

湖南省农业技术规程

HNZ088-2015

棉花黄萎病抗性评价技术规程

Technical regulations for evaluating resistance of cotton to
verticillium wilt

湖南省农业农村厅发布

发布日期：2015年12月31日

棉花黄萎病抗性评价技术规程

为规范棉花抗黄萎病资源的筛选和品种选育，制订本规程。

1 棉花黄萎病症状及病原菌特性

1.1 症状

在温室和人工病圃中，2~4片真叶期的棉苗即开始发病。苗期的症状是病叶边缘开始褪绿发软，呈失水状，叶脉间出现不规则淡黄色病斑，病斑逐渐扩大，变褐干枯，维管束明显变色。

在自然条件下，棉花现蕾以后才逐渐发病，一般在7、8月开花结铃期发病达到高峰。近年来，其症状呈多样化的趋势，常见的有：病株由下部叶片开始发病，逐渐向上发展，病叶边缘稍向上卷曲，叶脉间产生淡黄色不规则的斑块，叶脉附近仍保持绿色，呈掌状花斑，类似花西瓜皮状；有时，叶片叶脉间出现紫红色失水萎蔫不规则的斑块，斑块逐渐扩大，变成褐色枯斑，甚至整个叶片枯焦，脱落成光秆；有时，在病株的茎部或落叶的叶腋里，可发出赘芽和枝叶。黄萎病株一般并不矮缩，还能结少量棉桃，但早期发病的重病株有时也变得较矮小。夏季暴雨后，有些病株常发生一种急性型黄萎症状，先是棉叶呈水烫样，继则突然萎垂，迅速脱落成光秆（见附件1）。

1.2 病原菌特性

在我国，棉花黄萎病菌主要为大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb)，该菌属于真菌界(Fungi)，半知菌亚门(Deuteromycotina)，丝孢纲(Hyphomycetes)，丝孢目(Hyphomycetales)，淡色孢科(Moniliaceae)，轮枝菌属(*Verticillium*)。

棉花黄萎病菌分生孢子，呈椭圆形，单细胞，大小为 $4.0\sim 11.0\times 1.7\sim 4.2\mu\text{m}$ ，由分生孢子梗上的瓶梗末端逐个割裂。空气干燥时，孢子在瓶梗末端聚集成堆，空气湿润时，则形成孢子球。显微镜下制片观察时，孢子即散开，只留下梗端新生出的单个孢子。

病菌分生孢子梗常由2~4轮生瓶梗及上部的顶枝构成，基部略膨大、透明，每轮层有瓶梗1~7根，通常有3~5根，瓶梗长度为 $13\sim 18\mu\text{m}$ ，轮层间的距离为 $30\sim 38\mu\text{m}$ ，4层的为 $250\sim 300\mu\text{m}$ （见附件1）。

2 病原菌培养

2.1 培养基本设备和培养基

2.1.1 基本设备

显微镜、恒温培养箱、恒温震荡培养箱、超净工作台、高压灭菌锅、冰箱、烘箱、塑料盆、铝锅、培养皿、三角瓶、试管、剪刀、烧杯、酒精灯等。

2.1.2 培养基

2.1.2.1 马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）

马铃薯 200 g，葡萄糖 18 g，琼脂粉 12 g，蒸馏水 1000 mL。将马铃薯洗净后去皮，称量 200 g 切块，加水适量煮沸 20-30 min，用纱布过滤后，滤液中加入葡萄糖和琼脂继续加热搅匀，稍冷却后加水补足 1000 mL，分装到锥形瓶，封口膜包扎后 120℃ 灭菌 20 min。

2.1.2.2 查比克（Czapek）培养基

NaNO₃ 2.00 g，K₂HPO₄ 1.00 g，KCl 0.50 g，MgSO₄·7H₂O 0.50 g，FeSO₄ 0.01 g，蔗糖 30.00 g，加水定容至 1000 mL（注：K₂HPO₄ 溶解灭菌后再加入培养基）。

2.2 病原菌培养

2.2.1 病原菌的分离及鉴定

采集湖南主产棉区（鼎城、汉寿、临澧、澧县、南县、安乡、华容、君山、桃源）发病典型的病株，采用常规组织分离法于室内分离黄萎病菌，病原菌培养使用 PDA 培养基。经形态学鉴定和分子生物学鉴定确认为大丽轮枝菌后，进行单孢纯化和致病力测定，之后扩繁备用。抗病性鉴定接种应选择感病鉴别寄主病情指数大于 50.0 的菌种。

