|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 分类号： | S43 | 学校代码： | 10758 |
| 密 级： | 公开 | 学 号： | 20060006 |



**博士学位论文**

**棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选**

**Analysis of *Verticillium Wilt* Resistance and Selection of Molecular Markers in Cotton**

|  |  |
| --- | --- |
| **研** 究 生 姓 **名** | **顾 爱 星** |
| **导 师 姓 名 及 职 称** | **麻浩 教授** |
| **合作导师姓名及职称** | **曲延英 教授** |
| **学 位 门 类 级 别** | **农学博士** |
| **专** 业 名 **称** | **作物遗传育种** |
| **研** 究 方 **向** | **棉花遗传育种** |
| **所** 在 学 **院** | **农学院** |

新疆·乌鲁木齐二○一三年六月

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得新疆农业大学或其他教育单位的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名： 时间： 年 月 日

关于学位论文使用授权的说明

本人完全了解新疆农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：新疆农业大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子文档，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文，允许论文被查阅和借阅。本人授权新疆农业大学将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以公布（包括刊登）论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 研究生签名： | 时间： | 年 | 月 | 日 |
| 导师签名： | 时间： | 年 | 月 | 日 |

**本文是新疆维吾尔自治区科学技术厅高技术项目**

**“棉花对黄萎病抗性常规及分子标记技术评价体系研究” 的部分研究成果**

**（项目编号：201111117） 课题主持人：顾爱星** **副教授**

**（新疆农业大学）**

**本文是新疆维吾尔自治区科学技术厅高新技术**

**“棉花枯、黄萎病抗病分子品种（系）创制” 的部分研究成果**

**（项目编号：200810101） 课题主持人：曲延英 教授**

**（新疆农业大学）**

**本文是新疆维吾尔自治区科学技术厅重大专项“高产优 质抗逆类型棉花新品种选育”的部分研究成果**

**（项目编号：2007331-4） 课题主持人：曲延英 教授**

**（新疆农业大学）**

**棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选**

摘 **要**

本研究对31个不同黄萎病抗性的棉花品种（系）和两个杂交群体：硕丰1号//新海20号杂交群体M37，军棉1号//辽棉18号杂交群体M44，探索室内快速、简便、有效的棉花黄萎病菌接种方法；分析棉花品种组织结构与抗性的关系；探索黄萎病抗性的生理生化机制；分析黄萎病抗性与棉花田间农艺性状、经济性状的关系；对杂交群体M37和M44及其各自亲本，进行分子标记研究，寻找与黄萎病抗性紧密连锁的分子标记，并使用与黄萎病抗性相关影响因子的引物和分子标记对棉花品种进行PCR扩增，不仅筛选到室内快速、简便、有效、大群体的鉴定方法，缩短抗病性鉴定时间，节约选种时间，提高育种效率，而且对棉花抗病育种工作和提高病害综合防治成效都提供理论、方法和依据。结果表明：

1. 对比5种接种鉴定方法，出现感病症状的时间由短到长的顺序为叶片针刺涂抹法、切根蘸菌法、定量注菌法、菌液浇根法。叶片针刺涂抹法操作简便，适宜短期处理大批棉株，快速鉴定棉花对黄萎病抗性；与病圃剖秆鉴定法的一致性达到70.83%。切根蘸菌法和定量注菌法能反应多个棉花品种在田间的黄萎病抗性情况。

2. 棉花黄萎病抗性与农艺性状有相关关系。海岛棉品种抗病性普遍较高，陆地棉品种对黄萎病抗性较低。海陆杂交群体对黄萎病的抗性比陆陆杂交群体对黄萎病的抗性普遍高。

陆地棉品种中，抗病品种比感病品种的有效果枝数、单株有效铃数多；陆陆杂交群体M44中，抗病株系比感病株系有效果枝数、单株结铃数、单株有效铃数多。黄萎病发病越严重，单株成铃性就越小。在海岛棉品种中，随相对病情指数增加，株高呈显著矮化，海岛棉的株高普遍高于陆地棉；海陆杂交群体中，随相对病情指数增加，植株矮化。

3. 抗病棉花品种（株系）与感病棉花品种（株系）的根、茎、叶部细胞结构存在差异。高抗棉花品种（株系）的根、茎部表皮细胞、薄壁组织细胞、导管细胞和木质部细胞都最小；而感病棉花品种（株系）的茎部表皮细胞、根、茎部薄壁组织细胞、茎部导管细胞和木质部细胞都最大。高抗品种的叶部上表皮细胞面积、薄壁组织细胞面积、下表皮细胞面积比感病品种小，抗病、耐病品种依次介于两者之间，抗病薄壁细胞面积较耐病的高。茎部表皮细胞面积比根部、叶部表皮细胞均小，与抗病性相关系数比根部、叶部表皮细胞与抗病性相关系数均大。

4. 抗病棉花品种（株系）与感病棉花品种（株系）的SOD、POD、PAL活性存在差异。10: 00测定苗期第一片真叶，高抗、抗病品种（株系）SOD活性相对较高，感病品种（株系）SOD活性比

其他品种（株系）低，感病性越高SOD活性越低，酶活性变化与品种感病性基本一致。抗病品种（株系）POD活性最高，耐病品种（株系）、感病品种（株系）POD活性普遍较低。感病性越高，PAL活性越低。

5. 利用抗病品种海岛棉新海20号、感病品种陆地棉硕丰1号及杂交群体M37后代的总DNA为材料，分别使用78对SRAP引物进行筛选，得到与黄萎病抗性相关的4个SRAP标记，分别是me1×em3，me1×em11，me4×em11和me5×em7，用这4对SRAP引物较易筛选出与田间抗病性符合的棉花材料。在抗病新海20号、感病硕丰1号及抗病辽棉18号与感病军棉1号间得到3 对

RGA多态性引物，分别是Gbrga18、Gbrga8、Gbrga42；得到4对SSR多态性引物分别是BNL3558、

BNL1414、BNL1681、BNL1721；得到3对SRAP多态性引物，分别是me1×em3、me1×em5、me6×

em2。以新海20号、硕丰1号以及新海20号×硕丰1号的杂交后代M37株系为材料，有3对引物在抗、感基因池中存在多态性条带，分别是SRAP引物me1×em3、me1×em11、me4×em11。引物me1×em3扩增出的差异带的大小在113 bp，引物me1×em11扩增差异带的大小在1366 bp，me4×

em11扩增出的差异带的大小在126 bp。

6. 使用38对黄萎病抗性相关影响因子设计的引物进行PCR扩增后，VM13、VM23、VM25、

BNL0946、BNL1414、BNL1721、em6×me2和em1×me5这8对引物进行PCR扩增出不同的条带。来源于抗病相关基因的蛋白、染色体、mRNA序列、SSR和SRAP引物。引物VM13、BNL1414、em6×me2扩增条带与抗病品种符合率高于0.857，与感病品种符合率低于0.25，这3种引物的扩增条带可以作为黄萎病抗性的分子标记鉴定指标。

新疆自育品种较多出现的扩增条带，与新疆自育品种符合率介于0.364～0.727之间，平均值为

0.515；与其它地区所育品种的符合率介于0.111～0.666之间，平均值为0.419，与新疆自育品种符合率略高于与其它地区所育品种的符合率。

关键词：棉花；黄萎病；抗性；分析；分子标记

**Analysis of *Verticillium Wilt* Resistance and Selection of Molecular Markers in Cotton**

Abstract

Thirty-one cotton cultivars or lines with varying degree of resistance to *Verticillium wilt*, progeny population (M37) derived from the interspecific crossing of the susceptible *Gossypium hirsutum* cv. ShuoFeng1 and the resistant *G. barbadense* cv. XinHai20, and progeny population (M44) derived from the intraspecific crossing of the susceptible *G. hirsutum* cv. JunMian1 and the resistant *G. hirsutum* cv. LiaoMian20 were developed and utilized to study *Verticillium wilt* resistance in cotton. Greenhouse

Inoculate methods were evaluated and a rapid, simple, and efficient inoculation protocol was developed. The correlation between the *Verticillium wilt* resistance and agronomical performance of cotton in field were evaluated. The relationship between tissue structure and resistance to *Verticillium wilt* were investigated. Biochemical mechanisms for the resistance were elucidated by the analysis of several key resistance related enzymes. The populations of M37 and M44 along with their parental cultivars were screened with molecular markers to identify molecular markers tightly linked with disease-resistance. Then, total DNA of twenty cotton cultivars were template using relative factors and molecular markers to select molecular markers tightly linked with disease-resistance. These studies will further our knowledge on cotton genetics, breeding and pathology, and provide important theoretical and methodological basis for the effective cotton production management, the development of effective cotton disease resistance breeding programs, and establishment of effective integrated disease control measures. The following conclusions were derived:

1. **Among the five inoculation methods, the order of symptom appeared was the leaf pricking-smearing method, the root-dip method, the stem-puncture method, the root-flooding method.** The leaf pricking-smearing method was convenient inoculating large cotton group to identify resistance to *Verticillium wilt* in greenhouse. Leaf pricking-smearing assay reached a consistency level of 70.83%, that compared to the symptom development observed in the field evaluation. Root-dip assay and stem-puncture assay could be the better chooses of many cotton cultivars to identify resistance to *Verticillium wilt* in greenhouse.

2. **The resistance to *Verticillium wilt* had obvious effects to agronomy properties.** The *G. barbadense* had higher resistance than *G. hirsutum*. The population derived from interspecific crossing between *G. hirsutum* and *G. barbadense* had higher resistance than that of the population derived from intraspecific crossing between *G. hirsutum* and *G. hirsutum*.

The effective fruiting-branch numbers and the effective boll numbers each plant of resistant cultivars were higher than that of susceptible cultivars in upland cotton. The effective fruiting-branch numbers, the boll numbers and the effective boll numbers each plant of resistant cultivars were higher than that of susceptible cultivars in upland-upland interspecific crossing population M44.

