

一种新的棉花黄、枯萎病快速接种方法的研究

彭 珊^{1,2}, 吕学莲^{1,2}, 高 峰^{1,2}, 李国英^{1,2}, 李 晖^{1,2*}

(1. 石河子大学农学院植物保护系, 新疆 石河子 832003; 2. 省部共建兵团绿洲生态农业重点实验室, 新疆 石河子 832003)

摘要: 3种不伤根的棉花黄、枯萎病接种方法, 即全生育期的田间病圃鉴定法、液体培养棉花苗期孢子悬浮液浸根法和土壤种植棉花苗期孢子悬浮液灌根法进行对比, 结果表明, 液体培养棉花苗期孢子悬浮液浸根法(接种浓度为 10^7 个分生孢子 \cdot mL⁻¹)全周期只需要30 d。通过这种方法, 不仅可以鉴定出棉花品种对黄、枯萎病菌的抗、感病性, 还可以鉴定不同黄、枯萎病菌菌株的致病力。对比不同浸根接种时间(10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min)对结果的影响, 发现浸根接种40 min可加快发病, 鉴定结果和田间病圃鉴定的比较一致。

关键词: 棉花; 枯萎病; 黄萎病; 接种方法; 液体培养

中图分类号: S435.621 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2008)03-0174-05

Study on a New Rapid Inoculation Method for *Verticillium* wilt and *Fusarium* wilt of Cotton

PENG Shan^{1,2}, LÜ Xue-lian^{1,2}, GAO Feng^{1,2}, LI Guo-ying^{1,2}, LI Hui^{1,2*}

(1. Department of Plant Protection, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2. Key Oasis Eco-Agriculture Laboratory of Xinjiang, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: A rapid and effective inoculation method is the basic technique for identifying cotton varieties' resistance to *Verticillium* wilt and/or *Fusarium* wilt and differentiating the pathogenicity of these pathogens. This study was carried out to search a new inoculation method with high efficiency for cotton *Verticillium* wilt and/or *Fusarium* wilt. The experiment was developed in the field and the greenhouse whose temperature and light was adjustable. Three non-injured cotton root inoculation methods: the whole stage field disease plot appraisal, dipping cotton seedling roots cultured in liquid with spore suspension, and irrigation cotton seedling roots cultured in soil with spore suspension, were compared for their effectiveness in infection and development of *Verticillium* wilt and/or *Fusarium* wilt of cotton. Results showed that, among the three inoculation methods, entire test period with method of field disease plot appraisal needed six months or more, method of irrigation cotton seedling roots cultured in soil with spore suspension needed two months, but dipping cotton seedling roots cultured in liquid with spore suspension (the inoculation concentration was 10^7 conidia \cdot mL⁻¹) needed only 30 days. Besides, by the third inoculation method, not only the cotton varieties' resistance to *Verticillium* wilt and/or *Fusarium* wilt, but also the strains' pathogenicity of *Verticillium dahliae* and/or *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum* could be appraised. The result was accorded with the field appraisal. Furthermore, for this method need not injure any parts of the plant, so it can make the result more accurate and the plants were suitable for the quite precise research. The different inoculation

收稿日期: 2007-03-27 **作者简介:** 彭珊(1980-), 女, 硕士; * 通讯作者, Lihui@mail. tsingha. edu. cn

基金项目: 石河子大学博士基金项目(5006-822022); 省部共建兵团绿洲生态农业重点实验室开放项目(200505); 新疆科技攻关重点项目(200311101)

times(20 min, 30 min, 40 min, 60 min) were also optimized, and the results were showed that the inoculation time lasted for 40 min was the most optimum and got the consistent results with that by field disease plot. Dipping cotton seedling roots cultured in liquid with spore suspension is a rapid, reliable and steady inoculation method for *Verticillium* wilt and/or *Fusarium* wilt of cotton. Presently, improvement of this method is tried to use in the screening of cotton mutant for resistance to *Verticillium* wilt and/or *Fusarium* wilt and in the testing of function for pathogenicity genes.

