

棉花多抗病性育种的抗性诱导研究

谭永久, 叶鹏盛, 李琼芳, 曾华兰, 韦树谷

(四川省农业科学院经济作物研究所, 四川简阳 641400)

摘要:采用强致病力菌株,制备成棉子菌粉载菌体和孢子悬浮液,研究不同菌量、不同接菌方法和致病温度,诱导棉花苗期抗枯、黄萎病性的育种新技术。通过4种接种剂量梯度试验表明,棉花苗期诱导抗性的最佳接菌量是 $90\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ 棉子菌粉载菌体,播种前土壤接菌,棉黄萎病菌孢子悬浮液的最佳接菌浓度是 2×10^7 孢子 $\cdot\text{ml}^{-1}$,2片真叶时伤根接菌10 ml,薄膜拱盖提温,20~25℃是诱导发病的最适温度,接菌15~20 d后,淘汰棉枯萎病发病8%以上和棉黄萎病12%以上的品种群体材料,并淘汰抗病群体材料中的感病个体,构建既抗棉枯萎病、又抗棉黄萎病性的多抗病性育种方法。

关键词:棉花;抗病育种;诱导抗性

中图分类号:S562.034 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2005)05-0264-05

Studies on Method of Inducing Cotton Multi-Resistance to Wilt Diseases by Artificial Inoculation in Breeding

TAN Yong-jiu, YE Peng-sheng, LI Qiong-fang, ZENG Hua-lan, WEI Shu-gu

(Industrial Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Science, Jianyang 641400, China)

Abstract: The strong virulence pathogen strains of wilt diseases were cultured in autoclaved cottonseed to make pathogen carrier respectively. *Fusarium oxysporum* f. sp. Vasinfectum was inoculated with cottonseed meal at the dosage of $90\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ in nursery soil before sowing. Then each seedling was inoculated with 10 ml of *Verticillium dahliae* spore suspension at the concentration of 2×10^7 spores per milliliter by watering injured roots at 2 true leaf growth stage. The nursery was covered with polythene film to keep the average bed temperature of 20~25℃. Thus the wilt diseases symptoms would appear on susceptible plant within 15~20 days after inoculation of *Verticillium dahliae* spore suspension. The varieties, of which *Fusarium wilt* disease incidence was over 8% or *Verticillium wilt* was over 12%, and the susceptible plants of resistant variety were eliminated. Then the resistant plants of resistant varieties were selected and transplanted to the field. It had been proved that this method of inducing cotton multi-resistance to wilt diseases by selection with artificial inoculation was effective and practicable. With applying of this method, several cotton resistant varieties had been bred.

Key words: cotton; resistance breeding; induced resistance by selection

诱导抗性是生物界普遍存在的免疫现象,利用病原真菌诱导寄主植物的抗病性,在作物抗病育种中已被广泛应用。我国自20世纪50年代开始研究利用大田病圃选育出我国第一批抗枯萎病

的抗源品种52-128、57-681,60年代后国内又选育出一批抗病品种,如:陕棉4号、陕401、86-1、陕1155、中棉所12、川73-27等在生产上推广应用,有效地控制了棉枯萎病的发生和危害,在一定程

收稿日期:2005-04-12

作者简介:谭永久(1936-),男,研究员

资助项目:国家育种攻关(96-002-02-10-02)、四川省育种攻关(2001-06-01)、国家发展棉花生产专项资金(200012)

度上对棉黄萎病的危害损失也有所减轻。但随着棉花生产的发展,棉枯、黄萎病的发生危害有所加重。棉花育苗移栽和营养钵育苗移栽的推广应用,为缩短选育进程,加强多抗病性育种的抗性选择,利用病原真菌诱导寄主植物抗性的原理,系统研究了棉花多抗病育种的抗性诱导选育最佳条件,加大抗性育种的苗期抗性选择压力,增强多抗病性育种选择的抗性稳定性。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试菌种:棉枯萎病菌(川 F₈)从四川简阳本所内重病地采集、分离纯化获得;棉黄萎病菌(川 V₈)亦从四川简阳本所内重病地采集、分离纯化获得。