The disease index of *G. barbadense* is negatively correlated with the average plant height. The plant height of *G. barbadense* was higher widespread than that of *G. hirsutum.* The disease index of M37 population derived from interspecific crossing of an upland cotton cultivar and a sea island cultivar is negatively correlated with the average plant height.

3. **The cells structure of root, stem and leaf of resistant cultivars and that of susceptible cultivars had different.** In roots and stems, highly resistant cultivars had smaller cell surface area of epidermis

Cells, cortex cells, phloem cells, and xylem parenchyma cells than that of susceptible cultivars, with resistant and tolerant cultivars having intermediate surface areas. In leaves, highly resistant cultivars had smaller cell surface area of adaxial epidermis cells, mesophyll cells, and adaxial epidermis cells than that of susceptible cultivars, with resistant and tolerant cultivars having intermediate surface areas. The resistant cultivars had slightly larger xylem parenchyma cell surface area than the tolerant cultivars.

The stems surface cell area was smaller than that of roots and leaves. The correlation between the stems surface cell area and the relative disease index was larger than that of roots and leaves.

4. **There are differences that the SOD, POD and POL activities of resistant cultivars and that of susceptible cultivars.** The first true leaf was measured at 10 AM, the SOD activities of high resistant and resistant cultivars or lines are essentially the same, while the activities in the tolerant cultivar or lines are

Obviously lower. The SOD activity decreased with the cultivar susceptibility. The POD activity differences between the high resistant and resistant cultivars or lines are small, while the activities in the tolerant and susceptible cultivars or lines are obviously lower. The PAL activity decreased with the cultivar susceptibility.

**5. A total of 78 pairs of SRAP primers were screened over the progeny population of interspecific crossing, M37, and their respective parents, resistant cultivar XinHai20 and susceptible cultivar ShouFeng1. Four pairs, me1×em3, me1×em11, me4×em11 and me5×em7, were tightly linked**

**To the *Verticillium wilt* resistance trait. Utilization of these four molecular markers can greatly facilitate molecular identification of the resistant plants.** Three pair of RGA primers, Gbrga18、Gbrga8、Gbrga42, could obtained different fragment between resistant Xinhai20 and susceptible Shuofeng1, Liaomian18 and susceptible Junmian1. Four pair of SSR primers, BNL3558、BNL1414、BNL1681、BNL1721, and three pair of SRAP primers, me1×em3、me1×em5、me6×em2 could obtained using same cultivars. There are different fragments, using SRAP primers me1×em3、me1×em11、me4×em11, in Xinhai20, Shuofeng1 and resistant and susceptible DNA pool of interspecific crossing population M37.

The size of different fragment using me1×em3, me1×em1, me4×em11 were 113 bp, 1366 bp and 126 bp.

**6. Thirty-eight pair of primers of *Verticillium wilt* resistance relative factors were used in PCR ,**

**VM13、VM23、VM25、BNL0946、BNL1414、BNL1721、em6**×**me2 and em1**×**me5 obtained polymorphic fragments.** The eight pair of primers originated from related disease-resistant protein 、

Genomic、mRNA sequence、SSR and SRAP primers. The according rates of PCR fragments of primers

VM13、BNL1414 and em6×me2 and resistant cultivars were higher than 0.857, and that of susceptible cultivars were lower than 0.25, so the PCR fragments of the 3 primers could be molecular marker indicators of resistance to *Verticillium wilt*.

Fragments appeared widespread of cultivars breeding in Xinjiang reached a consistency level of 0.364～

0.727, that compared to cultivars breeding in Xinjiang, while the average amount was 0.515. Fragments appeared widespread of cultivars breeding in Xinjiang reached a consistency level of 0.111～0.666, that compared to cultivars breeding in other areas, while the average amount was 0.419. The consistency level

Of cultivars breeding in Xinjiang was higher slightly than that of other areas.

**Key words:** Cotton; *Verticillium wilt*; Resistance; Analysis; Molecular markers

目 录

[摘](#_Toc686964218)[要](#_Toc686964218) 3

[Abstract](#_Toc686964219) 4

[第1章 绪论](#_Toc686964220) 7

**[1.1](#_Toc686964221)** [引言](#_Toc686964221) 7

**[1.2](#_Toc686964222)** [棉花黄萎病病原及致病机制](#_Toc686964222) 7

**[1.3](#_Toc686964223)** [棉花黄萎病抗性的鉴定方法、抗性机制及抗性遗传规律](#_Toc686964223) 8

**[1.4](#_Toc686964224)** [棉花抗病性相关基因](#_Toc686964224) 10

**[1.5](#_Toc686964225)** [国内外棉花](#_Toc686964225)**[DNA](#_Toc686964225)**[分子标记研究进展](#_Toc686964225) 11

**[1.6](#_Toc686964226)** [抗病基因表达差异](#_Toc686964226) 12

**[1.7](#_Toc686964227)** [本研究的意义及目的](#_Toc686964227) 12

[第2章 不同黄萎病抗性棉花品种的室内接种方法研究](#_Toc686964228) 12

**[2.1](#_Toc686964229)** [材料与方法](#_Toc686964229) 12

[2.2 结果与分析](#_Toc686964230) 14

**[2.3](#_Toc686964231)** [讨论](#_Toc686964231) 24

[第3章 不同棉花品种（系）的黄萎病抗性及其与农艺性状的相关性](#_Toc686964232) 25

**[3.1](#_Toc686964233)** [材料与方法](#_Toc686964233) 25

**[3.2](#_Toc686964234)** [结果与分析](#_Toc686964234) 26

**[3.3](#_Toc686964235)** [讨论](#_Toc686964235) 41

[第4章 棉花组织结构与黄萎病抗性的关系](#_Toc686964236) 42

**[4.1](#_Toc686964237)** [材料与方法](#_Toc686964237) 42

**[4.2](#_Toc686964238)** [结果与分析](#_Toc686964238) 43

**[4.3](#_Toc686964239)** [讨论](#_Toc686964239) 52

[第5章 棉花黄萎病抗性的Th理Th化机制](#_Toc686964240) 53

**[5.1](#_Toc686964241)** [材料与方法](#_Toc686964241) 53

**[5.2](#_Toc686964242)** [结果与分析](#_Toc686964242) 54

**[5.3](#_Toc686964243)** [讨论](#_Toc686964243) 69

[第6章 棉花黄萎病抗性的分子标记](#_Toc686964244) 71

**[6.1](#_Toc686964245)** [材料与方法](#_Toc686964245) 71

**[6.2](#_Toc686964246)** [结果与分析](#_Toc686964246) 78

**[6.3](#_Toc686964247)** [讨论](#_Toc686964247) 102

[第7章 棉花黄萎病抗性的分子标记筛选](#_Toc686964248) 103

**[7.1](#_Toc686964249)** [材料与方法](#_Toc686964249) 103

**[7.2](#_Toc686964250)** [结果与分析](#_Toc686964250) 105

**[7.3](#_Toc686964251)** [讨论](#_Toc686964251) 138

[第8章 结论](#_Toc686964252) 138

[参考文献](#_Toc686964253) 139

[附录：](#_Toc686964254) 144

[作者简历](#_Toc686964255) 151

*新疆农业大学博士学位论文*

# 第1章 绪论

## **1.1** 引言

棉花（*Gossypium hirsutum* L.）是世界范围内主要的经济作物。被称为棉花“癌症”[1]的棉花黄萎病（*Verticillium dahliae* Kleb.）是一种土传性病害，在棉花生产中最具毁灭性，也是全国农业植物检疫对象之一。自1914年美国第一次报道以来，世界上一些产棉国如秘鲁、巴西、乌干达、刚果、前苏联、保加利亚、土耳其等都不同程度地遭受了黄萎病危害[2]，以前苏联最为严重，曾5次全国性地更换棉花品种。中国棉花黄萎病是随1935年引进美国棉种斯字棉4B而传入国内，并逐渐在中国的478个产棉县（市）蔓延，至80年代末已遍及南北棉区。其中以北方棉区发生普遍，且均为枯萎病、黄萎病混生区，为害较重。现今棉花黄萎病已成为中国棉花持续高产稳定的主要障碍[3]。新疆是中国产棉大省，近年来，黄萎病发生严重，如石河子棉区棉田普遍发病严重，以148

团为例，在8000 hm2 棉田中，发病率为2.75 %的占38.2 %，发病率为3.85 %的占棉田

的36.4 %，发病率为5.12 %的占棉田的21.5 %，发病率为36.8 %的占棉田的3.85 %[4]，棉花黄萎病成为新疆棉花种植产业稳定持续发展的主要障碍。新疆虽然原有一些自育品种产量较高，综合性状较好，但抗病性都较差，无法继续种植。自90年代以来，新疆引进许多内地棉花品种，但是因不适合新疆气候，尤其是北疆的植棉技术和生态条件，所以无法长久使用，生产上急需新疆自育的品质好、适应性强棉花抗病新品种[5]。近些年研究者尝试应用常规技术育种，种质资源特别是黄萎病抗原限制其发展[6]，常难以有所突破，如果将常规育种与生物技术育种相结合，就能较好地解决这个问题[7, 8]。而开展抗病基因工程的必要条件之一是充分了解棉花抗病机制，如抗病性的抗病性鉴定方法、抗病性与组织结构的关系、抗病性的生理生化机制、抗病性与农艺性状的关系、抗病基因的序列、抗病信号的转导、抗病性相关影响因子在不同棉花品种中的分布、抗病相关基因的表达调控模式和功能等，这些尚未解决的问题是目前国内外农业科学家正在面临的巨大障碍。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