Key words: cotton; *Fusarium* wilt; *Verticillium* wilt; inoculation method; liquid cultivation

多年的研究和实践表明,选育和利用抗病品种是防治棉花黄萎病和枯萎病两大土传病害的最经济有效的方法。20 世纪 90 年代以来,枯萎病在我国一些棉区得到有效控制的主要原因也正是因为生产上相继选用了一批抗病品种^[1-2]。而抗病品种选育的前提条件是必须具备准确、快速和简便的抗病性鉴定方法。以往鉴定棉花对黄、枯萎病的抗性主要是通过大田病圃鉴定和温室苗期鉴定。田间病圃鉴定是评价新品种抗病特性必须经过的程序,其结果对反映该品种在自然情况下的抗病性具有很好的代表性。但因所需时间长和占据空间多,不适于大批材料的抗病性鉴定,而且受环境条件影响较大,常常会影响鉴定结果的一致性和准确性。此外还受季节限制。目前广为接受和应用的黄、枯萎病苗期鉴定方法也具有一定的局限性。黄萎病目前主要采用纸钵撕底蘸根法、针刺接种法或其它相类似的方法^[3-10]。苗期伤根接种法和不伤根法相比,完成抗病性鉴定所需时间较短,但因很难做到伤根均匀而影响鉴定结果的一致性和准确性;枯萎病主要采用纸钵菌土法^[11]。这种方法不需伤根,但要先花费一定时间在麦粒等基质上繁殖菌种,鉴定结果受土壤拌菌均匀度的影响非常大。由此看来,十分有必要探寻和建立高效、快速、准确的鉴定方法以满足当前棉花黄、枯萎病的抗病性鉴定的需要^[12]。本研究在总结和吸收以往棉花苗期抗黄、枯萎病鉴定方法优点的基础上,与传统的以土壤为基质的方法相对比,研究并建立了一套液体培养棉花的快速、准确的鉴定棉花对黄、枯萎病抗性的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

黄萎病抗病性鉴定采用的棉花品种有:新海 21、新海 23、86-6、唐棉 2 号、鄂荆 1 号、108 夫。枯萎病鉴定采用的是新陆早 7 号(经过枯萎病圃定向筛选 3 年材料)和新陆早 16 号(原始枯萎病

高感材料,经过病圃定向筛选 2 年)。

致病性测定所用棉花黄萎病菌为分离自石河子大学农学院实验站黄萎病圃病株的落叶型 V592 菌株和分离自新疆 83 团棉花病株的非落叶型 V511 菌株;棉花枯萎病 F146 菌株由石河子大学植保温室枯萎病圃发病棉苗上分离得到,为 7 号小种中的强致病力菌株。分离所得菌株经单孢分离后将其孢子悬浮液加入甘油使其终浓度为 15%,于 -80℃ 长期存放。

1.2 水培棉花孢子悬浮液浸根接种法

1.2.1 棉种处理。种子处理方法参考文献[13]。挑选饱满的棉种,用 70% 的酒精浸泡 5 min 后用 5% 的 H₂O₂ 浸泡 2 h,无菌水冲洗 2~3 遍,再用无菌水浸泡催芽 10 h 后平铺在培养皿中保湿,待芽长至 3 cm,种于塑料盒中。

1.2.2 棉苗的种植和培育。在泡沫板上打取直径 2 cm、间距 3 cm 的孔洞,用海绵条缠绕发芽棉子的根芽交界处,塞入泡沫板的孔洞中。将泡沫板置于盛满清水的塑料盒(高 8~10 cm)上,于 25℃ 光照 16 h,黑暗下培养 8 h。待真叶长出时将清水换成 1/3 的 MS 培养液^[14],每周更换一次培养液,1 片真叶展平时接种。

