

# 湖南省农业技术规程

HNZ089-2015

---

## 棉花枯萎病抗性室内评价技术规程

Technical regulations for indoor evaluating resistance of cotton  
to fusarium wilt disease

湖南省农业农村厅发布

发布日期：2015年12月31日

# 棉花枯萎病抗性室内评价技术规程

为规范棉花抗枯萎病资源的筛选和品种选育，制订本规程。

## 1. 病原菌特性

棉花枯萎病菌为尖镰孢萎蔫专化型[*Fusarium oxysporum* Schlechtend:Fr. f.sp. *vasinfectum* (Atk.) W.C.Snyd.&H.N.Hans.]，根据 1995 年出版的新的分类系统为半知菌亚门（Deuteromycotina），肉座菌目（Hypocreales）[丝孢目（Moniliales）]，瘤座孢科（Tuberculariaceae），镰刀菌属（*Fusarium* Link），美丽组（*elegans* Wr.），尖孢种（*oxysporum* Schl.）。

棉花枯萎病菌在 PDA 培养基上，菌丝为白色，若培养时间稍长培养基经常出现紫色，菌丝体透明，有分隔。具有 3 种类型孢子，分别为大型分生孢子，小孢子和厚垣孢子（附件 1）。

大型分生孢子着生在复杂而又有分枝的分生孢子梗或瘤状的孢子座上，通常具有 3~5 个分隔，呈镰刀形至纺锤形，椭圆形弯曲基部有小柄，两端尖，顶端成钩状，有的呈啄状弯曲，壁薄。其中以 3 个分隔的为常见，大小为  $2.6\sim 4.1\mu\text{m}\times 22.8\sim 38.4$  ( $3\sim 4.5\mu\text{m}\times 40\sim 50\mu\text{m}$ )  $\mu\text{m}$ ，黄褐色至橙色。

小型分生孢子多数为单胞，少数有 1 个分隔，通常为卵形，有时为椭圆形、倒卵形、肾形，甚至柱形，大小为  $5\sim 12\mu\text{m}\times 2.2\sim 3.5\mu\text{m}$ ，通常着生于菌丝侧面的分生孢子梗上，聚集成假头状。

厚垣孢子通常单生，有时双生，多数在老熟的菌丝体上顶端和间生形成，有时亦可生于大型分生孢子上，表面光滑，偶有粗糙，球形至卵圆形，浅黄至黄褐色。

## 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、试管、剪刀、锥形瓶、烧杯、酒精灯等。

#### 2.1.2 培养基制备

##### 2.1.2.1 马铃薯葡萄糖琼胶培养基（PDA）

马铃薯 200 g，葡萄糖 18 g，琼脂粉 12 g，蒸馏水 1000 mL，pH 值自然。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

$\text{NaNO}_3$  2.00 g， $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.00 g，KCl 0.50 g， $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.50 g， $\text{FeSO}_4$  0.01 g，蔗糖

30.00 g, 加水定容至 1000 mL (注:  $K_2HPO_4$  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

采集湖南各主产棉区(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枯萎病菌, 经形态学和分子生物学鉴定确认为尖镰孢萎蔫专化型后, 进行单孢纯化和致病力测定, 之后扩繁保存备用。抗病性鉴定接种应选择当地致病力强的菌种。

棉花枯萎病菌分离、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 室内抗性鉴定方法

### 3.1 病土制备

#### 3.1.1 病原菌接种体制备

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

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 20 min; 将查比克液体培养基中培养好的枯萎病菌孢子液 15 mL(孢子浓度为  $1.0 \times 10^7$  个孢子/mL)接入已灭菌的玉米沙粒培养基中, 随后置于  $25^\circ C$  恒温箱中培养 7~10 d, 待枯萎病菌的菌丝布满后, 将培养物掏出, 风干, 备用。

#### 3.1.2 鉴定用病土的接菌

用筛过的无病土, 经  $160^\circ C$  干热灭菌, 拌入等体积的河砂。将病菌玉米沙粒培养物按 2% 的比例加入到灭菌土中, 混合均匀, 加入少量水, 堆放 3~5 d 备用。用直径 6 cm, 高 8 cm 的无底纸钵, 将已混均匀的带菌土装入钵中, 至 2/3 高度, 待用。