## **1.2** 棉花黄萎病病原及致病机制

### **1.2.1** 棉花黄萎病菌的分类地位

棉花黄萎病菌属于真菌的半知菌亚门（Deutermycotina），淡色菌科（Mmonilaceae），轮枝菌属（*Verticillium*），属内有若干个种。其中危害棉花的主要是黑白轮枝菌

（*Verticillium alho-atrum* Reinke & Berth.）和大丽轮枝菌（*Verticillium dahliae* Kleb.）[9]。由于分类上的争议，在20世纪70年代以前，中国学者一直称棉花黄萎病菌为黑白轮枝

菌。此后，姚理文等[10]、张绪振等[11]、吴洵耻等[12]分别对中国长江流域6省（市）、8

大省区和ft东9个地区（市）的共342个单孢菌系进行了鉴定，确定在中国，棉花黄萎病菌均为大丽轮枝菌（*Verticillium dahliae* Kleb.），而且调查的这些菌系还存在生理型的分化。

病原菌与寄主的相互作用，还受环境变化、人为因素等多种因素的影响，常会产生生理分化，导致新致病类型的出现[13]。而因此，菌系致病类型又对本地区的品种抗性有很大影响。在1966年，Schnathorst等[14]将美国的棉花黄萎病病菌划分成非落叶型和落叶型两种类型；在1977~1978年，中国棉花黄萎病生理型联合试验组做了大量调查、取样和研究，将全国各主产棉区的病菌划分为3种类型：强致病力的生理型1号；弱致病

力的生理型2号以及中等致病力的生理型3号。20世纪80年代以后，中国许多学者针对致病力分化及类型研究了特定地区的棉花黄萎病菌系，结果显示各地的棉花黄萎病菌都存在致病力分化，基本上均可划分出3种类型即强、中、弱，并且在河南省和ft东省均发现强致病力的落叶型菌系[15-17]。

### **1.2.2** 棉花黄萎病菌系的生理型鉴定方法

#### **1.2.2.1** 鉴别寄主法

鉴别寄主法是指使用不同抗性鉴别寄主，通过不同菌株致病程度的不同，对菌株的生理型进行划分和鉴定的方法。鉴别寄主法是鉴定黄萎病菌生理型最基本的方法，采用单孢中具有代表性的菌株，对黄萎菌的致病力进行鉴定的方法，存在一定的弊端。朱荷琴等[18]的研究结果发现，即使在同一块棉田，也会出现不同致病力的菌系，并且可能从

*新疆农业大学博士学位论文*

同一病株中分离得到的不同单孢的生理型也不同，因此鉴定菌系应采用野生菌株。鉴别寄主法缺乏科学性，比如接种量没有标准，接种方法不统一，没有一套统一的鉴别寄主等，还都有待进一步的改善。

#### **1.2.2.2** 棉花黄萎病菌培养性状鉴定法

根据培养性状鉴定黄萎菌生理型，优点是较为直观，缺点是鉴定结果容易受环境影响。张绪振等[9]研究发现，不同致病力的黄萎病菌系在PDA培养基上产生微菌核的形态、形成快慢、大小、数量等方面均存在差异。吴献忠等[17]认为黄萎菌产生微菌核的多少与其致病力的强弱呈正相关，菌核型菌株是较强致病力的类型。朱荷琴等[18]则认为菌丝型菌株的致病力强，是菌核型的2倍左右，中间型的致病力介于菌丝型菌株与菌核型菌株之间。

### **1.2.3** 棉花黄萎病菌的致病机制

目前，堵塞和中毒两种理论解释棉花黄萎病菌的致病机制。

堵塞理论认为：菌丝和孢子在棉花病株导管中大量繁殖，同时刺激相邻的薄壁细胞，产生使导管阻塞的胶状物质和侵填体，造成水分运输变得困难，最终导致棉株萎蔫。吕金殿等[19]对感染黄萎病的棉株的根、茎、果枝及叶片进行解剖，在不同部位的维管束中，均发现被堵塞的情况。

毒素理论认为：黄萎病菌侵染棉株后，会在棉株体内分泌毒素，这些毒素能够引起叶片细胞内线粒体功能失调及叶绿体解体，最终使得棉叶萎蔫。吕金殿等[19]指出引起病害的主要原因是致萎毒素。而Talboys[20]研究指出，堵塞不应是导致棉花萎蔫的主导原因，因为正常的次生木质部导管的潜在输水能力已远远超过棉株的总需水量。Keen 等

[21]认为此毒素是一种酸性的蛋白质-脂多糖的复合体；Hyhob等[22]指出，轮枝菌素由黄萎病菌分泌，是一种氢氧酸类衍生化合物，它具有强氧化性，可以破坏叶绿体功能，最终导致组织坏死、叶片变色，直至全株萎蔫，最后枯死。章元寿等[23]研究证明，落叶型棉花黄萎病菌菌系产生的毒素多于高于非落叶型菌系产生的毒素，其中造成萎蔫的主要成分是毒素蛋白。陈旭升等[24]则认为黄萎菌外泌毒素，可以诱发棉苗抗性，堵塞维管束系统，这可能只是棉苗的一种诱导防卫反应，如果这种诱导防卫反应一直保持，会造成

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

维管束系统变得异常狭窄，最终使得棉株因堵塞，水分运输不畅而萎蔫。

## **1.3** 棉花黄萎病抗性的鉴定方法、抗性机制及抗性遗传规律

### **1.3.1** 棉花黄萎病抗性的鉴定方法

鉴定棉花品种对黄萎病的抗性，是进行棉花黄萎病抗性遗传研究，进而选育抗性品种的前提。棉花黄萎病抗性鉴定方法较多，接种物可以是病菌毒素或黄萎菌活体；接种菌组成可以用单菌系或混合多菌系；时间上可以采用苗期鉴定和成株期鉴定；棉株外部症状考察或剖秆观察横截面；大田、病圃和温室都可作为鉴定场所；常见接种方法有病圃自然侵染、蘸根接种及病床、针刺接种等。常见的鉴定方法[25-31]如表1-1所示。

表 1-1 棉花抗黄萎病的鉴定方法

Table 1-1 The identification methods of resistance of cotton to Verticillium wilt

| 鉴定场所 | 抗性鉴定方法 | 研究者 |
| --- | --- | --- |
| 温室抗性 | 纸钵撕底菌液蘸根法 | 石磊岩等（1987 年） |
| 鉴定方法 | 粗毒素鉴定技术 | 夏正俊等（1991 年） |
|  | 无底塑钵菌液浇根法 | 简桂良等（2001 年） |
|  | 六棱塑料钵定量注菌液法 | 王省芬等（2002 年） |
|  | 有底塑钵定量注菌法 | 马峙英等（2002 年） |
|  | 切根蘸孢子法 | 马 平等（2004 年） |
|  | 针刺接种法 | 齐俊生等（2006 年） |
| 田间抗性  鉴定方法 | 自然病圃鉴定 | —— |
| 人工病圃鉴定 | —— |

### **1.3.2** 棉花黄萎病抗性机制的研究

#### **1.3.2.1** 寄主与病原菌的识别机制

病原菌孢壁和寄主细胞质膜接触，产生识别作用，继而引起棉花对黄萎病的抗性，识别机制理论认为在一种酶存在于抗病棉花品种的细胞质膜，可以识别病菌孢壁，抗病

*新疆农业大学博士学位论文*

棉花产生一系列防卫反应，使棉株表现抗病性；而这种酶不存在于感病棉花品种中[3]。

Beckman等[32]观察发现，使用病原菌接种棉花后，观察病原菌接触寄主导管薄壁细胞的变化，在1 h之内，抗病品种中，接近病原菌一侧的细胞原生质已经发生膨胀，反应速度和强度均比感病品种中的高，也较远离接触病菌的其它结构部位高，认为这种反应与寄主、病原菌的识别有关。

#### **1.3.2.2** 寄主的组织结构抗性机制

寄主的组织结构抗性由两部分构成：一部分是寄主固有的组织结构抗性，另一部分是病原物诱发的组织结构抗性。

棉花品种的维管束结构与其抗病性有直接关系，使得不同黄萎病抗性的棉花品种固有组织结构不相同。姚焕章[33]观察发现棉花根、茎切片中，抗病品种单位面积的细胞数量较感病品种多一倍以上；原因是抗病品种细胞数量多，细胞间隙减小，棉花机械抗病性能得以提高，从而造成机械屏障，延缓了病原菌菌丝继续生长。

诱发的组织结构抗性必须在病原菌存在时，病菌识别、侵入棉花，发生一连串的代谢变化，形成木质化的表皮和木栓化的内部组织、导管薄壁细胞增加、形成胶状物和侵填体堵塞导管等形态结构的改变。Bell[34]认为棉株木质部导管发病后会造成导管堵塞，这样就可以将病原菌限制在维管束系统中的某一部位。

#### **1.3.2.3** 寄主的生理生化抗性机制

病菌侵染棉株，会引起棉株发生一系列生理生化反应，如酶类代谢加强、植保素积累、木质素合成基因表达加强等。裴炎等[35]发现在抗病品种（系）与感病品种之间，酯酶同工酶存在明显差异，其体内过氧化物酶（POD）酶带的主酶带区随着棉株病情的增加而加宽。棉花接种黄萎菌后，抗病品种棉株体内POD的含量和活性均高于感病品种，而CAT和SOD的活性下降[36]。Bell[37]认为，棉花中多酚及多酚类似化合物与棉花黄萎病抗性有关，并在感病的棉株中分离到dMHG、dHG和MHG，进一步研究表明这些物质都具有一定抗菌作用。

植保素能够抑制和杀死病原菌，Mace等[38]研究发现，棉花品种的抗病性与植保素的合成速度及强度相关。Garas等[39]证明，棉株导管组织中存在dMHG和MHG，它们的数量对棉花黄萎病抗性产生直接影响。夏正俊等[27]、甘莉等[40]的研究表明，棉花的黄

