

陆地棉品种和骨干品系黄萎病抗性鉴定

郭宝生, 王凯辉, 刘素恩, 耿军义, 赵存鹏

(河北省农林科学院棉花研究所/农业部黄淮海半干旱区棉花生物学与遗传育种重点实验室, 石家庄 050051)

摘要: 选育和推广抗病品种是防治陆地棉黄萎病的主要措施, 为了早日实现多类型、多区域大面积抗病品种的应用, 本研究选取 107 份遗传背景差异较大的种质, 利用河北省农林科学院棉花研究所小安舍试验站黄萎病圃进行了 3 年黄萎病抗性重复鉴定。鉴定得到抗病品系 8 个, 占 7.5%; 耐病品种(系) 20 个, 占 18.7%。本研究表明, 当前被作为育种亲本的抗病品系还太少, 需要深入开展抗病遗传机制, 以及与其他经济性状协同改良的关系, 为陆地棉抗病育种提供理论指导; 达到抗病或接近抗病水平的大部分品种(系) 来自于海陆野远缘后代, 具有外源基因血统, 证明了远缘杂交是陆地棉黄萎病抗性改良的有效手段。

关键词: 棉花; 黄萎病; 抗性鉴定

Identification of Breeding Germplasm Resistance to Verticillium Wilt in *Gossypium hirsutum* L.

GUO Bao-sheng, WANG Kai-hui, LIU Su-en, GENG Jun-yi, ZHAO Cun-peng

(Cotton Research Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Science/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Cotton in Huanghuaihai Semiarid Area, Ministry of Agriculture, Shijiazhuang 050051)

Abstract: Breeding and application of disease resistant varieties is the preferred method to control Verticillium wilt diseases, which is important to broaden the genetic base of upland cotton for continuous genetic improvement of disease resistance. The objectives of this study were to evaluate 107 upland cotton main breeding germplasm accessions includes introgressed lines from *G. barbadense* identified in *Verticillium dahliae* nursery for three years repeat identification experiments. The results showed that only 8 disease-resistant germplasm were screened, accounted for only 7.5% of 107 accessions. Disease-tolerant cultivars or lines were 20 accessions, were 18.7%. The identified results indicated that it was scarcity of disease resistant germplasm sources could be used as breeding parent at present. So it was necessary to research on disease-resistant genetic mechanism and collaborative improved relations with other economic characters, and provided theoretical guidance for cotton resistance breeding. The analyses suggested that distant hybridization breeding was a powerful way of creation of germplasm resistance to verticillium wilt in upland cotton.

Key words: *Gossypium hirsutum*; Verticillium wilt (*Verticillium dahliae*); resistance identification

陆地棉作为生产上主要的栽培种, 丰产性好、适应性广, 其产量占世界棉花总产量的 90%, 占中国棉花总产量的 98%。棉花黄萎病属于土传性维管束系统病害, 是由大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae* Kleb.) 引起的一种世界性病害^[1], 造成棉花产量损失一般在 10% ~ 20%, 严重时高达 60% 以上, 并且

纤维品质受到较大影响^[2-3]。棉花黄萎病原真菌与寄主在长期协同进化过程中, 致病性不断发生变异, 并向优势毒性小种发展。黄萎病危害棉株的维管束, 目前尚缺乏有效的化学防治药剂, 选育和推广抗黄萎病陆地棉品种还是主要的防治措施^[4]。

抗源是抗病育种的决定因素。陆地棉种对黄萎

收稿日期: 2013-06-07 修回日期: 2013-06-21 网络出版日期: 2014-01-24

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/10.13430/j.cnki.jpgr.2014.02.024.html>

基金项目: 河北省农林科学院发展基金 (A2012070302)