供试品种:分别采用不同抗病性类型的品种,抗枯萎病品种川 73-27,感枯萎病品种达棉一号,抗黄萎病品种陕 1155,感黄萎病品种 86-1。

1.2 试验方法

接菌菌种的制备:用采集分离纯化的一代菌种,经浓淘米水加蔗糖 5%、链霉素 500 mg · kg⁻¹ 的培养液,在 25~28℃ 扩大培养后,按 1:10 的

比例接种在经蒸汽高压消毒灭菌的棉子上,在 25~28℃ 培养 15~20 d,然后室内晾干制备作棉子菌载菌体,棉枯萎病菌经粉碎作棉子菌粉接菌载体,棉黄萎病菌在接种前以棉子菌载菌体加水搅拌制备作孢子悬浮液。

接菌方法:以四川推广应用的育苗移栽技术作基础,棉枯萎病菌采用水泥槽内装深层无菌土或露天育苗苗床,接种制备的棉子菌粉载菌体;棉黄萎病又以不同菌量和棉苗不同生育期、采用沾根或伤根灌液接菌。试验均用盖膜保温、提温保湿和喷水以促进发病。

2 结果与分析

2.1 不同接菌量与诱导发病

采用 4 种不同接菌量,分别对棉枯萎病、棉黄萎病进行苗期诱导发病。对棉枯萎病是在棉种育苗时将制备的棉枯萎病棉子菌粉撒于土表,均匀接菌后灌水播种,试验重复 3 次。棉种出苗后 20 d 调查,结果以 90 g · m⁻² 菌粉的接菌量最佳,有利诱导发病(表 1)。菌量过高发病指数反而降低,菌量过低达不到有效诱导发病的目的,对苗期的抗性诱导选择没有效果。

表 1 不同接菌量棉枯萎病的发病情况

Table 1 Disease indexes of *Fusarium wilt* at different cottonseed meal dosages inoculated

接菌量 /(g · m ⁻²)	出苗至初发病历期 /d	枯萎病指数	
		达棉一号	川 73-27
9	11	55.3	11.4
45	7	93.3	29.8
90	9	84.7	30.1
250	9	96.2	27.9

对棉黄萎病接菌浓度试验是在无菌土中育苗,出苗后 2 片真叶时采用 4 种孢子悬浮液菌浓度,即 1×10⁷ 孢子 · ml⁻¹、2×10⁷ 孢子 · ml⁻¹、4×10⁷ 孢子 · ml⁻¹、8×10⁷ 孢子 · ml⁻¹, 每苗浸沾菌液 10 ml, 20 d 后调查病情结果(表 2)。4 种接菌

孢子浓度处理的发病均较充分,但以 1×10⁷ 孢子 · ml⁻¹、2×10⁷ 孢子 · ml⁻¹ 的接菌浓度对苗期诱导棉黄萎病效果最佳。接菌浓度过高则发病偏重,对品种的抗病性选择不利。

表 2 不同接菌浓度棉黄萎病的发病情况

Table 2 Disease indexes of *Verticillium wilt* at different spore suspension concentrations inoculated

接菌浓度 /(孢子 · ml ⁻¹)	黄萎病指数		
	86-1	川 73-27	陕 1155
1×10 ⁷	40.2	21.0	10.5
2×10 ⁷	43.5	23.6	11.5
4×10 ⁷	45.4	26.9	18.9
8×10 ⁷	71.2	24.0	19.5

2.2 接菌方法与诱导发病

接菌方法对诱导苗期的多抗性选择影响较

大,在苗期既要进行抗枯萎病诱导选择,同时又要进行抗棉黄萎病筛选。因此通过适宜的接菌方法

诱导苗期发病,同时进行两病的筛选至关重要。棉枯萎病接菌试验采用 $90 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 棉子菌粉,分土壤和灌苗接菌两个处理,供试品种达棉一号(表