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

萎病抗性与棉株中可溶性糖的含量存在一定关系，可溶性糖含量在抗病品种中较高，它可能参与某些和抗性有关生化物质的合成代谢。不同抗性品种自生和诱发的单宁含量不同，抗病品种中单宁含量较高[41]。

Xu等[42]发现棉花接种黄萎病菌后，木质素合成相关基因的表达增强，PAL酶活和

POD酶活都增强，而抗性品系中增加得更多更快，木质素组织化学分析显示抗病棉花不仅保持维管束结构，而且积累了高浓度的木质素，此外，数量分析证明在抗病棉花茎杆中增加了木质化和木质素的交联，总的来说，木质素在棉花抗病性方面起着决定性的作用。

董宏平等[43]建立了从不同植物中克隆抗病性信号传导调控基因及检测其表达的方法，克隆了7个信号传导通路中18个调控基因的cDNA和DNA序列，它们分别在抗病基因Pto介导、细胞编程死亡通路、水杨酸介导、乙烯信号通路、茉莉酸信号通路、核黄素信号、脱落酸信号通路及调控不同信号通路的通调基因NDR1，并进一步研究了这些基因表达的定量测定方法。

壳寡糖是由甲壳素脱乙酞基后经过酶解而得的低聚糖，能有效的诱导植物产生抗病性，激发植物抗性相关基因表达，如几丁质酶、β-1, 3-葡聚糖酶和PAL基因表达量增加，达到控制病害的目的。赵小明[44]对壳寡糖诱导棉花抗黄萎病和诱导烟草抗花叶病的效果及其诱抗机理进行了初步研究。得到结论如下：壳寡糖对棉花黄萎病有诱抗效果。诱导抗病性效果与使用浓度有密切的关系，棉花根几丁质酶、β-1, 3-葡聚糖酶基因表达，以50μg・ml-1壳寡糖的效果最好。壳寡糖诱导基因表达与信号分子NO有密切关系。壳寡糖诱导棉苗木质素含量提高，50μg・ml-1壳寡糖对木质素积累效果最高。

革兰氏阴性植物病原细菌产生的harpins类蛋白质，与任何其他外源信号一样，通过启动不同信号传导通路，对植物发生不同影响，如在NDRI和EDSl的参与下诱导依赖于水杨酸的SAR，引发植物抗病[45-47]。概括来说，harpins在植物中所激活的信号通路可以分为三大类，一类是与植物抗病性相关的信号通路的激活，包括过敏性反应与细胞死亡，离子交换通道，水杨酸途径，茉莉酸途径，苯丙氨酸解氨酶介导的途径以及其他一些抗性基因介导的途径；比较特殊的是存在一条不依赖于NPRI的能介导植物对细菌抗性的信号通路；另一类是与促进植物生长相关的信号通路的激活[48]。

*新疆农业大学博士学位论文*

防御素是一类短肽，在生物体内先天性免疫系统中起作用，是生物体内源性抗微生物肽。防御素的抗微生物活性广谱，在细胞内外都可以直接杀死病原微生物，如原生动物、病毒、细菌和真菌等，同时可以毒杀某些恶性肿瘤细胞。防御素是一种新型的防御肽，宿主用来进行免疫调节从而维持机体内环境的稳定[49]。

在20世纪90年代，Terras等[50]首次发现了植物防御素的抗菌活性。植物防御素的

抗微生物活性主要表现在抗真菌上，而对一些革兰氏阳性菌也存在抑制作用，不过其抑制作用较真菌偏弱。

防御素具有广谱的抗菌活性，人们在基因工程中利用防御素，具有很大的应用潜力，有些研究致力于建立高效的细菌或酵母表达系统，用来大量生产防御素，应用到农业、农产品加工、食品、医药和临床领域，减少农业上化学抗菌剂的大量使用，减少农产品和环境污染；有些研究致力于从组织中分离或人工合成防御素基因，然后导入动植物体内，表达出防御素，不但可以减少动植物得病，而且提高有益菌的能力；目前已有研究者运用基因工程的途径来获得抗菌肽，该途径已经分别在原核体系和真核体系中获得成功，在不同的表达体系中，多种防御素已得到表达[51]。

真菌细胞壁的重要组成成分是几丁质，病原菌侵染植物时，会产生具有几丁质酶活性的物质来降解病原真菌细胞壁，从而杀死病原真菌，进行自我保护。目前，研究者已经克隆到多种植物几丁质酶编码基因，已经用于构建转基因抗病植物[52]。

几丁质酶可以将几丁质水解为寡聚糖，再水解成为N-乙酰氨基葡萄糖，构成细胞结构成分[53]。Benecke首次发现，有些微生物将几丁质作为食物，几丁质酶被从这些微生物中分离到，目前研究证明，高等植物、动物、细菌、放线菌以及病毒中都存在几丁质酶[54]，可以说，整个生物界均有可以产生几丁质酶的物种。

研究表明，病原细菌、真菌、病毒等侵染植物后，某些植物在可产生一类PR蛋白

（Pathagensis-relate protein），其中PR-3蛋白具有几丁质酶活性，目前从已分离的PR蛋白中已确定了两种几丁质酶，酸性的和碱性的[55]。转移植物对病原菌抗性的一种有效途径是基因工程，克隆某一植物中的编码几丁质酶的基因，并通过转基因手段将该基因转入另一植物，另一植物能表现出对该种病原菌的抗性。任文彬等[56]分离筛选到金龟子绿僵菌*Metarhizium anisopliae HN1*，利用RT-PCR方法从中扩增得到几丁质酶基因全长，以后可以构建转基因植物。Jayaraj等[57]克隆大麦的几丁质酶基因*chit*42，利用农杆菌介导转入胡萝卜，转基因植株对*Alternaria*的抗性提高了90 %，对*Botrytis*的抗性提高

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

了95 %. Gabriel等[58]使用农杆菌介导法，将编码菜豆几丁质酶的基因*ch5B*导入草莓的基因组，对转基因植株测定抗病性，其对草莓灰霉病的抗性得到大幅度提高，而且抗性与该基因表达的外源蛋白CH5B有密切相关关系。许明辉等[59]使用基因枪法，将烟草β-1,3葡聚糖酶基因和菜豆几丁质酶基因转入滇型杂交水稻恢复系，接种稻瘟病生理小种，鉴定抗病性，并进行大田诱发鉴定，结果证明，转基因品系对稻瘟病的抗性得以大大提升。

### **1.3.3** 棉花黄萎病抗性的遗传规律

虽然许多研究者探索棉花黄萎病抗性的遗传规律，但是仍没有确定的结论。Wilhelm等[60]、潘家驹等[61]进行海岛棉（*G. barbadense*）与陆地棉（*G. hirsutum*）种间杂交，研究发现，海岛棉对陆地棉表现抗病性，受不完全显性或显性的单基因控制，属于质量遗传；而在陆地棉种内杂交试验中，得到的结论完全不同，棉花黄萎病抗性的遗传既存在数量性状遗传，也存在质量性状遗传；而A1-Rawi等[62]、校百才等[63]的研究结果则认为，微效多基因控制陆地棉对黄萎病的抗性，属于数量性状遗传。

Robb等[64]采用单菌系和混合菌系相结合的方法，Tzeng等[65]采用黄萎病菌毒素和孢子接菌相结合的鉴定方法，进行了棉花对黄萎病抗性的遗传机制试验。结果表明，用单菌系鉴定时，棉花黄萎病抗性体现为单基因遗传；而用多菌系混合鉴定时，棉花黄萎病抗性体现为多基因遗传。棉花黄萎病抗性遗传受到病原菌的致病能力、亲本材料的抗病能力和抗性鉴定方法等诸多因素的影响。所以需要采用更多的黄萎菌系和更多不同的亲本材料进行进一步的研究。

## **1.4** 棉花抗病性相关基因

### **1.4.1** **R**基因（**Resistance** 基因）

病原菌一旦侵染植物，植物会调动结构组织抗性机制，产生结构屏障，阻止病原物进一步扩展蔓延，生成抗菌产物，同时启动R基因（Resistance基因）进行防御。在60 %已经克隆的R基因为*NBS*类R基因。综合多年防治病害的经验，育成抗病品种是控制和防治病害最有效的途径，分子育种的优点是可以将抗病植物中的抗病基因转移到其它

*新疆农业大学博士学位论文*

不抗病的品种中，能提高作物的抗病性。第一个抗病基因*Hml*是由Johal等[66]分离出的，第二个抗病基因*Pto*是由Martin等[67]分离出的。此后，48个R基因分别在12种植物中又成功的被克隆出来[68]。

了解棉花黄萎病抗性的分子机制，是分离R基因的基础，构建和分析抑制差减杂交

（Suppression Subtractive Hybridization, SSH）文库有助于了解分子机制。朱龙付等[69]

使用棉花黄萎病病原菌接种Pima 90幼苗，接种后2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h、72

h和96 h分批取幼根，抽提棉花总RNA。以未接种病原的棉花cDNA为驱动方，利用

SSH法对接种病原后的棉花cDNA进行差减杂交。对杂交后的cDNA进行T /A克隆并转化到大肠杆菌中完成文库构建，共获得了534个克隆。测序了78个表达产物上升的海岛棉克隆，与拟南芥等多个物种诱导的表达序列或相关基因进行了比对，结果大部分阳性克隆是相同的或者同源的，如拟南芥抗病反应家族蛋白和棉花病程相关蛋白家族10等。

### **1.4.2** 棉花抗病基因来源

海岛棉具有高抗黄萎病的性状，海岛棉新海20号属早熟品种，棉纤维色泽洁白，

吐絮畅而集中，纤维品质优良，抗病性和丰产性好[70]。陆地棉辽棉18号属早熟品种，长势旺而稳键，开花结铃集中，开絮畅而集中，含絮性适中，该品种高抗枯黄萎病，2000~