第一作者主要从事棉花分子标记育种研究。E-mail: guobaosheng111@126.com

通信作者: 耿军义, 研究方向为棉花育种。E-mail: gengjunyi66@126.com

病抗性很差,一些野生棉种质资源对黄萎病的抗性达到免疫水平^[5],通过远缘杂交技术,可以实现陆地棉与野生棉染色体片段的交换,将野生棉的有益性状转移到陆地棉中,从根本上解决陆地棉黄萎病抗源严重缺乏的问题。崔荣霞等^[6]通过棉属种间远缘杂交创造出3个抗枯黄萎病且纤维优质的新种质材料中G2、中G3、中G4。3个新种质的黄萎病抗性均达到了抗或高抗级,中G2的性状更为突出,抗黄萎病达抗和高抗级,抗枯萎病达高抗甚至免疫级。崔淑芳等^[7]、郭宝生等^[8-9]以海陆野远缘杂交后代为亲本,在枯黄萎病混生病圃连续多年的定向选择培育出抗枯、黄萎病,丰产性能较好的新品种(系)。肖松华等^[10]对60个远缘杂交棉株系后代进行抗黄萎病鉴定,3个株系对黄萎病的抗性达到高抗水平,3个株系分别来自旱地棉种质渐渗系、异常棉种质渐渗系和雷蒙德氏棉种质渐渗系;9个株系对黄萎病的抗性达到抗病水平,其中4个株系来源于雷蒙德氏棉种质渐渗系,2个来源于辣根棉种质渐渗系,3个是黄褐棉种质渐渗系后代。此外,连续的病圃强化选择,也能获得较好的黄萎病抗性,孙文姬等^[11]在人工黄萎病圃用2个耐黄萎病品种辽1038和79207的无病单株杂交育成抗黄萎病抗源新种质BD18。由于黄萎病菌生理小种不断变化,从而出现许多新的致病类型,早期鉴定的抗性种质材料,随时间的推移抗性可能丧失。本研究旨在对河北省农林科学院棉花研究所育种课题搜集和选育的育种骨干亲本品系以及目前选育推广的品种进行多年黄萎病的鉴定评价,以早日实现多类型、多区域大面积抗病品种的应用。

1 材料与方 法

1.1 材料

遗传背景差异较大的107份种质由河北省农林

科学院棉花研究所提供,其中包括其他单位选育的品种或品系28份,本所自主创新的海陆野杂交后代的高代品系7份(冀1818、冀2658、B₁₁变、矮早丰、资优、冀1316、04-123),陆地棉标准自交系1份(TM-1),感病对照品种1份(鄂荆1号),其余70份为本所搜集和自育的品种及育种骨干品系。

1.2 方法

2009-2011年在河北省农林科学院棉花研究所小安舍试验站黄萎病病圃对107份种质资源进行黄萎病抗性重复鉴定。4行区种植,8月20日左右调查棉花黄萎病发病情况。每个区随机选择1行,调查20株,按照4级分级标准进行单株抗病性鉴定评价,然后计算鉴定种质的黄萎病病情指数(病指)。黄萎病病指 = $(\sum fx)/(n \times 4)$, f 为该级别的株数, x 为相应级别的值(范围从0到4), n 为调查总株数。根据黄萎病病情指数定性鉴定种质的黄萎病抗性,依据李社增等^[12]的划分标准,将鉴定种质分为免疫(I)、高抗(HR)、抗病(R)、耐病(T)、感病(S)、高感(HS)6个等级。

本研究设定了稳定性指数,以评价不同品种(系)黄萎病病指的年际间变化幅度。稳定性指数 = 不同品系年度间黄萎病指标准差/品系平均值年度间黄萎病指标准差。稳定性指数数值越小,说明该品系黄萎病发病年际间差异越小,性状越稳定。

2 结果与分析

2.1 黄萎病抗性水平鉴定

经过3年连续的混生病圃鉴定,鉴定材料之间对黄萎病的抗性差别很大。抗病品种花铃期植株健壮,叶片深绿,蕾铃发育正常;而感病品种生长迟缓,叶片萎蔫脱落,蕾铃发育不良,脱落较多(图1)。说明病圃发病均匀,能够很好地反映不同品系对黄萎病的耐抗能力。



抗病品系 Resistant line

感病品系 Susceptible line

图1 抗、感病材料在黄萎病圃中的表现

Fig. 1 Performance of resistant and susceptible lines in *Verticillium dahliae* nursery

从表 1 可知,黄萎病病指 3 年平均最低为 16.81,最高为 71.50,变异系数达 26.67%。按照黄萎病抗病分级标准,107 份材料中,病指小于 20.0 的抗病品系 8 份,占 7.5%;病指 20.1~35.0 的耐病品种(系)20 份,占 18.7%;病指大于 35.0 的感病品