### 3.2 种植品种

#### 3.2.1 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。

#### 3.2.2 棉花品种(系)种植

鉴定试验于温室进行, 每品种(系)3 次重复, 每重复 10 钵, 每钵留苗 3 棵。

### 3.3 棉苗的管理

温室环境温度控制在  $20 \sim 32^\circ C$  之间, 出苗后土壤相对湿度保持在 60~80%, 光照良好。

#### 4 发病调查

##### 4.1 发病调查与记载

跟踪监测感病对照的发病情况，当感病对照病情指数达到 35.0 以上时，开始调查各品种（系）的枯萎病发生情况，每隔 7~10 d 调查一次，逐株记载病情级别（调查记载表见附件 3）。

##### 4.2 调查分级标准

调查采用 5 级分级法，各病级分级标准如下：

调查分级标准

病级	病情分级标准
0 级	棉株健康，无病叶，生长正常
1 级	棉株 1~2 片子叶变黄萎焉，真叶不显症状
2 级	棉株 2 片子叶和 1 片真叶表现病状
3 级	棉株 2 片子叶及 2 片或 2 片以上真叶表现病状
4 级	棉株所有叶片发病，严重时叶片脱落，顶心枯死

#### 5 调查结果的统计

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

##### 5.1 病株率（ $R_i$ ）

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

式中：

$n_i$ ——发病株数

$n_c$ ——调查总株数

计算结果精确到小数点后 1 位。

##### 5.2 病情指数（DI）

$$DI = \frac{\sum(d_c \times n_c)}{n_c \times 4} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$d_c$ ——相应病级；

$n_c$ ——各病级病株数；

$n_c$ ——总株数。

计算结果精确到小数点后 1 位。

##### 5.3 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。

$$K = \frac{50.0}{DI_{对照}} \dots\dots\dots (3)$$

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

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。

## 6 鉴定结果的评价

根据被鉴定品种（系）的相对病情指数的大小评定其抗性级别，各级别评定标准见附件 4。

## 7 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。

## 8 引用和参考资料

GB/T 22101.4 棉花抗病虫性评价技术规范 第 4 部分：枯萎病

《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

编写单位：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 梅正鼎 贺云新 肖才升 李玉芳

附件 1



棉花枯萎病菌孢子形态

## 附件 2

## 棉花枯萎病菌分离、单孢纯化和分子生物学鉴定方法

### 2.1 棉花枯萎病病原菌的分离

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杆剪成约 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  $\mu$ L；

c) 吸取 100  $\mu$ 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 1ml65℃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，12000rpm4℃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

利用尖孢镰刀菌萎蔫专化型特异性引物（Fov1-Eg-F/Fov1-Eg-R）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棉花枯萎病菌。引物序列见表 1。

表 1 棉花枯萎病菌特异性引物

引物名称	序列	片段大小 (bp)
Fov1-Eg-F	5'-CCACTGTGAGTACTCTCCTCG-3'	438
Fov1-Eg-R	5'-CCCAGGCGTACTTGAAGGAAC-3'	

表 2 PCR 扩增反应体系

成分	用量 ( $\mu\text{L}$ )
10×Taq buffer buffer( $\text{Mg}^{2+}$ pLus)	2.5
dNTP Mixture(各 2.5mM)	2
Fov1-Eg-F5 (10 $\mu\text{mol/L}$ )	1
Fov1-Eg-R (10 $\mu\text{mol/L}$ )	1
Taq DNA PoLymerase	1U
DNA 模板	1
ddH <sub>2</sub> O	至 20

PCR 扩增程序为：95℃预变性 1 min；94℃变性 1 min，53℃退火 1 min，72℃延伸 2 min 共 30 个循环；最后 72℃延伸 10 min，4℃保温。

附件 3

## 棉花品种抗枯萎病性鉴定调查记载表

调查方法：室内苗期调查      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

附件 4:

## 棉花品种抗枯萎病性评定标准

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	0~5.0
3	抗病	R	5.1~10.0
4	耐病	T	10.1~20.0
5	感病	S	>20.0

---