2001 年度沈阳农业大学植保系进行枯黄萎病鉴定，两年平均枯萎病指0.38，黄萎病指

7.15，评定为高抗（HR）；对苗病和铃疫病也有较强抗性；丰产性突出，纤维品质优良，适应性广[71]。

Zhang等[72] 2003年、2006年、2007年分别在田间、温室观察评价357个和267个市售棉花品种的黄萎病抗性，发现美国主要棉花种子公司培育的一些市售棉花品种均有较好的黄萎病抗性，包括最近培育的许多Acala棉花品种；Pima棉比陆地棉显示较高的黄萎病抗性，当抗病品种根系接种受伤后，表现相反。通过回交，一些常规品种中的黄萎病抗性可以转给它们的转基因后代。在陆地棉和Pima棉之间创制的新的回交近等基因系表现好的黄萎病抗性。

### **1.4.3 R**基因同源序列法（**Resistance Gene Analogs**，**RGA**）

克隆抗病基因的经典方法是转座子标签法和图位克隆法。易图永等[73]的研究结果表

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

明，因为有些植物基因组较大且重复序列较多，很难构建高密度的分子标记连锁图谱，应用这2种方法来克隆抗病基因比较困难。然而，R基因保守区不仅有助于理解抗病基因的作用机理及其分类，而且可以利用R基因同源序列法来克隆、定位抗病基因。

利用R基因及其转基因操纵的信号途径是一种有前途的提高植物抗病性的策略[74]。在已经克隆的R基因中60 %为*NBS*类R基因。控制病害最有效的途径就是培育抗性品种，将抗病植物中的抗病基因转移到其它作物品种中，在提高作物的抗病性方面已初见成效。Guo 等[75]用不同杂交载体从盐诱导陆地棉cDNA 文库分离陆地棉锌指蛋白

*GhZFP1*基因，编码一种新的CCCH类型锌指蛋白，转基因烟草中*GhZFP1*的过量表达增强对盐胁迫的耐力和对丝核菌的抗性，因此，*GhZFP1*可能在生物及非生物胁迫中担任重要角色。

### **1.4.4** **RGA**的应用现状

通过RGAs作图，可以与已知抗病基因的分子标记连锁，也可以将候选抗病基因定位于染色体上，如杨勤忠等[76]在云南水稻育种中，设计*NBS-LRR*类R基因保守序列的引物，从中间亲本云系2号中扩增到七类*STK*序列和两类*NBS*序列，分别与已克隆的抗病基因*Lr10*、*Pto*、*2C-2*、*Xal*和*Xa21*等具有很高同源性。

Donaid等[77]检测到3个RGA标记，紧密连锁到葡萄抗白粉病*RunI*基因座，其中2个（MHD145和GLP1-12）与之共分离。结果表明，使用BSA方法，能够快速地产生与作物抗性紧密连锁的RGA标记。在马铃薯[78]、黑麦[79]、糖甜菜[80]、向日葵[81]中分别将序列特异产生的RGA标记连锁或定位到抗甜菜丛根病、褐斑病基因座*Rh1*和*AB4*、抗线虫基因座*Ha2*、抗霜霉病的*P15*和*P18*基因座、抗白粉病基因座*Pm17*上。RGA也被成功地应用于各种QTLs分析中。

高玉龙等[82]利用已克隆的抗病基因与病程相关蛋白基因β-1, 3-葡聚糖酶基因（*PR2*）的保守序列设计简并引物，从海岛棉品种海7124基因组中成功分离了79条核苷酸结合位点（NBS, nucleotide binding site）类R基因类似物（RGAs, Resistance Gene Analogs），

21条丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶（STK, Serine/Threonine kinase）类RGAs和11条防卫基因类似物（DGAs, Defense Gene Analogs）。将NBS类RGAs与棉花中已经克隆的该类RGAs进行序列分析，鉴定了1个新的亚族。对具有连续ORF的序列进行表达

*新疆农业大学博士学位论文*

分析发现，6条NBS类与1条STK类RGA受黄萎病菌诱导表达，1条DGA经黄萎病菌诱导后表达量明显提高。NBS类RGAs大多数以多基因家族的形式存在。另外，有3条non-TIR类、NBS类RGAs出现了一样的杂交带型，可能这3条RGAs在基因组中成簇分布。

### **1.4.5** 病程相关蛋白的应用现状

Parkhi等[83]通过将拟南芥*NPR1*基因（Nonexpressor of Pathogenesis-Related genes-1）转化棉花来测定这种转基因途径的效果。研究表明，*NPR1*表达的棉花品系表现对黄萎病菌株TS2、棉枯萎病菌、立枯丝核菌和链格孢菌的明显抗性，当病原物侵染或确定的系统获得性抗性诱导化合物出现后，转基因棉花品系比野生棉花类型植株表现较高抗性；未诱发的转化株中，防御相关基因和酶的基础活性与相应非转基因品种没有区别。

### **1.4.6** 蛋白激酶基因的应用现状

Shi等[84]研究细胞分裂素活性蛋白激酶（Mitogen-activated protein kinase, MAPK）时，从棉花中首次分离编码MAPK的基因*GhMPK16*, Southern blot分析显示该基因是单拷贝的，RNA blot显示随着病原物的侵染，该基因的表达积累，它的外显子区域显示有一组与抗病性相关的顺式作用元件存在，亚细胞定位显示它存在于细胞核中，当转基因拟南芥*GhMPK16*基因过表达时，植株显示对炭疽病菌、链格孢菌和青枯病菌的高抗病性，抗病相关基因的表达物快速增加。

Shi等[85]研究编码MAPK的基因*GhMPK7*, RNA blot显示该基因的表达随病原物接种和多态防御相关信号分子而增加，过表达该基因的转基因本氏烟草显示对烟草炭疽病菌和马铃薯Y病毒的显著抗性，产生水杨酸的基因表达水平急速增加；另外，转基因本氏烟草表现出降低了由氧化物胁迫相关基因的正调控造成的活性氧调节损伤。在营养生长阶段的顶端分生组织中检测到该基因外显子决定的β-葡萄糖苷酸酶活性，并且因信号分子和植物激素的处理而增加。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

## **1.5** 国内外棉花**DNA**分子标记研究进展

### **1.5.1** **DNA**分子标记

遗传标记包括形态标记、细胞标记、生化标记和DNA分子标记，是近些年发展起来的一种检测方法，检测的是分子水平上（多指DNA水平）的多态性。到目前分子标记包括：AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)、CAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)、ISSR(Inter-simple Sequence Repeats)、RAPD(Random Amplified Polymorphism DNA)、RFLP ( Restriction Fragments Length Polymorphism)、RGA

（Resistance Gene Analogs）SSR(Simple Sequence Repeats)、SRAP（Sequence Related Amplified Polymorphism）和STS（Sequence Tag Site）等。这些分子标记分为4类：结合限制性内切酶与聚合酶链式反应技术的标记为AFLP和CAPS标记；以DNA聚合酶链式反应为基础的标记包括RAPD、SRAP、ISSR、SSR、STS和RGA标记；以分子杂交为基础的标记是RFLP标记；以单核苷酸多态性为基础的标记有SNP标记[86-88]。

### **1.5.2** **DNA**分子标记在棉花中的应用

Dan等[89]通过eQTL（表观数量性状位点）图谱研究自然遗传变化，个体表现型的染色体组分析导致eQTL分析的出现，该方法可以用于数量性状的分子基础分析。沈新莲等[90]使用QTL（Quantitative Trait locus）鉴定陆地棉对根结线虫的抗性，使用SSR引物和AFLP引物，找出9个AFLP引物与靶标区域连锁，Mi-c11位点介于SSR引物

CIR069和AFLP引物E14M27-375之间。C. Eynck等[91]使用实时PCR技术测定接种黄萎菌后菌体DNA数量的增加。Ky等[92]研究了环境互作QTL，发现在多个QTL模式中，仅仅产量QTL符合环境，其他性状与环境关系不大。

Encarnacion等[93]发现非落叶型黄萎病菌具有更多的RAPD产物多态性，在中国和美国加州的棉花黄萎病分离物中都成功鉴定出落叶型和非落叶型。Mumtaz 等[94]使用

RAPD评价18个巴基斯坦棉花品种的基因型多样性，其中3对引物扩增出470 bp、325

bp和107 bp的条带，选择效率分别为27.7 %、61.1 %和44.4 %，标记辅助选择显示两个棉花品种对棉花曲叶病毒有抗性。

*新疆农业大学博士学位论文*

王宝华等[95]对重组近等基因型的群体使用SSR引物，分析棉株层次结构性状，结果显示，QTL的交互效应和加性效应在棉株层次结构遗传中都很重要，这可以解释棉花杂种优势。N. Piyasatian等[96]使用多重QTL建立标记协助遗传评价模型，适用于杂交群体中。

### **1.5.3** 构建棉花分子图谱

构建饱和的分子图谱，找出与棉花抗病性基因连锁的分子标记，克隆棉花黄萎病抗性基因，是培育转基因抗病棉花品种的有效途径，其关键是创制新型分子标记，逐渐完善棉花分子图谱。Reinisch等[97]利用RFLP标记，将705个标记定位到41个连锁群上，

Jiang等[98]将261个标记定位到27个连锁群上。Zhang等[99]、高玉千等[100]用SSR 和

RAPD分子标记，分别得到了43个连锁群和17个连锁群。林忠旭等[101]采用SRAP标记，将237个位点定位到39个连锁群上，全长为3 030.7 cM。此后，使用AFLP分子标