种 79 份。年度间平均值、标准差和变异系数差异不显著,表明病圃发病一致,3 年鉴定结果稳定,试验误差较小。由于个别种质病情指数处于抗耐临界值,造成按照 3 年平均病指划分的抗病种质多于分年度评价出的抗病种质数。

表 1 107 份棉花品种(系)的黄萎病抗性 3 年鉴定结果

Table 1 Identification result of 107 upland cotton germplasm resistance to *Verticillium wilt* in 3 years

年份 Years	黄萎病病指 <i>Verticillium wilt</i> disease index			标准差 <i>SD</i>	变异系数(%) <i>CV</i>	抗病品系数量 No. of resistant lines	耐病品系数量 No. of tolerant lines	感病品系数量 No. of susceptible lines
	最大值 Max.	最小值 Min.	平均值 Mean					
	2009	78.47	17.21					
2010	69.28	12.80	39.88	10.53	26.41	5	26	76
2011	66.74	18.18	41.52	11.01	26.53	5	23	79
平均值 Mean	71.50	16.81	41.52	10.67	26.67	8	20	79

品系抗黄萎病稳定性分析结果显示(图 2),58 份鉴定种质稳定性系数小于 1.0,说明这些材料年度间对黄萎病的侵染反应差异不大,小于平均标准差;45 份材料稳定性指数大于 1.0 而小于 2.0,说明其抗性年度间存在波动;4 份材料稳定性指数大于 2.0,说明这 4 份材料对黄萎病抗性还很不稳定。稳定性指数可以作为品系改良抗性选择指标,稳定性指数小的材料,靠系谱选择的方法来提高抗性已经不可能,而稳定性指数高的材料,证明该群体抗性还存在变异,可通过系谱选择提高群体抗性。抗病稳定材料的选择为抗性遗传和机理研究提供较好的抗病和感病材料基础。

228、冀 79 系和冀棉 958 等 8 个品系达到抗病水平。而综合性状最好、配合力最高的品系冀 1818 抗性非常接近抗病水平,但是 3 年重复中没有 1 次能达到抗病标准。说明抗病性状与经济性状间的协同改良还存在瓶颈。从系谱分析来看(表 2),达到抗病水平的这些品系基本上都具有海岛棉或者野生棉的血统,渐渗了陆地棉近缘种的优异抗病基因;但并不是所有海陆野远缘后代抗黄萎病能力都强,如 B11 变,虽然其外部形态具有海岛棉、陆地棉和野生棉的一些特点,但是 3 年鉴定结果都感黄萎病,说明在基因重组时,该材料没有转入海岛棉或野生棉的抗病基因片段,可以作为非渐渗抗病基因的对照。

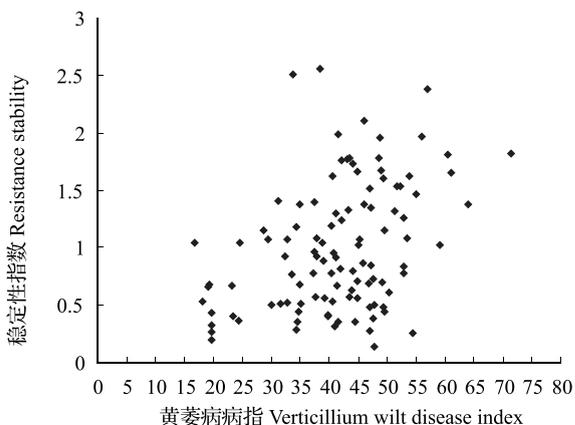


图 2 鉴定种质黄萎病病指与稳定性指数

Fig. 2 *Verticillium wilt* disease index and resistance stability of identified cotton lines

2.2 稳定抗病性的材料分析

本鉴定试验中黄萎病指 20% 以下的抗病品系有冀 2658 系、04-123、矮早丰、冀 1316、资优、冀

3 讨论

本研究对 107 份棉花品种(系)鉴定结果表明,参试材料间黄萎病抗性保持了较大变异,但是年份间变异系数变化不明显,说明鉴定试验病圃发病均匀,年际间发病条件一致。在 3 年重复的鉴定试验中,107 份种质仅筛选出抗病品系 8 个、耐病品种(系)20 份。通过远缘杂交虽然创制了大批抗病资源,有些材料甚至达到高抗水平^[8],但综合性状还不配套,在育种改良过程中还不能直接用于新品种选育,所以未将这些有待于综合改良的品系引入本鉴定试验。本研究鉴定结果表明,目前被用作育种亲本的抗病品系还比较缺乏,需要尽快研究抗病品系抗病性状遗传机制,以及与其他经济性状协同改良的关系,为陆地棉抗病育种提供理论指导。