1.2.3 棉苗的接种。将 -80℃ 保存的菌株经 PDA 平板活化 3-4 d,从菌落边缘挑取菌块放入查氏培养液^[15],25℃,220 r·min⁻¹ 摇培 5-6 d,过滤,滤液 5000 g 离心 5 min,弃上清液,清水稀释孢子沉淀,血球计数板计数,将浓度调 1×10⁷ 个孢子·mL⁻¹。将调好浓度的孢子悬浮液加入空塑料盒中,棉苗浸根 40 min 后接种。之后用 1/3 的 MS 培养液 25℃ 光照 16 h,黑暗下继续培养棉苗 8 h。每盒种 12 株苗,每个品种 4 个重复,对照棉苗用清水浸泡 40 min。

1.2.4 病害的调查和统计。棉苗接种后每天观察病害的发生情况,待病情稳定后调查发病率并按以下标准记载发病级别。0 级:无病植株;1 级:0.1%~25% 叶片发病的植株;2 级:25%~50%

叶片发病的植株;3级:50%~75%叶片发病的植株;4级:75%以上叶片发病的植株^[16]。病情指数= $[\sum \text{各级病株数}/(\text{总株数} \times \text{最高病级})] \times 100$ 。最后按全国统一标准^[11]划分棉花品种对黄萎病和枯萎病的抗病类型。

1.3 土培棉花孢子悬浮液灌根接种法

将棉种(处理方法同1.2.1)播种于装有无菌土的直径6 cm、高8 cm的无底塑料营养钵中,每个品种3钵置于1个托盘里。棉苗出苗后,每一营养钵留苗6棵,待1片真叶展平时接菌。接种所用孢子悬浮液的制备同1.2.3,接种时,每钵从上向下灌入30 mL孢子悬浮液,以灌入等量清水的作为对照,接种后2 h将托盘中灌满清水,保持高湿状态48 h,以后常规灌水。一个托盘为一个重复,每接种菌株每品种4个重复。病害调查和统计同1.2.4。

1.4 田间病圃鉴定法

棉花品种抗枯萎病鉴定在石河子大学农学院植病温室枯萎病圃进行,抗黄萎病鉴定在石河子大学农学院实验站黄萎病圃进行,这两个病圃经多年人工接菌,发病均匀。枯萎病圃接种菌为F146菌株,黄萎病圃接种菌为落叶型V592菌株。试验采取随机排列,每个品种播种行长1.4 m(双行),间隔30 cm,10 cm 1穴,每穴播3粒棉种。每个品种2次重复。采用常规田间管理。病情稳定后进行剖秆检查,记载发病率和病情指数,以剖秆检查结果进行品种抗病性划分。记载发病级别标准如下:0级:维管束正常,不变色;1级:维管束变色面积占横截面的25%以下;2级:维管束变色面积占横截面的25%~50%;3级:维管束变色面积占横截面的50%~75%;4级:维管束变色面积占横截面的75%以上^[17]。

2 结果与分析

2.1 不同水培棉花孢子悬浮液浸根接种时间对鉴定结果的影响

对材料鄂荆1号进行不同时间的接种,从表1看出,在所有处理中,棉花均发病,但以孢子悬浮液浸根处理40 min和50 min的结果(包括病情指数和棉花品种的抗病类型)和病圃鉴定的一致,而且这两种处理结果差异不明显。因此,选用40 min作为水培棉花孢子悬浮液浸根接种法的浸根时间。

表1 不同水培棉花孢子悬浮液浸根接种时间对鉴定结果的影响

Table 1 Comparison of different inoculation time on the effect of dipping cotton seedling root cultured in liquid with sporesuspension method

接种方法	病情指数及品种抗性					
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
液体培养浸根	30.91	33.33	47.91	73.73	75.17	83.33
接种	T	T	T	S	S	HS

