

石河子地区棉花黄萎病菌致病型的分子监测

康东岭¹, 秦建新¹, 王亦辉², 肖林清², 张莉^{2*}

(1.新疆兵团农八师 144 团, 新疆石河子 832036; 2.石河子大学农学院植保系, 新疆石河子 832003)

摘要 [目的]查明落叶型黄萎病菌在石河子地区的存在情况。[方法]采用了 PCR 技术对石河子地区棉花黄萎菌系进行检测, 监测石河子地区棉花黄萎病菌致病类型。[结果] 利用非落叶型棉花黄萎病菌的特异引物 ND1、ND2 对石河子棉区采来的 114 个棉花黄萎病菌菌系进行 PCR 扩增, 108 个菌系扩增出 1 500 bp 的片段, 与文献中报道的非落叶型棉花黄萎菌系扩增出的片段大小一致, 说明这些菌系为非落叶型棉花黄萎菌系; 而剩余的 6 个菌系未扩增出任何片段; 利用落叶型黄萎病菌的特异性引物 D1、D2 对这 6 个菌系进行扩增, 也未扩增出任何片段。[结论]非落叶型黄萎病菌占供试菌系的 99.5%, 表明目前石河子地区棉花黄萎病菌依旧以非落叶型黄萎病菌为主。

关键词 致病型; 黄萎病菌; 分子监测

中图分类号 S435.621.2*4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)17-07141-02

Study on the Molecular Monitoring of the Pathotype of Cotton Verticillium Wilt Pathogen in Shihezi Region

KANG Dong-ling et al (The 144th Regimental Farm of Agriculture Division 8 in Xinjiang Corps, Shihezi, Xinjiang 832036)

Abstract [Objective] The aim of the research was to find out the existence of defoliating pathotype of verticillium wilt pathogen in Shihezi region. [Method] Cotton verticillium wilt pathogen in Shihezi region was detected by using PCR technology to monitor the pathotypes of cotton verticillium wilt pathogen in Shihezi region. [Result] The specific primers ND1, ND2 of non-defoliation pathotype of cotton verticillium wilt pathogen were used to make PCR amplification on 114 strains of cotton verticillium wilt pathogen from Shihezi cotton region. The fragment (1 500 bp) was amplified from 108 bacterial system and its size was accordant with the size of the amplified fragment by the non-defoliation pathotype of cotton verticillium wilt pathogen that reported in the literature, which indicated that this bacterial strains were non-defoliation pathotype of cotton verticillium wilt pathogen. While no fragment was amplified from the residual 6 bacterial strains. The specific primers D1 and D2 of defoliating pathotype of verticillium wilt pathogen were used to amplify these 6 bacterial strains and no fragment was amplified also. [Conclusion] The non-defoliation pathotype of cotton verticillium wilt pathogen occupied 99.5% of the tested bacterial strains, which indicated that the cotton verticillium wilt pathogens in Shihezi region was still mainly non-defoliation pathotype of cotton verticillium wilt pathogen at present.

Key words Pathotype; Verticillium Wilt Pathogen; Molecular monitoring

棉花黄萎病是棉花生产中最重要病害, 遍布世界各个主要的产棉区, 严重地影响棉花的产量和质量^[1]。棉花黄萎病菌存在较强的致病性分化, 目前依据黄萎病菌侵染棉花后是否引起叶片脱落, 将病菌分为落叶型与非落叶型 2 类致病类型, 其中以落叶型黄萎病菌的致病力最强, 危害最重。在我国, 落叶型菌系自 1983 年首次发现以来, 对我国的棉花生产已造成严重危害^[2]。鉴于棉花黄萎病菌落叶型菌系的巨大危害, 快速检测出落叶型棉花黄萎病菌是阻止该病害传播扩展的重要基础^[3]。因此, 笔者采用了 PCR 技术对石

河子地区棉花黄萎菌系进行检测, 监测石河子地区棉花黄萎病菌致病类型, 查明石河子地区是否存在落叶型黄萎病菌, 旨在为该病害的综合防治提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌系 2005~2006 年从石河子地区主要植棉区采集棉花黄萎病株, 从农八师 13 个团场棉田采集棉花黄萎病病株 328 份, 通过常规的组织分离, 单孢分离, 获得棉花黄萎病菌的纯培养菌株 114 个, 具体的采样时间和地点见表 1 和表 2。

表 1 2005 年棉花黄萎病菌的采样地点和品种
Table 1 Sampling sites and cultivars of cotton verticillium wilt pathogen in 2005