表 2 抗病品系病指与系谱

Table 2 Pedigree and Verticillium wilt disease index of resistant varieties

品系名称 Line name	系谱 Pedigree	平均病指 Verticillium wilt disease index	稳定性指数 Resistance stability
冀 2658	(海陆 1-1 × 冀棉 10) × [(中棉 12 × 711) × {[(冀邯 5 号 × (岱字 45 × 紫花棉)) × (4086 × 石瑟)] × (182 × 中陆 85-2-1)} × GK12]]	16.81	1.04
04-123	{(93-37 似海型 × 似海鸡脚叶)F ₈ × [(93-37 似海型 × 似海鸡脚叶)F ₄ × (中抗杂 1 + 33 ^B)F ₄ 松散株}F ₅ 抗病单株。其中似海型来源于组合{(C-8017 × [宁细 6153-3 + (910-И × 陆地棉天然杂交种)]} × 7124; 似海鸡脚叶来源于组合{(石短 5 号 × 瑟伯氏棉) × [宁细 6153-3 + (吉扎 70 × 瑟伯氏棉)F ₂]	18.22	0.53
矮早丰	(89-127 × 似海矮)F ₁₃ 株系选。似海矮来源于组合{(C-8017 × [宁细 6153-3 + (910-И × 陆地棉天然杂交种)]} × 7124	19.07	0.66
冀 1316	(中棉 12 × 711) × {[(冀邯 5 号 × (岱字 45 × 紫花棉)) × (4086 × 石瑟)] × (182 × 中陆 85-2-1)} × GK12]	19.34	0.68
资优	{[(海陆 1-1 × 冀棉 10) × 93 辐 56] × [(C-8017 × [宁细 6153-3 + (910-И × 陆地棉天然杂交种)]} × 7124]	19.61	0.27
冀 79 系	(海陆野 96-3 × 402 系)F ₈ 抗病单株后代系选。海陆野 96-3 来源于组合[(黑山 1 号 × 武安中棉) × 吉扎 12)] × 瑟伯氏棉。	19.62	0.20
冀 228	(w112 × 抗单 258-1) 后代系统选育, 双亲具有海陆杂交后代血统	19.69	0.43
冀棉 958	(冀棉 10 号 × 538)F ₁ × 冀棉 22 后代系谱法选育	19.63	0.32

我国从 20 世纪 80 年代到 90 年代初系统鉴定了 5000 多份棉花种质的黄萎病抗性。总的来看, 陆地棉对黄萎病缺乏真正的抗源, 而抗源均为野生棉和海岛棉 (*G. barbadense*)^[5, 13-14]。异常棉 (*G. anomalum*)、斯托提棉 (*G. sturtianum*)、澳洲棉 (*G. australe*)、瑟伯氏棉 (*G. thurberi* Todro)、三裂棉 (*G. trilobum*)、旱地棉 (*G. aridum*)、比克氏棉 (*G. bickii*)、索马里棉 (*G. somalense*)、雷蒙德氏棉 (*G. raimondii* Ulbrich)、黄褐棉 (*G. mustelinum*)、哈克尼西棉 (*G. harknessii*) 对棉花黄萎病免疫, 大部分海岛棉的品种对黄萎病达到高抗或者抗级^[15]。国内外研究人员开展了大量远缘杂交工作, 利用海岛棉、棉属野生种及陆地棉半野生种抗黄萎病基因, 将其转育到陆地棉中, 解决陆地棉抗源缺乏的问题^[16]。本研究鉴定结果证明远缘杂交是陆地棉黄萎病抗性种质创制的重要手段。海岛棉与野生棉具有较好的抗病性, 虽然远缘杂交难度较大, 但是如果能够有效地克服远缘杂交造成的疯狂分离和减少不利基因的干扰, 通过远缘杂交提高陆地棉黄萎病抗性是行之有效的。伴随着分子标记的不断发展和完善, 通过对抗病基因的精细定位, 向陆地棉中渐渗海岛棉、野生棉合理大小的抗性片段, 将有效地提高远缘杂交效率, 缩短育