注:接种菌株为黄萎V592。HS:高感;S:感病;T:耐病;R:抗病;HR:高抗。

2.2 几种接种方法的比较

2.2.1 不同接种方法测定棉花对黄、枯萎病抗病性的对比。对不伤根的3种棉花黄萎病接种方法和2种棉花枯萎病接种方法进行了比较。黄萎病接种选用了本实验室前期室外病圃鉴定对多个棉花黄萎病菌菌株表现抗病(新海23、新海21)、耐病(86-6、唐棉2号)和感病(108夫、鄂荆1号)的品种各两个。经过室内水培棉花孢子悬浮液浸根接种法、土培棉花孢子悬浮液灌根接种法和室外田间病圃鉴定法进行鉴定,结果表明(表2、表3),室内和室外不同接种方法对各品种的抗病性鉴定结果基本一致。对枯萎病的鉴定结果也同样。说明水培棉花孢子悬浮液浸根接种法是能够准确鉴定棉花不同品种对黄、枯萎病抗性的一种方法。剖秆结果还发现,水培棉花孢子悬浮液浸根接种法和土培棉花孢子悬浮液灌根接种法相比,接种更均匀,所有表现抗病不显症的棉株,根颈部附近维管束都有病菌侵染变色的现象存在,对变色部位分离也能得到原接种病原菌,不表现症状只是因为不向上扩展所致。感病植株先从子叶开始表现症状,逐渐向上发展至真叶,严重的最后整株枯死(图1)。

表2 三种接种方法鉴定棉花品种对黄萎病抗性的对比
Table 2 Comparison of three inoculation methods on identification of cotton varieties resistance to *Verticillium wilt*

接种方法	病情指数及品种抗性					
	108夫	鄂荆1号	86-6	唐棉2号	新海23	新海21
液体培养浸根	86.36A	76.73A	47.92A	38.54A	29.17A	21.96A
接种	HS	S	T	T	R	R
土培灌根接种	81.21A	73.14A	42.33B	36.54A	21.00B	16.71B
病圃	86.83A	79.67A	43.20B	35.40A	21.73B	16.87B
	HS	S	T	T	R	HR

注:接种菌株为黄萎V592。表中病情指数后字母表示0.01水平的差异显著性。

2.2.2 不同接种方法所需时间的对比。通过调查发现,采用水培棉花黄萎孢子悬浮液浸根接种法于接种后第7 d棉苗开始发病,15~18 d达到

表 3 两种接种方法鉴定棉花品种对枯萎病抗性的对比
Table 3 Comparison of two inoculation methods on identification of cotton varieties resistance to *Fusarium wilt*

接种方法	病情指数及品种抗性					
	新陆早 7 号			新陆早 16 号		
	原品种	筛选 2 年	筛选 3 年	原品种	筛选 2 年	筛选 3 年
液体培养浸根	75.00	19.40	10.42	68.20	19.00	8.33
接种	HS	T	R	S	T	R
病 圃	71.43	12.50	3.33	67.16	15.33	8.33
	HS	T	HR	S	T	R

注:接种用枯萎菌株为 F146。

发病高峰,其后,随着时间的延长病情也基本不会再继续扩展和加重。因此,这种方法对从棉种进行表面消毒处理到发病情况的调查结束,全程需要大约 30 d。采用土培棉花黄萎孢子悬浮液灌根接种法于接种后第 15 d 开始发病,35-40 d 达到发病高峰,完成整个过程需要 60 d。田间病圃鉴

定法从最初的播种到最后棉花收获时剖秆调查发病率及发病级别则需要 6 个多月的时间。

2.3 水培棉花孢子悬浮液浸根接种法鉴定不同菌株致病力对比

从上述结果看出,水培棉花孢子悬浮液浸根接种法是一种快速、准确的能鉴定和区分棉花不同品种对黄、枯萎病的抗、耐和感病性的十分有效的方法。为了进一步搞清这种方法是否适用于不同致病力菌株的鉴定,又运用这种方法对不同致病力的菌株进行了测定,所用的菌株为强致病力的落叶型 V592 菌株和非落叶型的 V511 及 V166 菌株。从表 4 可以看出,这种方法能较好地对不同致病力的菌株进行区分鉴定。