3)。结果以播种前土壤接菌效果最佳,出苗后 10 d 初见病症,20 d 达发病高峰,有利于苗期抗枯萎病性选择。

表 3 棉枯萎病不同接菌方法的发病情况

Table 3 Disease incidence of *Fusarium wilt* at different inoculating methods

接菌方法	出苗至初发病历期 /d	出苗后 10 d		出苗后 20 d	
		发病率/%	枯萎病指	发病率/%	枯萎病指
土壤接菌	10	32.5	18.6	85.7	63.2
灌苗接菌	18	28.3	11.4	72.3	54.3

棉黄萎病接菌试验是在棉苗 2 片真叶期,采用 2×10^7 孢子 $\cdot \text{ml}^{-1}$ 孢子悬浮液进行伤根灌苗、针刺接种和灌根接菌三个处理,供试品种 86-1 和

陕 1155(表 4)。结果表明,伤根接菌的诱导发病效果较好,虽然针刺接种诱导的发病效果亦好,但棉苗茎小不易针刺操作。

表 4 棉黄萎病不同接菌方法的病指

Table 4 Disease indexes of *Verticillium wilt* at different inoculating methods

接菌方法	86-1		陕 1155	
	接菌后 15 d	接菌后 25 d	接菌后 15 d	接菌后 25 d
伤根接菌	25.3	43.5	7.9	14.2
针刺接菌	32.6	56.7	17.3	26.3
灌根接菌	15.7	20.3	6.3	9.6

棉黄萎病接种期试验设置在三个苗龄期伤根接菌处理棉苗,供试品种 86-1、陕 1155 试验(表 5)。结果表明不同苗龄接菌后,诱导的发病程度

差异显著,以 2 片真叶期接菌的诱导发病效果最佳,1 片真叶期接菌诱导发病偏重,3~4 片真叶期接菌诱导发病效果略差。

表 5 棉黄萎病不同接菌期的发病情况

Table 5 Disease indexes of *Verticillium wilt* at different inoculating stages

接菌期	棉苗龄期 /d	黄萎病指	
		86-1	陕 1155
1 片真叶期	7	45.3	18.4
2 片真叶期	13	35.6	14.9
3~4 片真叶期	22	30.6	14.9

2.3 温度对诱导发病的影响

温度是诱导发病的主要因素。试验设置在接菌的水泥槽中,供试品种为感枯萎病品种达棉一号、感黄萎病品种 86-1。土壤先接种棉枯萎病菌 $90 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 、分 4 批于 3 月 26 日、4 月 5 日、4 月 15 日及 4 月 25 日播种,盖膜保温后的土壤温度分别为 18.4°C 、 19.2°C 、 23.4°C 、 25.0°C 。待棉苗 2 片真叶时采用伤根法接种棉黄萎病菌,每苗灌 $2 \times$

10^7 孢子 $\cdot \text{ml}^{-1}$ 孢子悬浮液 10 ml,盖膜保温。结果表明,在保持土壤湿度 $60\% \sim 70\%$ 、日平均土壤温度 $20 \sim 23^\circ\text{C}$ 时,有利于诱导棉枯萎病发生,感病品种达棉一号发病率达 80% 以上,病情指数 60 以上。棉黄萎病在土温 $22 \sim 26.8^\circ\text{C}$ 诱导发病最好,土温低于 20°C 发病缓慢,达不到诱导筛选的要求(表 6)。

表 6 温度对棉枯、黄萎病发生的影响

Table 6 The influence of temperatures to *Fusarium wilt* and *Verticillium wilt*

枯萎病			黄萎病			
土温/ $^\circ\text{C}$	发病率/%	病指	床温/ $^\circ\text{C}$	土温/ $^\circ\text{C}$	发病率/%	病指
18.4	68.7	34.5	17.6	19.5	18.6	6.5
19.2	86.5	68.2	21.9	22.8	68.8	33.6
23.4	98.2	75.6	24.9	26.8	76.3	36.5
25.0	91.6	68.2				