棉花黄萎病菌分离、单孢纯化和分子生物学鉴定方法见附件 2。

2.2.2 病原菌的保存

分离纯化的病原菌菌块加入 20% 的甘油，于超低温冰箱保存。

3 棉花黄萎病病圃的建立

3.1 病原物接种体制备

在超净工作台上，从 PDA 培养基上活化好的菌落边缘挑取 2mm² 新鲜菌块，接种到查比克培养基中，置于 25℃，150r/min，黑暗培养一周，备用。

菌种培养物采用棉籽或玉米沙粒培养。棉籽培养方法：先将棉籽用水煮涨，沥干水分，装入广口瓶或聚丙烯袋中，高压湿热灭菌 20min；玉米沙粒培养方法：将购买的玉米糝和晒干的河沙按质量比 1:1 混合均匀，加入适量的水，装入克氏瓶或聚丙烯袋中，高压湿热灭菌 20min。将查比克液体培养基中培养好的黄萎病菌孢子液 15 mL(孢子浓度为 1.0×10⁷ 个孢子/ mL)接入已灭菌的棉籽或玉米沙粒培养基中，随后置于 25℃ 恒温箱中培养 7~10 d，待黄萎病菌的菌丝布满后，将培养物掏出，风干，用于病圃土壤接菌。

3.2 病圃的要求

人工病圃用地应地势平坦、肥力均匀、排灌方便和土质优良，要求发病均匀，感病对照的病情指数能达到 35.0 以上。可通过适当的浇水，增加湿度、降低温度来控制病圃发病情况。

3.3 病圃的建立

按每公顷 450 Kg 的接种量，将布满菌丝的菌种均匀地施入田间，再翻耕 2~3 遍，使病菌与土壤混合均匀。病圃建立后，可根据当年的发病情况将当年的病棉杆压碎进行回接。

4 棉花品种（系）抗黄萎病性鉴定

4.1 对照品种选择

鉴定中使用中植棉 2 号为抗病对照，冀棉 11 号为感病对照。对照品种要在无病地繁殖，以减缓其抗性变异，最好能一次繁殖，冷库保存，多年使用。

4.2 棉花品种（系）种植方法

棉花品种（系）种植在人工病圃中，每品种（系）3 次重复，每重复 2 行区，行长 5 米，留苗 50 棵；按棉花正常的播种时间和田间管理方式进行种植。

4.3 播种后管理

播种后进行精心管理，苗期应注意防治炭疽病、立枯病、蜗牛、地下害虫等病虫害。应注意保持田间的湿度，以利于黄萎病的发生。避免施用对黄萎病发生有影响的药剂。

5 发病调查

5.1 田间发病调查与记载

随时监测感病对照的发病情况，在感病对照病情指数达 35.0 以上，应开始全面逐株调查，10~15d 调查一次，按规定逐株记载病情级别（8 月底 9 月初调查时注意区分黄萎病和早衰），调查记载表见附件 3。

5.2 调查分级标准

调查采用 5 级分级法，各病级分级标准如下：

- 0 级 棉株健康，无病叶，生长正常。
- 1 级 棉株三分之一以下叶片表现病状。
- 2 级 棉株三分之一以上，三分之二以下叶片表现病状。
- 3 级 棉株三分之二以上叶片表现病状，未枯死。。
- 4 级 棉株枯死。

6 调查结果的统计

根据调查的结果计算各时期各品种（系）的病株率、病情指数和相对病情指数。具体统计方法如下：

6.1 病株率 (R_i)

$$R_i = \frac{n_i}{n_t} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

n_i ——发病株数

n_t ——调查总株数

计算结果精确到小数点后 1 位。

6.2 病情指数 (DI)

$$DI = \frac{\sum(d_i \times n_i)}{n_t \times 4} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