序号 No.	采样地点 Sampling site	棉花品种 Cotton cultivar	序号 No.	采样地点 Sampling site	棉花品种 Cotton cultivar	序号 No.	采样地点 Sampling site	棉花品种 Cotton cultivar
1'	148 团 2 营园林连	炮台 1 号	19'	121 团 22 连 8 斗 3 号	炮台 1 号	36'	143 团 1 场 16 连 10 号	早 13
2'	148 团 2 营 11 连 23 号	康地 1 号	20'	134 团 6 连 102 南	炮台 1 号	37'	143 团 2 场 15 连 9-10	早 23
3'	148 团 1 营 6 连	炮台 1 号	21'	134 团 6 连 6-4	炮台 1 号	38'	143 团 2 场 10 连 15 号	297-5
4'	148 团 1 营 2 连 9 号	炮台 1 号	22'	134 团 12 连 23	炮台 1 号	39'	143 团 2 场 12 连 8 斗 5	中 42
5'	148 团 2 营营部	炮台 1 号	23'	133 团 11 连南 8 号	早 12	40'	143 团 3 场 12 连 9 号	297-5
6'	149 团 1 区 12 连 39 号	81-3	24'	133 团 11 连负 1 号	康地 1 号	41'	143 团 3 场 12 连基建连	297-5
7'	149 团 1 区 12 连 44 号	150-2	25'	133 团 12 连 2 轮 6 号	康地 1 号	42'	143 团 3 场 17 连 3 号	早 13
8'	149 团 1 区 12 连 46 号	18-3	26'	133 团 2 连 27 轮 4 号	81-3	43'	145 团 6 场 1 连 3 号	297-5
9'	149 团	-	27'	142 团 1 营良种连西 S	炮台 1 号	44'	145 团 6 场 5 连 13	-
10'	150 团 6 连路南	炮台 1 号	28'	142 团 1 营 10 连 74 号-2	炮台 1 号	45'	145 团 3 分场 19 连西 7	早 13
11'	150 团 6 连	炮台 1 号	29'	142 团 3 营 11 连 8 号	炮台 1 号	46'	147 团 19 连 182 号	297-5
12'	150 团 13 连 65 号 1	炮台 1 号	30'	142 团 1 营 10 连 74-2	炮台 1 号	47'	132 团 4 连 4 斗 7 号	297-5
13'	150 团 13 连 65 号 2	81-3	31'	142 团 3 营 12 连 32 东	297-5	48'	132 团 15 连 2 号	炮台 1 号
14'	150 团砖瓦厂	-	32'	142 团 1 营良种连	炮台 1 号	49'	141 团 12 连西苗圃	炮台 1 号
15'	121 团 6 连 3 斗 2-4 号	炮台 1 号	33'	144 团种子站 3 斗 2 号	炮台 1 号	50'	141 团 5 连中小 3 号	早 12
16'	121 团 6 连 3 斗 3-1 号	炮台 1 号	34'	144 团种子站 5 斗 2 号	-	51'	141 团 12 连	天河 991
17'	121 团 4 连 2 斗 4 号	炮台 1 号	35'	143 团 1 分场 4 连下 10A	早 13	52'	141 团 11 连 16 号	297-5
18'	121 团 22 连 8 斗 2 号	炮台 1 号						

基金项目 石河子大学“263”人才培养工程项目。

作者简介 康东岭(1971-), 男, 安徽涡阳人, 助理农艺师, 从事棉花栽培技术研究及推广工作。* 通讯作者。

收稿日期 2008-04-16

1.2 菌丝培养 将分离纯化的棉花黄萎病菌各菌系移至 PDA 平板上培养, 当菌落扩展至 1.5 cm 时用无菌刀片切下转移到盛有 250 ml 的查氏培养液的三角瓶中, 25 °C 振荡培

表 2 2006 年棉花黄萎病菌的采样地点和品种
Table 2 Sampling sites and cultivars of cotton verticillium wilt pathogen in 2006