从 1986—1988 年棉花育苗期间,苗床盖膜与露地育苗的温度变化分析,盖膜比露地育苗的床温增高 4.5~5.2℃,一般达 22~26℃,高达 28~32℃,使土温增高 0.6~1.9℃,一般达 20.3~

24℃(表 7)。利用春季棉花育苗期间的自然气温,采用薄膜拱盖的办法提高床温,能创出诱导棉枯、黄萎病发生的适宜温度。

表 7 苗床盖膜对温度的调节效应

Table 7 Comparison of temperatures between polythene film covered and uncovered nursery

年份	日期/(月-日)	调温方式	床温/℃	土温/℃
1986	04-03~05-10	盖膜	22.6±5.2	20.4±6.7
		露地	17.4±5.3	19.9±6.3
1987	04-06~05-08	盖膜	23.1±5.4	23.0±4.3
		露地	18.6±6.9	21.1±4.7
1988	04-04~05-02	盖膜	21.4±5.1	22.8±4.4
		露地	18.3±7.4	21.8±5.4

2.4 多抗病育种抗性诱导筛选技术的构建及应用

通过以上试验研究,建立了棉花多抗病育种抗性诱导筛选技术(图 1)。棉枯萎病棉子菌载菌体的制备是采用强致病力的棉枯萎病菌菌株,接种在灭菌的液体培养基中,于 25~28℃振荡培养 5 d 后,按 1:10 将菌液接种到灭菌的棉子上,于 25~28℃培养 15 d 后,晾干粉碎制成棉子菌载菌体。棉黄萎病菌孢子接菌液的制备是采用强致病力的棉黄萎病菌菌株,制备成棉子菌载菌体后,

用清水搓洗,制备成孢子悬浮液。诱导接菌方法,棉枯萎病采用棉子粉载菌体在播种前土壤接种 90 g·m⁻²,棉黄萎病采用 2×10⁷ 孢子·ml⁻¹ 的孢子悬浮液,在棉苗 2 片真叶期伤根灌苗接菌,拱盖薄膜保温 20~25℃,创造适宜发病环境。抗病性诱导筛选是待棉枯、黄萎病发病后,通过调查淘汰棉枯萎病发病率 8% 以上,或者棉黄萎病发病率 12% 以上的品系材料,并淘汰抗病材料中的感病个体,选择抗病株或抗病品系材料。

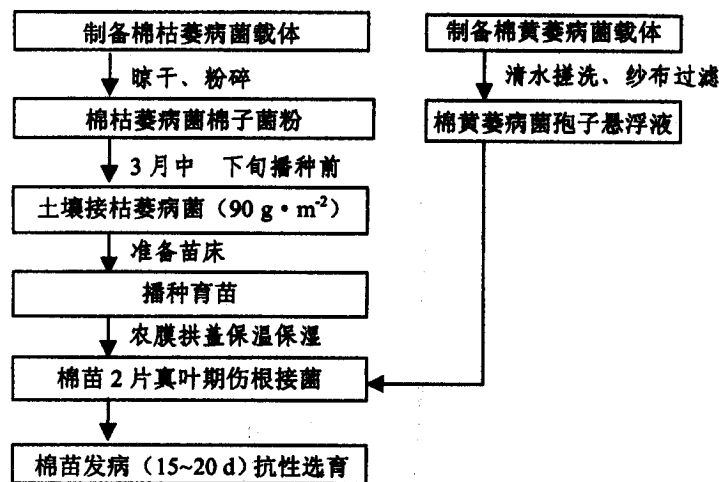


图 1 棉花多抗病诱导筛选方法示意图

Fig. 1 Selection method of cotton multi-resistance to wilt diseases

1988—2003 年利用本项育种技术对 8007 个抗病育种株行材料进行多抗病性诱导筛选,结果棉枯萎病发病率 1.5%~56.7%,群体淘汰率 8.8%,棉

黄萎病发病率 0.2%~25.8%,群体淘汰率 66.0% (表 8)。选育成的品种在全国区试、国家攻关联试和省区试中,均表现抗枯、黄萎病(表 9)。

表 8 历年在病床中抗病性诱导筛选的成效

Table 8 Wilt diseases incidences and eliminated percentages of varieties in breeding practice from 1988 to 2003