图 1 水培棉花孢子悬浮液浸根接种法鉴定不同棉花品种对黄、枯萎病的抗病性

Fig. 1 Resistance of cotton varieties to *Verticillium wilt* and *Fusarium wilt* identified by method of dipping cotton seedling root cultured in liquid with spore suspension

表 4 水培棉花孢子悬浮液浸根接种法对比两个棉花黄萎病菌菌株的致病力
Table 4 Comparison of the pathogenicity of different *Verticillium* strains with method of dipping cotton seedling root cultured in liquid with spore suspension

黄萎菌株	病情指数及品种抗病类型					
	108 夫	鄂荆 1 号	86-6	唐棉 2 号	新海 23	新海 21
V592	86.36 HS	76.73 S	47.92 T	38.54 T	29.17 R	21.96 R
V511	50.73 S	52.08 S	41.67 T	30.43 T	16.67 HR	4.17 HR
V166	48.52 T	51.77 S	38.45 T	32.79 T	19.05 HR	7.35 HR

3 讨论

液体培养棉花进行孢子悬浮液浸根接种的方法较其它方法更快速和稳定。这种方法因不伤根,避免了伤根接种方法中因为伤根不均匀造成的发病不均匀,从而影响结果的准确性。避免了土壤拌菌不均匀和土培棉花灌根接种难以保证每株棉花根际病菌量一致的难题。研究中还发现,

这种棉花培养和接种方法除了可单纯用于鉴定棉花品种的抗病性和菌株的致病性外,还适合于棉花抗病性分子生物学研究。与土壤培育的棉花相比,水培棉花根部幼嫩,取样方便,作为起始材料可提取质量和数量较高的 DNA 和 RNA。此外,该方法简便而经济。液体培养免去了大量取土和对土壤进行灭菌的繁琐步骤,1 个月的周期,1/3 的时间采用清水,2/3 的时间采用不包含蔗糖的 1/3 MS 培养液作为培养基质,成本较低。应用不含糖的培养液,可避免杂菌污染对棉花正常生长的干扰,接种规模可根据实验目的灵活变化。但由于棉花枯、黄萎病的最适生长温度在 20~25℃,在高温情况下难以生长,所以该方法适用于能够调控温度的温室中,以避免由于温度的差别造成枯、黄萎病的隐症现象,影响实验的准确性。

黄萎病因在全国主栽棉种——陆地棉中十分缺乏抗病材料,通过常规育种方法很难培育出高抗黄萎病的品种,使得该病 90 年代以来危害日趋严重,目前已成为制约我国棉花生产的突出问

题^[18-19]。在这种局势下,挖掘其它物种的抗黄萎病基因进行生物技术育种,或深入对黄萎病菌进行研究,鉴定其致病相关基因,揭示其致病机制从而为防治棉花黄萎病菌新型杀菌剂的设计和筛选提供靶标,都将为解决棉花黄萎病危害找到新途径^[20-23]。经前人研究证明,建立病原菌的插入突变体库,筛选致病性改变的突变体是鉴定致病性相关基因的一条很有效的途径。但因转化体数量非常多,对其进行致病性鉴定的工作量相应也非常大,因此探索快速、准确的致病性鉴定方法用于该过程更显得十分迫切和必要。目前,已把液体培养棉花孢子悬浮液浸根接种法用于致病力减弱突变体的筛选工作。但因要鉴定转化体数量多,一个月的鉴定周期仍然比较长,因此,正在此基础上进一步探索缩短鉴定周期的子叶期接种方法,并已取得了一定成效(结果未发表)。另外,本实验室正在将此接种方法应用到其它作物的抗病性和病菌致病力鉴定上,比如番茄枯萎病等。

参考文献:

- [1] 顾本康,马 存. 中国棉花抗病育种[M]. 南京:江苏科学技术出版社,1996.
- [2] 石磊岩,孙文姬. 棉花黄萎病苗期鉴定方法[J]. 植物保护,1987,13(1):42.
- [3] 简桂良,孙文姬,马 存. 棉花黄萎病抗性鉴定新方法—无底钵钵菌液浇根法[J]. 棉花学报,2001,13(2):67-69.
- [4] 王省芬,马峙英. 一种新的棉花黄萎病抗性鉴定方法[J]. 棉花学报,2002,14(4):231-233.
- [5] 马 平, Huang H C, 李社增,等. 一种新的棉花黄萎病快速接种技术及其在病原菌致病力和寄主抗病性鉴定上的应用[J]. 植物病理学报,2004,34(6):536-541.
- [6] HUANG H C, Hanna M R. An efficient method to evaluate alfalfa cultivars for resistance to *Verticillium wilt*[J]. Canadian Journal of Plant Science, 1991,71(3): 871-875.
- [7] KENNETH C S, William E G. A root-injection method to assess *Verticillium wilt* resistance of peppermint and its use in identifying resistant somaclones of cv. Black Mitcham[J]. Euphytica, 1999,106(3):223-230.
- [8] RAMSAY J R, Multani D S, Lyon B R. RAPD-PCR identification of *Verticillium dahliae* isolates with differential pathogenicity on cotton[J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1996,47:681-693.
- [9] 李国英,张 莉,孙文姬. 新疆棉花枯萎病菌生理小种的初步研究[J]. 石河子大学学报,1998,2(4):321-326.
- [10] 齐俊生,李怀方. 一种检测棉花黄萎菌毒素致萎性的新方法——叶片针刺涂抹法[J]. 棉花学报,2006,18(4):228-232.
- [11] JIAN G L, Ma C, Zhang C L, et al. Advances in cotton breeding for resistance to *Fusarium* and *Verticillium wilt* in the last fifty years in China[J]. Agricultural Sciences in China, 2003,2(3):280-288.
- [12] 马 存,简桂良,孙文姬. 我国棉花品种抗黄萎病鉴定存在的问题及对策[J]. 棉花学报,1999,11(3):163-166.
- [13] CAITRIONA D, Lain W W, Helen M. Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum* [J]. Molecular plant-Microbe Interaction, 2004,17(6):654-664.
- [14] MURASHIGE T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. Physiologia Plantarum, 1962,15 :473-496.
- [15] COLLINS C H, Taylor C. Microbiological Methods [M]. 2nd Edition. Butterworth & Co Ltd, 1967:120-122.
- [16] 李社增,马 平, Huang H C,等. 相对病情指数划分棉花品种抗病性的统计学基础[J]. 棉花学报,2003,15(6):344-347.
- [17] 房慧勇,张桂寅,马峙英. 转基因抗虫棉抗黄萎病鉴定及黄萎病发生规律[J]. 棉花学报,2003,15(4):210-214.
- [18] 马 存,简桂良. 我国棉花抗黄萎病育种现状、问题和对策[J]. 中国农业科学,1997,30(2):58-64.
- [19] 简桂良,邹亚飞,马 存. 棉花黄萎病连年流行的原因及对策[J]. 中国棉花,2003,30(3):13-14.
- [20] MULLINS E D, Chen X, Romaine P, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer[J]. Phytopathology, 2001,91:173-180.
- [21] DOBINSON K F, Grant S J, Kang S. Cloning and targeted disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* [J]. Current Genetic, 2004,45:104-110.
- [22] MAIER F J, Schafer W. Mutagenesis via insertional or restriction enzyme-mediated integration (REMI) as a tool to tag pathogenicity related genes in plant pathogenic fungi [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 380: 855-864.
- [23] TANAKA A, Shiotani H. Insertional mutagenesis and cloning of genes required for biosynthesis of the host-specific AK-toxin in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata* [J]. Molecular plant-Microbe Interaction, 1999,12:691-702. ●