序号 No.	采样地点 Sampling site	棉花品种 Cotton cultivar	序号 No.	采样地点 Sampling site	棉花品种 Cotton cultivar	序号 No.	采样地点 Sampling site	棉花品种 Cotton cultivar
1	143 团 3 连 15 斗 1	-	22	133 团 7 连 13 轮 7 号	217	43	121 团 9 连 4 斗 10-1	新炮台台
2	143 团 17 连 61-4 号	中 42	23	133 团 15 连 32-7	标杂	44	121 团 9 连猪场	新炮台
3	143 团 18 连 15 号	134-1	24	133 团 7 连 12 轮 5 号	217	45	144 团 16 连 11 斗西 2	炮台
4	143 团 17 连 23#	中 42	25	133 团 13 连 16-3	早 20	46	144 团种子站参观站	297-5
5	146 团路东	-	26	133 团 15 连负 1	217	47	144 团 20 连 16 斗东 1	-
6	146 团 6 分场	-	27	134 团 3 连 10 号 4	602	48	142 团良种连 58 号	297-5
7	146 团 7 连	-	28	134 团 13 连 26 轮 3 号 4	297-5	49	142 团 12 连 23 号	炮台
8	147 团 10 连 2#	-	29	134 团 12 连 3 号 1	602	50	142 团良种连 53 号	297-5
9	147 团团部水管站	-	30	134 团 17 连 3 轮 4	297-5	51	142 团 1 连北 30	-
10	147 连良种连	-	31	148 团团部	-	52	142 团 11 连 1 号	99-5
11	147 团 13 连 61#	-	32	148 团 2 营一连 19 号	早 12	53	142 团 3 营营部	炮台
12	147 团 4 连	-	33	148 团 2 营 12 连	-	54	142 团 1 连 27	-
13	150 团 5 连 2# 地	-	34	148 团 2 营 11 连 30 号杂块	早 12	55	132 团 4 连 4 斗 7	-
14	150 团 15 连 66#	-	35	148 团 3 营 2 连(4)	-	56	132 团 14 连	297-5
15	150 团 13 连	-	36	148 团园林 2 队	-	57	132 团 4 连 3 斗 4	辽 18
16	150 团 6 连 2 号	-	37	148 团 2 营 11 连 19 号	早 12	58	141 团加工厂 12#	炮台
17	149 团 12 连 39 号东	18-3	38	121 团 8 连 5 斗 5 负 4	602	59	141 团 11 连 10#	炮台
18	149 团良种连(感)	-	39	121 团 17 连 12	297-5	60	141 团 5 连 3# 路西	-
19	149 团良种连(感)	-	40	121 团 24 连 4 斗 8 负 3	297-5	61	141 团 12 连	704
20	149 团良种连(抗)	-	41	121 团 10 连 3 斗 10-1	新炮台台	62	141 团 13 连 1#	301
21	133 团 1 连 19-7	K7	42	121 团 24 连 4 斗 9 负 2	炮台			

注:“-”表明棉花品种未知。

Note: - stands for unknown cotton cultivar.

养 7 d 左右,过滤获得菌丝,晾干,然后置于 -30 ℃ 冰箱中保存备用。

1.3 DNA 提取方法 称取 50 mg 菌粉(菌丝体在液氮中研磨成细粉状)置于 1.5 ml 的离心管中,加入 S 提取缓冲液(200 mmol Tris HCl pH8.5, 250 mmol NaCl, 25 mmol EDTA, 0.5% SDS)750 μ l, 混匀, 65 ℃ 水浴, 1 h 后取上清液, 往其中加入酚:氯仿(1:1)600 μ l, 混匀, 4 ℃ 离心 13 000 r/min 15 min, 取上清液, 往上清液中加入氯仿:异戊醇(24:1)600 μ l, 混匀, 4 ℃ 离心 13 000 r/min 15 min, 取上清液, 用 600 μ l 的氯仿:异戊醇(24:1)将上清液抽提 1 次, 4 ℃ 离心 13 000 r/min 10 min, 取上清液, 往其中加入 0.1 体积醋酸钠和 2 体积冰冷的无水乙醇, 放置 20 ℃ 低温冰箱内 1~2 h, 4 ℃ 离心 13 000 r/min 15 min, 小心倒去液体, 沉淀物用 70% 冰冷的乙醇清洗 2 次, 在空气中自然干燥, 沉淀物用 TE 溶液重新溶解, 置于 4 ℃ 冰箱中保存。

1.4 PCR 反应条件

1.4.1 PCR 反应引物。棉花黄萎病菌特异性引物^{ND1}(5-CAGGGGATACTGGTACGAGACG-3)和 ND2(5-ATGAGTATTGCCGATAAGAACA-3); D1(5-CATGTTGCTCTGTTGACTGG-3)和 D2(5-GACACGGTATCTTTGCTGAA-3), 由上海生物工程技术有限公司合成。

1.4.2 PCR 反应体系。PCR 扩增的反应液总量为 25 μ l, 反应体系为: 10 \times Buffer 2.5 μ l; 1.25 mmol/L MgCl₂ 2.25 μ l; 200 μ mol/L dNTP 2 μ l; 0.5 μ mol/L 引物(ND 或 D)2.5 μ l; 1 Utaq 酶 0.2 μ l; 模板 1 μ l; ddH₂O 14.55 μ l; 反应液在 PTC-200 热循环控制仪中进行。扩增循环为 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 1 min, 56 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 3 min, 30 个循环, 最后 74 ℃ 延伸 10 min。对 PCR 扩增产物进行电泳, 电泳采用 0.8% 琼脂糖胶, 电泳结束后, 将琼脂糖胶置于 TBE 中染色 15 min, 然后置于紫外成像仪上观察结果并扫描于计算机软件中保存。