种年限。本研究鉴定结果也表明, 我国陆地棉抗黄萎病水平不断提高, 各类抗性种质遗传基础在不断丰富, 特别是近年来新审定的冀棉 958^[17]、冀 228^[18]、冀棉 298^[19]、冀 1316^[20] 等一批抗性较好品种得以推广, 标志我国抗黄萎病水平上升到一个新的阶段。

基因工程为棉花黄萎病种质创制提供了新技术手段, 能增强棉花黄萎病抗性的相关基因主要有几丁质酶、 β -1, 3-葡聚糖酶、植物防卫素、葡萄糖氧化酶等外源基因^[21]。利用基因枪法、叶盘法和花粉管通道途径将抗真菌的 β -1, 3-葡聚糖酶基因和几丁质酶基因导入棉花^[22-23], 经 PCR 检验证明目的基因已整合到棉花基因组中。赵丽芬等^[24] 对转 β -1, 3-葡聚糖酶、几丁质酶基因的高代稳定材料进行鉴定比较, 筛选出了 1 份高抗黄萎病材料 KB611 和 1 份抗黄萎病材料 B213-28。肖月华等^[25] 从棉花植株中分离克隆了具有抗病功能的基因 8 个, 改造了抗菌肽基因 1 个, 构建了 23 个单价、双价基因表达载体, 转化棉花获得 212 个转基因植株, 筛选出了高抗黄萎病的棉花种质新材料。利用花粉管通道法和涂抹法导入外源总 DNA 的方法, 乐锦华等^[26] 选育出 2 个棉花抗黄萎病新品系 9451D 和 9456D。Y. Q. Wang

等^[27]向彩色棉中转入过量表达天麻抗真菌蛋白的基因,增强了转基因植株黄萎病的抗性。这些转基因抗病材料的创制,为培育转基因抗病品种奠定了基础。但是由于抗病机制的复杂性,单靠 1~2 个基因的导入效果还不明显。L. Xu 等^[28]采用基于 RNA 测序的转录分析和组织化学分析技术,证明木质素代谢在棉花抵御黄萎病侵染和扩展过程中起到关键作用。从分子生物学的角度揭示了棉花对黄萎病的组织结构抗性。在棉花上先后克隆了应答因子 GbERF1、GbERF2^[29]、Dirigent-like 蛋白类 Gbd1、Gbd2^[30]、应答元件绑定蛋白 EREB1^[31],以及一些黄萎病病程相关基因^[32-33]。在庞大的抗病防御体系中,这些基因的发掘还远远不能揭示棉花对黄萎病的主要抗性机理。但是针对不同病原菌分化类型,开展不同抗源材料抗性遗传机制的深入研究,必将为棉花品种、抗病分子设计育种提供理论支持。

