, nitM, nit3, nit8, nitX, Total VCGs. Rows list various strains and their characteristics.

培养基上表现为无气生菌丝的匍匐生长,为 nit 突变体

## 2.2 nit 突变体类型的鉴定

通过 nit 突变体在 5 种含有不同氮源培养基中的生长情况,将其分为不同的突变类型,所有菌株 nit 突变体的表现型及数量见表 2。由表 2 看出,各菌株获得各类型突变株的比例不同,总体上各类型突变比例是 nit1 > nitM > nit8 > nit3,其中 nit1 在各菌株中均较易诱得。经亚硝酸反应没有诱得 nit3 突变株,也较难诱得 nit8。另外有 6 个菌株出现一种不能利用尿酸的类型,现初步定名为 nitX。

## 2.3 棉枯萎病菌营养体亲和群测定结果

各菌株自身进行亲和性测定结果表明,在各菌株内,nitM 突变株可以与本菌株内的 nit1 nitM nit3 或 nit8 发生亲和。前人研究也表明,nitM 突变株的亲和力高,而且很稳定,具有本菌株的代表性,因此选用亲和性较强的 nitM 突变体作为测试菌株,测定各菌株间的营养亲和性,不与 nitM 亲和的菌株再进行全组合排列测定亲和性。结果(表 2)表明,供测 49 个菌株分为 4 个亲和群,其中 VCG<sub>1</sub> 包括 46 个菌株,占供测菌株的 93.9%,均与标准菌株中的 7 号小种 Ag84 亲和,另外 3 个(吐-2 昌-4 石-2)分属不同的亲和群,它们与标准菌株中的 7 号、8 号和 3 号小种的 Ag84 Ag16 Ag2 菌株的突变体均不亲和。

## 3 结论和讨论

国内自 60 年代起就对棉花枯萎病菌的生理型、生理小种进行了研究,将中国棉花枯萎病菌分为 3 种生理型或 3 号、7 号、8 号生理小种。丁之铨<sup>[9]</sup>对中国棉花枯萎病菌 3 个生理小种的 61 个菌株做营养亲和性研究,结果属于 3 号小种的 3 个菌株和属于 7 号小种的 42 个菌株各属于不同的 VCGs,属于 8 号小种的 8 个菌株则属于 6 个不同的亲和群,不同小种菌株间无亲和性,说明棉花枯萎病菌中的 7 号和 3 号生理小种与亲和群关系简单。鲍建荣<sup>[8]</sup>对尖孢镰刀菌的 6 个专化型的 20 个菌株进行了营养亲和性研究,结果显示,不同专化型菌株的 nit 株之间无互补反应,而同一专化型的不同菌株上分离的 nit 株之间可产生亲和反应,说明 nit 突变株的营养体亲和群与菌株的专化型有相关性。另外,本试验利用亚硝酸反应对供试菌株区分 nit3 和 nit8,测定结果全部属于 nit8,无 nit3。

本研究结果表明,供试的 49 个菌株经营养亲和性测定分为 4 个亲和群,其中 VCG<sub>1</sub> 中包括 46 个菌株,其余 3 个菌株分属于 VCG<sub>2</sub> VCG<sub>3</sub> VCG<sub>4</sub> 亲和群。由此可知,新疆的棉花枯萎病菌多属于同一营养亲和群(VCG<sub>1</sub>),以 VCG<sub>1</sub> 占主体,且 VCG<sub>1</sub> 中的所有菌株与标准菌株的 7 号小种 nit 突变体相亲和。各亲和群与生理小种间的关系待新疆棉花枯萎病生理小种鉴定结束后再作评价。

## 参 考 文 献

- 1 陈其瑛,籍秀琴,孙文姬. 我国棉枯萎镰刀菌生理小种研究. 中国农业科学, 1985, 18(6): 1~ 6
- 2 Puhalla J E *et al.* Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae*. Phytopathology, 1983, 73: 1305~ 1308
- 3 Puhalla J E. Classification of isolates of *Verticillium dahliae* based on heterokaryon incompatibility. Canadian Journal of Botany, 1979, 69: 1186~ 1189
- 4 Puhalla J E. Classification of isolates of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetable compatibility. Canadian Journal of Botany, 1985, 63: 179~ 183
- 5 布 斯. 镰刀菌属. 北京: 农业出版社, 1971: 199~ 200
- 6 Correll J C *et al.* Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. Phytopathology, 1987, 77: 1640~ 1646
- 7 鲍建荣. 尖孢镰孢硝酸盐营养突变体及其营养体亲和性. 植物病理学报, 1992, 22(4): 329~ 332
- 8 鲍建荣. 尖孢镰孢-新硝酸盐突变体类型与营养亲和性. 真菌学报, 1993, 12(4): 297~ 303
- 9 丁之铨. 我国棉枯萎镰刀菌小种间营养亲和性. 棉花学报, 1992, 4(2): 85~ 91

# Study on Vegetative Compatibility among Isolates of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in Xinjiang

Zhangli, Li Guoying

( Agricultural College of Shihezi University, Xinjiang 832003)

Ding Zhiquan, and Sun Weiji

( Plant Protection Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094 )

**Abstract** 49 strains of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* were collected from diseased cotton stalks of main cotton productive region in Xinjiang. Inoculation assay indicated that cotton is different degree sensitive to 49 strains, 49 strains produced 336 nitrate nonutilizing mutant on PSA media amended with 1.5%  $KClO_3$ , complementation or vegetative compatibility tests were carried out on minimal media by pairing the nit mutants from the same strain and from different strains, 49 strains were assigned to 4 vegetative compatibility groups( VCGs ), VCG<sub>1</sub> contains 46 strains which were vegetative compatibility with nit mutants of race 7, and each of other three VCGs only include one.

**Key words** Xinjiang; *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*; Nit mutant; Vegetative compatibility group