2 结果与分析

2.1 棉花黄萎病菌 DNA 提取结果 提取了 114 个棉花黄

萎病菌供试菌系的 DNA, 对提取的 DNA 进行电泳, 部分供试菌系的 DNA 电泳结果见图 1。由图 1 可知, 供试的大部分菌系 DNA 提取效果较好, 可以作为模板进行 PCR 扩增。

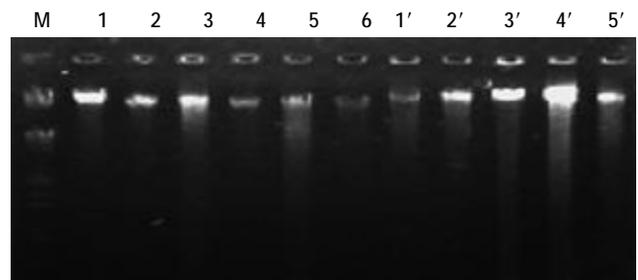


图 1 部分供试菌系的 DNA 提取结果

Fig. 1 DNA extraction result of some tested strains

2.2 棉花黄萎病菌致病型的分子检测结果 利用非落叶型黄萎病菌的引物 ND1、ND2, 分别以 114 个棉花黄萎病菌供试菌系的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 部分供试菌系的扩增结果见图 2。由图 2 可知, 大多供试菌系都扩增出 1 500 bp 大小的片段, 与文献中报道的非落叶型棉花黄萎病菌系扩增出的片段大小一致, 说明这些菌系为非落叶型棉花黄萎菌系, 还有 6 个菌株(52'、48、19、40、56、47')未扩增出条带。未扩增 1 500 bp 条带的 6 个黄萎病菌菌系(52'、48、19、40、56、47')再采用落叶型黄萎病菌的特异引物 D1、D2

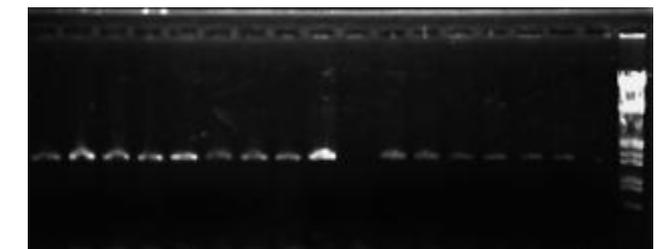


图 2 引物 ND1、ND2 对部分供试菌系的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification result of some tested strains by primers ND1 and ND2

(下转第 7154 页)