参考文献

- [1] 朱荷琴,冯自力,尹志新,等. 我国棉花黄萎病菌致病力分化及 ISSR 指纹分析[J]. 植物病理学报,2012,42(3):225-235
- [2] 张桂寅,王春芬,赵化冰,等. 我国棉花抗枯黄萎病品种纤维品质遗传改良评价[J]. 植物遗传资源学报,2005,6(1):63-67
- [3] 张桂寅,马峙英,吴立强,等. 陆地棉品种抗黄萎病反应规律的研究[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(6):958-962
- [4] Cai Y F, He X H, Mo J C, et al. Molecular research and genetic engineering of resistance to *Verticillium* wilt in cotton: a review [J]. *African J Biotechnol*, 2009, 8:7363-7372
- [5] 马存,孙文姬,石磊岩,等. 三大棉种对棉花主要病害抗性研究[J]. 植物保护学报,1992,19(1):81-85
- [6] 崔荣霞,王春英,胡绍安,等. 棉花抗黄萎病新种质简介[J]. 中国棉花,1997,24(4):23
- [7] 崔淑芳,李俊兰,金卫平,等. 棉花抗黄萎病种质资源的选育与鉴定[J]. 华北农学报,2006,21(S):180-182
- [8] 郭宝生,韩泽林,耿军义,等. 陆、海、瑟棉花远缘杂交后代的遗传改良[J]. 华北农学报,2007,22(S):85-87
- [9] 郭宝生,刘存敬,刘素恩,等. 棉花种间杂交渐渗系抗黄萎病性状遗传分析[J]. 华北农学报,2008,23(S):240-243
- [10] 肖松华,刘剑光,吴巧娟,等. 高品质抗黄萎病棉花新种质的培育[J]. 中国棉花,2007,34(1):12-14
- [11] 孙文姬,简桂良,马存,等. 抗黄萎病棉花新种质 BD18[J]. 植物保护,1998,24(3):34
- [12] 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
- [13] 陈振声. 棉花品种资源抗黄萎病田间鉴定[J]. 棉花,1980(3):25-28
- [14] 李成葆,张久绪. 棉花品种资源黄萎病抗性鉴定[J]. 作物品种资源,1989(3):20-21
- [15] 潘家驹. 棉花育种学[M]. 北京:中国农业出版社,1998:212-249
- [16] 张保龙,承泓良,杨郁文. 棉花抗黄萎病研究进展[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2012:147-150
- [17] 耿军义,张香云,崔瑞敏,等. 国审抗病高产转基因抗虫棉冀棉 958 选育研究[J]. 河北农业科学,2006,10(4):9-13
- [18] 刘素恩,耿军义,崔瑞敏,等. 优质抗虫棉花新品种冀 228 性状综合分析[J]. 中国农学通报,2009,25(23):220-223
- [19] 崔淑芳,李俊兰,金卫平,等. 抗病高产棉花新品种冀棉 298 的选育[J]. 河北农业科学,2006,10(1):85-86
- [20] 王凯辉,耿香利,谷峰,等. 棉花新品种冀 1316 主要性状稳定性分析[J]. 河北农业科学,2011,15(3):86-88
- [21] 刘慧君,简桂良,邹亚飞. GO 基因导入对棉花农艺性状及抗病性的影响[J]. 分子植物育种,2003,1(5/6):669-672
- [22] 蔡应繁,叶鹏盛,江怀仲,等. 抗真菌基因导入棉花创造高抗黄萎病材料研究[J]. 西南农业学报,2000,13(4):45-49
- [23] 吴家相,张猷龙,罗晓丽,等. 转几丁质酶和葡聚糖酶基因棉花的获得及其对黄萎病的抗性[J]. 遗传学报,2004,31(2):183-188
- [24] 赵丽芬,李增书,张寒霜,等. 棉花黄萎病种质资源鉴定及抗性品种选择[J]. 华北农学报,2007,22(S):254-256
- [25] 肖月华,罗明,侯磊,等. 棉花类 LRR 抗病蛋白 (ChLRR-RL) 基因的克隆及表达分析[J]. 遗传学报,2000,29(7):565-570
- [26] 乐锦华,祝建波,崔百明,等. 利用目的基因转化技术培育棉花抗病新品种[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2002,6(3):173-178
- [27] Wang Y Q, Chen D J, Wang D M, et al. Over-expression of *Gastrodia* anti-fungal protein enhances *Verticillium* wilt resistance in coloured cotton [J]. *Plant Breeding*, 2004, 123:454-459
- [28] Xu L, Zhu L F, Tu L L, et al. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(15):5607-5621
- [29] Qin J, Zhao J, Zuo K, et al. Isolation and characterization of an ERF-like gene from *Gossypium barbadense* [J]. *Plant Sci*, 2004, 167(6):1383-1389
- [30] Zhu L, Zhang X, Tu L, et al. Isolation and characterization of two novel dirigent-like genes highly induced in cotton (*Gossypium barbadense*) after infection by *Verticillium dahliae* [J]. *J Plant Pathol*, 2007, 89(1):41-45
- [31] 孟宪鹏. 海岛棉抗病相关 ERF 转录因子的克隆与鉴定[D]. 北京:中国农业科学院,2009
- [32] Guo H, Ecker J R. The ethylene signaling pathway: new insights [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7:40-49
- [33] Xu L, Zhu L F, Tu L, et al. Differential gene expression in cotton defence response to *Verticillium dahliae* by SSH [J]. *J Phyto-Pathol*, 2011, 159(9):606-615