年份	株行数	棉枯萎病		棉黄萎病	
		发病率/%	淘汰率/%	发病率/%	淘汰率/%
1988—1990	1624	2.3~56.7	12.3	0.5~24.3	8.5
1991—1995	2582	1.5~37.6	7.4	0.4~25.8	6.8
1996—2000	2446	8.2~33.9	9.7	0.2~19.3	6.7
2001—2003	1335	3.4~21.3	6.6	0.4~11.3	4.5

表 9 通过诱导筛选育成的抗病品种

Table 9 Performance of resistant varieties bred by the inducing in state or provincial tests

品名	试验类型	年份	病情指数		抗性评价
			棉枯萎病	棉黄萎病	
2783	国家攻关联试	1987		14.8	抗黄萎病
2789	国家攻关联试	1988	4.5	27.2	高抗枯萎病、抗黄萎病
川棉 243	长江流域国家区试	1998	3.7	26.3	高抗枯萎病、抗黄萎病
川棉 243	四川省区试	1993	6.6	25.0	高抗枯萎病、抗黄萎病
川棉 239	长江流域国家区试	1995	4.4	18.8	高抗枯萎病、抗黄萎病
川棉 65	四川省区试	1998	4.9	18.5	高抗枯萎病、抗黄萎病
99-1890	四川省区试	2002	3.1	13.8	高抗枯萎病、抗黄萎病
99-1892	四川省区试	2002	5.1	17.8	高抗枯萎病、抗黄萎病

3 结论和讨论

抗性选择是棉花抗病育种的关键,诱导抗性是抗性选择的重要手段。在抗性诱导中,品种、病菌及致病环境对诱导抗性具有重要的作用。采用致病力强菌株、土壤接棉枯萎病棉子粉载菌体 $90 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 及 2 片真叶期伤根接棉黄萎病菌 2×10^7 孢子 $\cdot \text{ml}^{-1}$ 孢子悬浮液 10 ml,薄膜拱盖提温,创造 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 的适宜发病环境。按棉枯萎病发病率 8% 及棉黄萎病发病率 12% 淘汰感病群体和感病个体,这种构建的苗期诱导抗性的新方法,增强抗性筛选规模和选择压力,可同时诱导筛选抗枯、黄萎病性,选择出抗病品系和抗病个体移栽入大田病圃,再次进行抗病性筛选,一年内可以进行两次筛选,显著加快选育进程,突破了遗传抗病筛选方法规模小和一年只能筛选一次的局限。

参考文献:

- [1] 沈其益. 棉花病害基础研究与防治[M]. 北京:科学出版社,1992.
- [2] 方仲达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998. 37-74.
- [3] 谭永久,徐富有. 棉花品种抗枯萎病性苗期鉴定方法的研究[J]. 植物病理学报,1980,10(2):41-48.
- [4] 牛玉兰. 棉花抗黄萎病品种苗期鉴定方法研究[J]. 中国棉花,1987,14(1)37-38.
- [5] BUGBEE W M, Sappenfield W P. Varietal reaction of cotton after stem or root inoculation *Fusarium wilt oxysporum* f. sp. *vasinfectum* [J]. Phytopathology, 1968, 58(2): 212-214.
- [6] GARBER R H, Presley J T. Reaction of air temperature to development of *Verticillium* wilt on cotton in the field[J]. Phytopathology, 1971, 61: 204-207.