参考文献

- [1] HOOPER L V, WONG M H, THELIN A, et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine [J]. *Science*, 2001, 291: 881-884.
- [2] NEISH A S, GEWIRTZ A T, ZENG H, et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I kappa B -alpha ubiquitination [J]. *Science*, 2000, 289: 1560-1563.
- [3] DENISE K, TIMOTHY K, RUSTAM A. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity [J]. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2007, 622(1): 58-69.
- [4] PERSELLO-CARTIEAUX F, NUSSAUME L, ROBAGLIA C. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions [J]. *Plant Cell and Environment*, 2003, 26(2): 189-199.
- [5] LAU K P, WOO C Y, MOK M Y, et al. Characterization of *Haemophilus segnis*, an important cause of bacteremia, by 16S rRNA gene sequencing [J]. *Clin Microbiol*, 2004, 42(2): 877-880.
- [6] DUBOS R, SCHAEGLER R W, COSTELLO R, et al. Indigenous, normal and autochthonous flora of the gastrointestinal tract [J]. *Exp Med*, 1965, 122: 67-75.
- [7] SAVAGE D S. Microbial ecology of the gastrointestinal tract [J]. *Ann Rev Microbiol*, 1977, 31: 107-133.
- [8] XU J, GORDON J I. Inaugural article: honor thy symbionts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(18): 10452-10459.
- [9] MARK WILKS. Bacteria and early human development [J]. *Early Human Development*, 2007, 83(3): 165-170.
- [10] CONWAY P L. The proceedings of the VI international symposium for digestion and physiology of pigs [M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 1997: 233-242.
- [11] LANGENDIJK P S, SCHUT F, JANSSEN G J, et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 3069-3075.
- [12] FRANKS A H, HARMSEN H J, RAANGS G C, et al. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA targeted oligonucleotide probes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 3336-3345.
- [13] LAU K P, WOO C Y, WOO K S, et al. Catheter-related microbacteremia identified by 16S rRNA gene sequencing [J]. *Clin Microbiol*, 2002, 40(7): 2681-2685.
- [14] WOIWODES C R. Bacterial evolution [J]. *Microbiol Rev*, 1987, 51: 221-271.
- [15] GEORGINA H, PRYDE S E, RUSSELL V J, et al. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, 39: 33-39.
- [16] ZOETENDAL E G, AKKERMANS A D L, DE VOS W M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 3854-3859.
- [17] FROTHINGHAM F, ADUNCAR J, WILSON K H. Ribosomal DNA sequences of *Bifidobacteria* implications for sequence based identification of the human colonic flora [J]. *Microb Ecol Health Dis*, 1993, 6: 23.
- [18] LEBLOND B, PHILIPPE N, MANGIN I, et al. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46: 102.
- [19] ROBIN P L, KERRY E, PIPER M, et al. Determination of 16S rRNA Sequences of enterococci and application to species identification of nonmotile enterococcus gallinarum isolates [J]. *Clin Microbiol*, 1998, 36(11): 3399-3407.
- [20] DALY K, STEWART C S, FLINT HA J, et al. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, 38: 141-151.
- [21] 颜世敏, 朱丽萍. 16S rRNA PCR 鉴定嗜酸乳杆菌鸡源分离株 [J]. *中国微生物学杂志*, 2005, 17(2): 115-116.
- [22] NARUT T, SANDRA E, OLIVIER A, et al. Characterization of lactic acid bacteria and other gut bacteria in pigs by a macroarraying method [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1081(10): 276-279.
- [23] KAZUNORI M, HIROKAZU T, TAKASHI A, et al. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(1): 32-39.
- [24] WANG X H. Microbial flora in the digestive tract *Penaeid shrimp* [J]. *Ocean Univ Qingdao*, 2002, 30(3): 493-498.
- [25] HONGO H, OHKUMA Y M, KUDO T. Molecular analysis of bacterial in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae) [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 44: 231-242.
- [26] YUICHI HONGO H, PINSURANG DEEVONG, TETSUSHI INOUE. Intra- and interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 659-6599.
- [27] 袁志辉, 蓝希钊, 杨廷, 等. 家蚕肠道细菌群体调查与分析 [J]. *微生物学报*, 2006, 46(2): 285-291.
- [28] TANNOCK G W, TILSALA-TIMISJARVI A, RODTONG S. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(9): 4264-4267.

(上接第 7141 页)

进行 PCR 扩增, 依旧未扩增出任何条带。

3 结论与讨论

利用非落叶型黄萎病菌的引物对 114 个供试菌系的总 DNA 进行 PCR 扩增, 其中有 108 个菌系扩增出大小为 1 500 bp 片段, 与文献中报道的非落叶型棉花黄萎菌系扩增出的片段大小一致, 说明这些菌系为非落叶型棉花黄萎菌系, 剩余的 6 个菌系 (52'、48、19、40、56、47') 用落叶型和非落叶型引物都未扩增出片段, 这些菌系属于何种致病类型有待继续研究。由该试验可知, 非落叶型黄萎病菌占供试菌系的 99.5%, 表明目前石河子地区棉花黄萎病菌依旧以非落叶型黄萎病菌为主。

在供试的 114 个石河子地区棉花黄萎菌系中虽未检测

到落叶型棉花黄萎病菌, 但新疆棉区已报道存在落叶型棉花黄萎病菌^[9], 因此应加强对石河子棉区黄萎菌系致病类型的检测和监测, 防止黄萎病菌落叶型菌系在当地的传播和蔓延。该试验利用特异性 PCR 的引物检测棉花黄萎病菌的致病类型, 实现了对棉花黄萎病菌致病类型的快速监测。

参考文献

- [1] 董金泉. 农业植物病理学 (北方本) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] 陆家云, 余长夫, 鞠理红, 等. 江苏省棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*) 致病力的分化 [J]. *南京农学院学报*, 1983(1): 36-43.
- [3] 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(2): 181-189.
- [4] ENCARNACION, PEREZ-ARTES. Differentiation of cotton defoliating and nondefoliating pathotypes PCR analyses [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2000, 106: 507-517.
- [5] 张莉, 段维军, 李国英. 应用聚合酶链式反应鉴定新疆棉花落叶型黄萎病菌 [J]. *植物检疫*, 2004(5): 266-268.