d_c ——相应病级；

n_c ——各病级病株数；

n_t ——总株数。

计算结果精确到小数点后 1 位。

6.3 相对病情指数（RDI）

感病对照病情指数在 35.1~65.0 之间可采用相对病情指数。

$$K = \frac{50.0}{n_{t-ck}} \dots\dots\dots (3)$$

$$RDI = DI \times K \dots\dots\dots (4)$$

式中：

K——矫正系数；

50.0——感病对照标准病情指数；

DI_{ck} ——本次鉴定感病对照病情指数；

DI ——被鉴定材料病情指数。

计算结果精确到小数点后 1 位。

7 抗病性评价

根据被鉴定品种（系）不同时期相对病情指数的平均值大小评定品种的抗性级别，各级别评定标准见附件 4。

8 技术术语

病情指数：病情指数是全面考核发病率与严重度的综合指标。

9 引用和参考资料

GB/T 22101.5 棉花抗病虫性评价技术规范 第 5 部分：黄萎病

《棉花枯萎病和黄萎病的研究》中国农业出版社，2007 年

《植病研究方法》中国农业出版社，1998 年

编号单位：湖南省棉花科学研究所

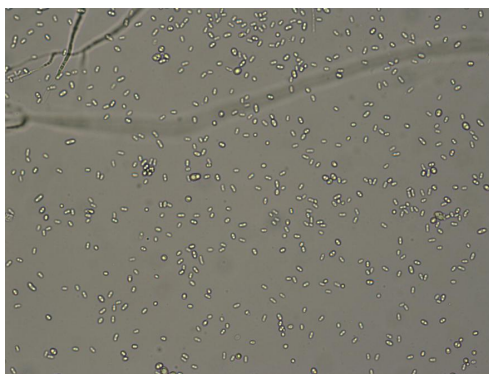
编写人员：李彩红 张志刚 赵瑞元 蒋杰 贺云新 梅正鼎 肖才升 李玉芳

HNZ088-2015

附件 1



1.1 棉花黄萎病田间症状



1.2 大丽轮枝菌菌丝和孢子形态

附件 2

棉花黄萎病菌分离、单孢纯化和分子生物学鉴定方法

2.1 棉花黄萎病病原菌的分离

采集湖南各主产棉区病株，分离枯萎病菌，具体步骤如下：

- a) 将从棉花病株上采集的病秆剪成约 4 cm 左右的小段，去掉表皮，放入 70%的酒精中浸泡 3-5 s;
- b) 置于次氯酸钠中浸泡 1 min，用灭菌的蒸馏水清洗 3 次，剪成 3 mm 的小块茎；
- c) 将小块茎置于 PDA 培养基上，25℃培养箱中培养。

2.2 分离病原菌单孢纯化

- a) 取分离的病原菌菌块到离心管中，加入灭菌蒸馏水洗孢子，并用血细胞计数板查孢子数；
- b) 计算孢子浓度，并将孢子液稀释到浓度为 100 个孢子/100 μ L；
- c) 吸取 100 μ L 稀释的孢子液涂布于 PDA 平板上，置于 25℃培养箱中培养 30 h；
- d) 用体式显微镜观察孢子萌发情况（培养皿底朝上），用记号笔圈住已萌发的孢子，萌发的孢子周围应无其它孢子；
- e) 用打孔器对准记号笔画的圆圈打孔，挑取菌饼到 PDA 平板上，置于 25℃培养箱中培养；
- f) 待菌落长到一定程度时，镜检确认，并保存。

2.3 病原菌分子生物学鉴定方法

2.3.1 基因组 DNA 提取方法

基因组 DNA 提取采用 CTAB 法，参考 Sambrook 等（1989）。具体步骤如下：

- a) 称取 0.2g 菌丝在液氮中研磨成粉末（研磨充分，至少 3 次），转入 1ml 65℃预热的抽提缓冲液 CTAB，颠倒混匀，65℃温预 15min，中间混匀两次；
- b) 加入等体积的氯仿混匀，12000rpm 离心 15min。
- c) 取上清，再加入等体积氯仿再抽提一次；12000rpm 离心 15min。
- d) 取上清加入 1/10 体积 3M 醋酸钠溶液轻轻混匀，再加入 0.6 倍体积的异丙醇，静置 30min，12000rpm 4℃离心 15min。
- e) 弃上清，沉淀用 70%乙醇洗两遍，置 37℃温箱干燥后，30ul 灭菌去离子水溶解，-20℃保存。

2.3.2 PCR 检测

利用大丽轮枝菌特异性引物（zhu1/zhu2）对菌株进行 PCR 扩增，扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，根据能否扩增出目的大小的片段来判断这些菌株是否为大丽轮枝菌。引物序列见表 1。

表 1 大丽轮枝菌特异性引物

引物名称	序列	片段大小 (bp)
Zhu1	5'-CATCAGTCTCTCTGTTTATACCAACG-3'	324
Zhu2	5'-CGATGCGAGCTGTAATACTACTACGCAA-3'	

表 2 PCR 扩增反应体系

成分	用量 (μL)
10×Taq buffer buffer(Mg ²⁺ pLus)	2.5
dNTP Mixture(各 2.5mM)	2
Zhu1 (10μmol/L)	1
Zhu2 (10μmol/L)	1
Taq DNA PoLymerase	1U
DNA 模板	1
ddH ₂ O	至 20

PCR 扩增程序为：95℃预变性 5min；94℃变性 1 min，51℃退火 50 sec，72℃延伸 1 min 共 35 个循环；最后 72℃延伸 10 min，4℃保温。

附件 3:

棉花品种抗黄萎病性鉴定调查记载表

调查方法: ☐外部症状调查 ☐剖杆调查 调查地点: 调查日期: 年 月

日

品种 编号	各级病株数					总株 数	病株 率/%	病情 指数	相对 病情 指数	备注
	0	1	2	3	4					

鉴定人:

年 月 日

校核人:

年 月 日

审核人:

年 月 日

HNZ088-2015

附件 4:

棉花品种抗黄萎病性评定标准

级别	抗性类型	英文缩写	相对病情指数标准
1	免疫	I	0
2	高抗	HR	0~10.0
3	抗病	R	10.1~20.0
4	耐病	T	20.1~35.0
5	感病	S	>35.0

附件 5

剖杆调查各病级分级标准：

- 0 级 棉株健康，茎秆木质部无病变症状。
- 1 级 茎秆木质部浅褐色病变部分高度占棉株高度 25%以下。
- 2 级 茎秆木质部浅褐色病变部分高度占棉株高度 26%~50%。
- 3 级 茎秆木质部浅褐色病变部分高度占棉株高度 51%~75%。
- 4 级 茎秆木质部浅褐色病变部分高度占棉株高度 76%以上。

棉花拔秆时进行剖杆调查，剖杆调查时间不晚于 11 月 20 日，剖杆结果暂不用于对鉴定材料的抗性评价，结果仅供参考。