记，相继构建了含120个位点的31个连锁群，含67个位点的8个连锁群和含566个位

点的41个连锁群，含有888个位点的37个连锁群，含392个位点的42个连锁群[102-105]。

杨常等[106]对感病棉花品种军棉1号和抗病棉花品种海7124杂交后代F2、BC1群体，使用SSR、RGA和DDRT引物标记，发现控制黄萎病抗性的QTLs位于不同染色体上，在不同生育时期产生不同的产物。王宝华等[107]对重组近等基因型的群体使用SSR引物，分析棉花产量及产量组分的关系，构建了包括132个位点，覆盖865.20 cM的遗传连锁图谱，发现衣分QTL在各环境分析中均出现。马雪霞等[108]使用SSR引物，分析亚洲棉和陆地棉的相合性，构建了包括264个SSR位点，13个连锁群的A染色体组棉花种间遗传图谱。

姜丰等[109]发现陆地棉的抗性被两个主要基因控制，显示加性上位性效应，由F2:3家系得到基因连锁图，包括31个连锁群的139个位点连锁图覆盖1165 cM，在抗病海岛棉中发现D7和D9染色体上有针对不同黄萎菌系的多个QTL位点。

Blenda等[110]使用6张高密度分子标记图谱，通过分子标记重复检查，形成一张高密度一致性的四倍体棉花遗传图谱，共对已发布的17343个SSR标记，检查重复序列，发现20 %的标记（3410个）可以认为与其它标记重复，当移走重复标记，建立的图谱

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

包括8254个位点，源自6669个标记，跨4070 cM，平均每cM有2个位点。三分之二的重复位点分别位于A染色体组和D染色体组，平均每对A、D染色体组有64个重复。

虽然棉花分子标记遗传连锁图正在逐渐丰富和完善，但是无论海岛棉还是陆地棉在总长度和饱和度上均需进一步补充。

## **1.6** 抗病基因表达差异

夏兰芹等[111]提取棉花RNA，制备高纯度而且完整的RNA，可以进行Northern分析、

RT-PCR、cDNA文库构建、DD-PCR分析及体外翻译等实验。

任杰等[112]在热硼酸法的基础上探索出一种适于植物不同组织总RNA提取方法，利用该方法从植物根、茎、叶、不同成熟期果实、不同成熟期种子和不同成熟期果柄中提取的总RNA，具有较高的纯度和完整性，并且RNA产量高，可以满足RT-PCR和Real time RT-PCR 的试验需要。

Kanniah R等[113]通过农杆菌介导法，高产转基因棉花表达合成抗菌肽D4E1, PCR产物和Southern bolts证明*D4E1*基因已整合，通过反转录，棉花RNA RT-PCR证实*D4E1*拷贝的出现，对T0和T1代棉花叶片蛋白提取物体外分析证明*D4E1*表达量足够抑制棉花枯萎病菌和黄萎病菌的生长，而作为阴性对照的转基因棉花提取物不能抑制病菌。

寄主植物抗性被广泛应用于多种作物病害控制，然而，多种来源的抗性对于病原的迅速变化不能耐久。虽然许多抗性基因被证明在种子中，但是去预测抗性基因的特性和耐久性也并不容易。Jan等[114]坚持抗性基因对适应的病原造成损害将可能持久的假设。通过阐述在病原适应性方面的分子变化和相关联的损失，使用一种前期途径去预测可使用的抗性基因的耐久性。

## **1.7** 本研究的意义及目的

许多国内外植物病理学者和棉花抗病遗传育种学者一直在研究棉花黄萎病。虽然他们进行大量研究，如棉花黄萎病菌生理型、致病力分化、致病机理，棉花抗病性鉴定、抗病性机制、抗病性遗传和应用分子标记进行遗传育种等方面，但仍未育成产量高、抗

*新疆农业大学博士学位论文*

病性好、棉花纤维品质好、适应性广的综合品质均好的棉花品种。因此，为满足棉花生产的需求，需要进一步开展针对上述抗病性问题的研究，不但有利于发展和完善植物病理学及棉花遗传育种学，而且对提高防治病害成效，有效开展棉花抗病育种工作都具有重要的理论和实践意义。

本文的研究目的：1）利用不同黄萎病抗性的棉花品种，探索室内快速、简便、有效接种方法，在田间播种前鉴定抗病性，缩短育种年限，节约田间鉴定时间；2）借助两个杂交群体：硕丰1号//新海20号杂交群体M37，军棉1号//辽棉18号杂交群体M44，检测棉花田间农艺性状，研究黄萎病抗性与农艺性状的关系；3）借助不同黄萎病抗性的棉花品种，研究组织结构与抗性的关系；4）借助不同黄萎病抗性的棉花品种，探索黄萎病抗性的生化机制；5）借助两个杂交群体：硕丰1号//新海20号杂交群体M37，

军棉1号//辽棉18号杂交群体M44，进行分子标记研究，找出与黄萎病抗性紧密连锁的分子标记，为开展黄萎病抗性QTL定位奠定基础；6）对黄萎病抗性不同的棉花品种，使用与黄萎病抗性相关的影响因子和紧密连锁的分子标记，作为引物进行PCR扩增，计算与黄萎病抗性的符合程度、与品种来源的符合程度，探究这些分子标记在黄萎病抗性鉴定中的准确度和可行性，筛选出可以实际应用的黄萎病抗性分子标记。筛选田间播种前，室内快速、简便、有效、大群体的接种方法；综合农艺性状、组织结构、生理生化、分子标记与黄萎病抗性的关系，提早抗病性鉴定时间，缩短选种时间，提高育种效率，为棉花分子辅助选择育种奠定基础和提供方法、技术、理论支持。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

# 第2章 不同黄萎病抗性棉花品种的室内接种方法研究

1993年，棉花黄萎病在我国爆发成灾，1995、1996年再次爆发，严重影响了我国的棉花生产[115-117]。

许多宜棉区因为连年种植棉花，使得棉花黄萎病这一土传病害越来越重，不易防治，选育和利用抗病品种是最经济有效的防病方法。我国自20世纪90 年代以来，生产上相继选用了一批抗病品种，我国一些棉区有效控制住了黄萎病的蔓延和猖獗。具备准确、快速和简便的抗病鉴定方法是培育抗病品种的必要前提条件。根据鉴定场所分为大田鉴定和温室鉴定，大田鉴定是评价新品种抗病特性必须经过的程序，其结果很好的反映该品种在自然情况下的抗病性，反映生产实际结果。但需要一个生长季节，往往需要一年时间，占地面积大，不适于鉴定大批材料的抗病性，而且受年度、环境条件影响较大，常常会影响鉴定结果的准确性和一致性。目前常用的黄萎病苗期鉴定方法也各自具有一定的局限性。

本试验在总结和吸收以往棉花苗期抗黄萎病鉴定方法优点的基础上，使用叶片针刺涂抹法，切根蘸菌法，菌液灌根法，定量注菌法四种室内抗性鉴定方法[118, 119]，与传统大田病圃鉴定方法相对比，计算与剖秆鉴定法的一致程度，以期找到快速、简便、准确的接菌鉴定方法，在田间播种前鉴定抗病性，减少育种代数，节约一年在田间的鉴定时间，为室内鉴定棉花黄萎病抗性提供方法。

## **2.1** 材料与方法

### **2.1.1** 试验材料

#### **2.1.1.1** 供试棉种

海岛棉（*G. barbadence*）：新海14号、新海17号、新海20号、新海22号、军海1号和苏K202共6个品种。陆地棉（*G. hirsutum*）：辽棉18号、大铃棉、系9、F2（系）、新陆早1号、新陆早7号、新陆早13号、新陆早23号、新陆早36号、农大05-2、中棉所42号、冀668、军棉1号、新GK-2、16-1、108夫、B32和硕丰1号共18个品种。其中军棉1号为本

*新疆农业大学博士学位论文*

试验的感病对照品种。新海20号和硕丰1号杂交后代M37株系6个，辽棉18和军棉1号杂交后代M44株系5个（由新疆农业大学农学院生物技术重点实验室暨教育部棉花工程中心提供）。

#### **2.1.1.2** 供试菌株

生理型2型弱致病力非落叶型3H菌株（由新疆农业大学农学院微生物实验室提供）。

### **2.1.2** 试验方法

#### **2.1.2.1** 菌株鉴定

通过分离棉花黄萎病的病株中的黄萎菌，与供试菌株进行菌的形态鉴定。菌落特征：有气生菌丝产生，呈绒毛状，菌丝体白色。显微镜观察：分生孢子梗直立，呈轮状分枝，每轮3～4个分枝，轮枝顶端或顶枝着生分生孢子，分生孢子长卵圆形，单孢无色。

#### **2.1.2.2** 棉种处理

首先用浓H2SO4进行脱绒处理，然后挑选饱满的棉种进行催芽处理，用30％的H2O2冲洗3次，浸泡5 h后，用无菌水冲洗3遍，将棉种放置在铺有无菌滤纸的培养皿中，以上皆需无菌操作。然后放置在恒温培养箱中28℃保湿培养，待芽长至3 cm时种于营养钵中[120, 121]。

#### **2.1.2.3** 棉苗的种植和培育

将催芽后的棉花种子种植在装有灭菌土的直径10 cm、高10 cm的塑料营养钵中，每品种4钵，播种后将营养钵置于托盘，托盘中灌满清水。棉花出苗后，每营养钵中留苗3株，待第二片真叶展平时接菌。

#### **2.1.2.4** 孢子悬浮液制备

将冷藏保存的黄萎菌3H菌种，在PDA平板上活化24 d后，用打孔器在长满菌丝的平板上打孔，挑取5～6块菌丝块放置液体PDA培养基中。于28 ℃下静置培养2～3

d后，挑取液体培养基表面的菌丝，转接到营养较少的液体PDA培养基（马铃薯50.0 g，葡萄糖5.0 g，链霉素0.1 g，蒸馏水1000.0 ml）中，放在120 rpm、28℃的恒温振荡培养箱中培养。7 d后用4层纱布过滤，在显微镜下用血球计数板计数，将孢子浓度调至

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

2×10 7～3×10 7 个/ml，孢子悬浮液现配现用[122]。

#### **2.1.2.5** 棉苗接种

本试验采用四种接种方法：

（1）叶片针刺涂抹法[123]：待棉苗长到第2片真叶展平时，将20个大头针均匀固定在一块长宽均20 mm的硬纸板上，使其针尖外露0.5 mm，轻刺棉苗的子叶和真叶，注意切勿刺透。然后在针刺部位均匀涂抹已调好浓度的黄萎病菌孢子悬浮液，以涂抹清水的棉苗作对照，观察并记录处理部位的萎蔫面积。

（2）切根蘸菌法[121]：

将棉花栽于无底塑料钵中，用无菌的剪刀将底部露出的棉根剪掉，将塑料钵置于盛有30ml孢子悬浮液的培养皿中，以置于盛有等量清水的棉苗作对照。把塑料钵放回托盘中，2h后在托盘中灌满清水。

（3）定量注菌法[30]：

用铅笔插入栽有棉苗的塑料钵中，在内边缘两侧选2个点进行定点伤根，然后用定量加液器在每个伤根处注入15ml调好浓度的黄萎病菌孢子悬浮液，已注入等量清水的棉苗作对照。

（4）菌液浇根法[124]：

在每个栽有棉苗的塑料钵中，灌入30 ml调好浓度的黄萎病菌孢子悬浮液，以灌入等量清水的棉苗作对照。

以上四种接种方法，棉苗在接种后置于温室内培养，保持高湿状态48 h，培养条件为光照12 h，黑暗12 h，常规浇水。

#### **2.1.2.6** 病圃鉴定

棉花黄萎病抗性鉴定地点是在石河子市134团下野地试验站黄萎病自然病圃中。随机排列种植试验品种，播种时，每个棉花品种行长300 cm，行距20: 50: 20 cm，株距13 cm，每个棉花品种4次重复。播种后常规田间管理，收获期进行剖秆，调查发病情况，记载病情指数[125]。

#### **2.1.2.7** 温室病情调查和统计

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，并按照石磊岩5

*新疆农业大学博士学位论文*

级分类标准记载发病级别。对于叶片针刺涂抹法接种的棉花，进行病情调查时，按以下病情分级标准进行[30]。

0级：叶片正常，不形成干枯斑块；

1 级：叶面干枯斑块占涂抹面积的25 ％以下；

2 级：叶面干枯斑块占涂抹面积的20 ％～50 ％；

3 级：叶面干枯斑块占涂抹面积的50 ％～75 ％；

4 级：叶面干枯斑块占涂抹面积75 ％以上。

#### **2.1.2.8** 病情调查和统计

采用剖秆法调查切根蘸菌法、定量注菌法、菌液浇根法和病圃剖秆鉴定法的棉花发病情况，记载发病级别划分标准[126]如下：

0级：棉秆正常，不变色；

1级：棉秆褐变占剖秆面积的25％以下；

2级：棉秆褐变占剖秆面积的25％～50％；

3级：棉秆褐变占剖秆面积的50％～75％；

4级：棉秆褐变占剖秆面积的75 ％以上。

病情指数=[Σ各级病株数/（总株数×最高病级）]×100。相对抗性指数IR＝校正系数K×鉴定材料病指

K＝50/感病对照品种的实际病指，（50为规定感病对照的标准病指）。（感病对照品种为军棉1号）

按全国统一标准[126]划分棉花品种黄萎病的抗病类型。抗病水平划分标准为：0为免疫

（I），0.1～10.0为高抗（HR），10.1～20.0为抗病（R），20.1～35.0为耐病（T），35.0以上为感病（S）（见表2-1）。

表2-1 棉花抗黄萎病分级标准

Table 2-1 Standard of cotton resistant degree to*Verticillium Wilt*

| 抗病指标 | 免疫（I）0 级 | 高抗（HR）  1 级 | 抗病（R）  2 级 | 耐病（T）  3 级 | 感病（S）  4 级 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| IR | 0.0 | 0.1-10.0 | 10.1-20.0 | 20.1-35.0 | ≥35.1 |

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

#### **2.1.2.9** 数据处理

用Excel和DPS统计软件进行数据处理。

## 2.2 结果与分析

### **2.2.1** **4**种温室接种方法的显症时间比较

将4种温室接种方法与病圃剖秆鉴定法出现病症的时间进行对比，见图2-1。

25

出现病症时间（d）

20

15

10

5

0

品种

图2-1 4种抗病性鉴定方法出现病症的时间

Fig. 2-1 Time of symptom appeared of four kind of identify methods

对比上述4种温室接种方法，叶片针刺涂抹法发病的时间最早，接种24 h后即可在叶面观察到枯斑，接种10 d后发病明显；切根蘸菌法接种10 d后棉花开始出现感病症状；采用定量注菌法接种15 d后，棉花才出现感病症状；采用菌液浇根法的棉花发病速度最慢，接种后20 d左右棉花才出现感病症状，50 d后达到发病高峰。

出现感病症状的时间由短到长的顺序为叶片针刺涂抹法、切根蘸菌法、定量注菌法、菌液浇根法。

*新疆农业大学博士学位论文*

### **2.2.2** **4**种温室接种方法与病圃剖秆鉴定法的抗病性鉴定结果

将4种温室接种方法与病圃剖秆鉴定法得到的相对病情指数和反应型对比，见表2-2。

表2-2 4种温室接种方法与病圃剖秆鉴定法的对比

Table 2-2 Comparison of four inoculate methods in greenhouse and stalk-cutting identify method

| 棉花品种 | 叶片针刺涂抹法 | 切根蘸菌法 | 相对病指  定量注菌法 | 菌液浇根法 | 病圃剖秆法 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 新海 20 号 | 16.66 R | 8.00 HR | 8.33 HR | 6.25 HR | 3.33 HR |
| 新海 17 号 | 41.38 S | 16.00 R | 11.11 R | 31.25 S | 8.33 HR |
| 新海 14 号 | 30.17 T | 16.00 R | 8.33 HR | 6.25 HR | 9.33 HR |
| 军海 1 号 | 12.07 R | 12.00 R | 12.10 R | 12.58 R | 10.33 R |
| 新海 22 号 | 19.99 R | 14.00 R | 27.78 T | 12.50 R | 11.11 R |
| B32 | 25.00 T | 18.00 R | 19.44 R | 18.75 R | 13.89 R |
| 新 GK-2 | 27.59T | 19.44 R | 19.44 R | 11.11 R | 19.44 R |
| 中棉所 42 号 | 32.76 T | 23.33 T | 19.44 R | 18.75 R | 23.33 T |
| 108 夫 | 47.41 S | 23.33 T | 34.44 T | 40.63 S | 23.33 T |
| 辽棉 18 号 | 30.17 T | 24.00 T | 22.22 T | 21.88 T | 25.00 T |
| 冀 668 | 29.31 T | 28.00 T | 22.22 T | 21.88 T | 25.00 T |
| 16-1 | 44.83 S | 44.83 S | 36.33 S | 31.25 T | 32.66 T |
| 新陆早 13 号 | 37.93 S | 36.11 S | 33.33 T | 31.25 T | 36.11 S |
| 农大 05-2 | 47.41 S | 36.11 S | 35.33 S | 31.25 T | 36.11 S |
| F2 | 40.52 S | 38.00 S | 36.11 S | 44.44 S | 36.11 S |
| 新陆早 1 号 | 46.55 S | 42.00 S | 38.89 S | 34.38 T | 36.65 S |
| 硕丰 1 号 | 47.41 S | 36.65 S | 47.22 S | 46.88 S | 36.65S |
| 新陆早 36 号 | 41.38 S | 41.67 S | 40.00 S | 34.28 T | 36.98 S |
| 苏 K202 | 46.55 S | 44.00 S | 44.44 S | 36.65 S | 38.89 S |
| 大铃棉 | 46.55 S | 46.00 S | 39.98 S | 37.50 S | 39.98 S |
| 新陆早 7 号 | 43.10 S | 40.00 S | 44.44 S | 37.50 S | 41.25 S |
| 系 9 | 46.55 S | 36.00 S | 36.11 S | 34.38 T | 44.44 S |
| 新陆早 23 号 | 48.28 S | 48.00 S | 47.22 S | 36.98 S | 44.44 S |
| 军棉 1 号 | 50.00 S | 50.00 S | 50.00 S | 50.00 S | 50.00 S |

HR：高抗R：抗病T：耐病S：感病

HR: High Resistant R: Resistant T: Tolerant S: Susceptible

叶片针刺涂抹法发病程度比较均一，除去感病对照品种军棉1号外，相对病情指数最高值48.48，相对病情指数最低值12.07，平均值37.48；切根蘸菌法相对病情指数最

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

高值48.00，相对病情指数最低值8.00，平均值32.14；定量注菌法相对病情指数最高值

47.22，相对病情指数最低值8.33，平均值30.59；菌液浇根法相对病情指数最高值36.98，相对病情指数最低值6.25，平均值28.69；病圃剖秆鉴定法的棉花相对病情指数最高值44.44，相对病情指数最低值3.33，平均值28.45。

五种鉴定方法得出的相对病情指数最大值由小到大的顺序为：菌液浇根法<病圃剖秆鉴定法<定量注菌法<切根蘸菌法<叶片针刺涂抹法；相对病情指数最小值由小到大的顺序为：病圃剖秆鉴定法<菌液浇根法<切根蘸菌法<定量注菌法<叶片针刺涂抹法；相对病情指数平均值由小到大的顺序为：病圃剖秆鉴定法<菌液浇根法<定量注菌法<切根蘸菌法<叶片针刺涂抹法。

### **2.2.3** **5**种接种鉴定方法相对病情指数平均值的比较

计算5种接种鉴定抗病性的方法，得出相对病情指数的平均值±标准差，如表2-3

所示。

表2-3 五种温室接种方法与病圃剖秆鉴定法的比较

Table 2-3 Comparison of four inoculate methods and stalk-cutting identify method

|  | 叶片针刺涂抹法 | 切根蘸菌法 | 定量注菌法 | 菌液浇根法 | 病圃剖秆法 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 相对病情指数 | 37.48±11.15 | 32.14±12.42 | 30.59±13.07 | 28.69±12.71 | 28.45±13.48 |

菌液浇根法得出相对病情指数的平均值±标准差为28.69±12.71，与病圃剖秆鉴定法的28.45±13.48最接近，其次为定量注菌法30.59±13.07，切根蘸菌法32.14±12.42，相差最大的是叶片针刺涂抹法37.48±11.15 。

### **2.2.4** 温室接种方法与病圃鉴定方法的一致性

*新疆农业大学博士学位论文*

对比病圃鉴定的棉花抗病级别，计算同级品种数，所得结果如表2-4所示。

表2-4 四种温室接种方法与病圃剖秆鉴定法的一致性比较

Table 2-4 Consistent comparison of four inoculate methods and stalk-cutting identify method

| 叶片针刺涂抹法 | | 切根蘸菌法 | 定量注菌法 | 菌液浇根法 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 与病圃鉴定法一致的品种数 | 17 | 21 | 19 | 16 |
| 与病圃鉴定法的一致程度（%） | 70.83 | 87.50 | 79.17 | 66.67 |

通过比较，发现采用切根蘸菌法得到的鉴定结果与病圃鉴定结果最接近。利用叶片针刺涂抹法所得到的抗病品种3个，耐病品种6个，感病品种15个，与病圃鉴定结果

一致的有17个品种，一致程度为70.83 %；采用切根蘸菌法所得到的高抗品种1个，抗

病品种5个，耐病品种4个，感病品种14个，与病圃鉴定结果的一致的有21个品种，

一致程度为87.5 %；定量注菌法所得到的高抗品种2个，抗病品种5个，耐病品种5个，

感病品种12个，与病圃鉴定结果一致的有19个品种，一致程度达79.17 %；菌液浇根

法所得到的高抗品种2个，抗病品种5个，耐病品种8个，感病品种9个，与病圃鉴定

结果的一致的有16个品种，一致程度达66.67 %。

### **2.2.5** 温室接种方法与病圃鉴定方法对海岛棉品种的一致性

对比病圃鉴定的海岛棉抗病级别，计算同级品种数，所得结果如表2-5所示。

表2-5 温室接种方法与病圃剖秆鉴定法对海岛棉的一致性比较

Table 2-5 Consistent comparison of four inoculate methods and stalk-cutting identify method in

barbadence

| 叶片针刺涂抹法 | | 切根蘸菌法 | 定量注菌法 | 菌液浇根法 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 与病圃鉴定法一致的海岛棉品种数 | 3 | 4 | 4 | 5 |
| 与病圃鉴定法的一致程度（%） | 50.00 | 66.67 | 66.67 | 83.33 |

通过比较，发现对于海岛棉品种，采用菌液浇根法得到的鉴定结果与病圃鉴定结果最接近。利用叶片针刺涂抹法所得到的抗病品种3个，耐病品种1个，感病品种2个，

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

与病圃鉴定结果一致的有3个品种，一致程度为50.00 %；采用切根蘸菌法所得到的高

抗品种1个，抗病品种4个，感病品种1个，与病圃鉴定结果的一致的有3个品种，一

致程度为66.67 %；定量注菌法所得到的高抗品种2个，抗病品种2个，耐病品种1个，

感病品种1个，与病圃鉴定结果一致的有4个品种，一致程度达66.67 %；菌液浇根法

所得到的高抗品种2个，抗病品种2个，感病品种2个，与病圃鉴定结果的一致的有 5

个品种，一致程度达83.33 %。

### **2.2.6** 温室接种方法与病圃鉴定方法对陆地棉品种的一致性

对比病圃鉴定的陆地棉抗病级别，计算同级品种数，所得结果如表2-6所示。

表2-6 四种温室接种方法与病圃剖秆鉴定法对陆地棉的一致性比较

Table 2-6 Consistent comparison of four inoculate methods and stalk-cutting identify method in

hirsutum

|  | 叶片针刺涂抹法 | 切根蘸菌法 | 定量注菌法 | 菌液浇根法 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 与病圃鉴定法一致的陆地棉品种数 | 14 | 17 | 15 | 11 |
| 与病圃鉴定法的一致程度  （ %） | 77.78 | 94.44 | 83.33 | 61.11 |

通过比较，发现对于陆地棉品种，采用切根蘸菌法得到的鉴定结果与病圃鉴定结果最接近。利用叶片针刺涂抹法所得到的耐病品种5个，感病品种13个，与病圃鉴定结

果一致的有15个品种，一致程度为77.78 %；采用切根蘸菌法所得到的抗病品种2个，

耐病品种4个，感病品种12个，与病圃鉴定结果的一致的有17个品种，一致程度为

94.44 %；定量注菌法所得到的抗病品种3个，耐病品种4个，感病品种11个，与病圃鉴定结果一致的有15个品种，一致程度达83.33 %；菌液浇根法所得到的抗病品种3个，耐病品种8个，感病品种7个，与病圃鉴定结果的一致的有11个品种，一致程度达61.11 %。

### **2.2.7** 温室接种方法与病圃剖秆鉴定方法的相关关系

计算4种温室接种方法与病圃剖秆鉴定方法的相关关系，结果见表2-5。

*新疆农业大学博士学位论文*

表 2-7 四种温室接种方法与病圃剖秆鉴定法的相关关系表

Table 2-7 Correlation between four inoculate methods and stalk-cutting identify method

| 叶片针刺涂抹法 | | 切根蘸菌法 | 定量注菌法 | 菌液浇根法 | 病圃剖秆鉴定法 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 叶片针刺涂抹法 | 1.000 | 0.630\*\* | 0.801\*\* | 0.878\*\* | 0.818\*\* |
| 切根蘸菌法 | 0.630\*\* | 1.000 | 0.794\*\* | 0.712\*\* | 0.850\*\* |
| 定量注菌法 | 0.801\*\* | 0.794\*\* | 1.000 | 0.861\*\* | 0.920\*\* |
| 菌液浇根法 | 0.878\*\* | 0.712\*\* | 0.861\*\* | 1.000 | 0.824\*\* |
| 病圃剖秆鉴定法 | 0.818\*\* | 0.850\*\* | 0.920\*\* | 0.824\*\* | 1.000 |

注：\*\*表示在0.01水平上相关性极显著，\*表示在0.05水平上相关性显著。

\*\*: extremely significance at 0.01 levels, \*: extremely significance at 0.05 levels.

叶片针刺法、切根蘸菌法、定量注菌法、菌液浇根法与病圃剖秆法得到的相对病情指数都呈极显著正相关，其中定量注菌法与病圃剖秆鉴定法的相关系数为0.920，依次为切根蘸菌法0.850，菌液浇根法0.824，叶片针刺法0.818。

## **2.3** 讨论

### **2.3.1** **4**种温室接种方法与病圃剖秆鉴定法所用时间的不同

黄萎病菌从抗病品种和感病品种的根部均可侵入，也就是说，抗病品种和感病品种的差异可能不表现在阻止黄萎病菌的入侵，甚至不表现在分生孢子在棉花植株中的传导，而是在于病菌侵入后寄主所表现的化学和物理反应的不同。

前人进行多种温室接种鉴定方法[25-31]的研究，供试材料限于少量棉花品种，为探索对于量大的分离株系群体快速、准确、操作简便、反应灵敏的温室接种鉴定黄萎病抗性方法，我们进行温室接种方法的试验，缩短鉴定时间；病圃剖秆鉴定法需要到收获期才鉴定，鉴定时间远远长于温室接种鉴定方法。

### **2.3.2** 发病时间的长短

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

病原菌从附着、入侵、潜育到发病有许多影响因子，而采用叶片针刺涂抹法减掉了附着环节，减少在维管束中的侵染距离和时间，有利于更准确地鉴定植物抗病性。

对比上述4种温室接种方法，叶片针刺涂抹法发病的时间最早，接种24 h后即可在叶面观察到枯斑，接种10 d后发病明显；切根蘸菌法接种10 d后棉花开始出现感病症状；采用定量注菌法接种15 d后，棉花才出现感病症状；采用菌液浇根法的棉花发病速度最慢，接种后20 d左右棉花才出现感病症状，50 d后达到发病高峰。

出现感病症状的时间由短到长的顺序为叶片针刺涂抹法、切根蘸菌法、定量注菌法、菌液浇根法。

### **2.3.3** **4**种温室鉴定方法与病圃剖秆鉴定法得出的相对病情指数范围

对叶片直接接菌不能反应病菌从根部侵染的过程[30]，而且一些耐病甚至抗病的品种很可能鉴定为感病品种。

本试验结果表明叶片针刺涂抹法发病程度比较均一，五种鉴定方法得出的相对病情指数最大值由小到大的顺序为：菌液浇根法<病圃剖秆鉴定法<定量注菌法<切根蘸菌法<叶片针刺涂抹法；相对病情指数最小值由小到大的顺序为：病圃剖秆鉴定法<菌液浇根法<切根蘸菌法<定量注菌法<叶片针刺涂抹法；相对病情指数平均值由小到大的顺序为：病圃剖秆鉴定法<菌液浇根法<定量注菌法<切根蘸菌法<叶片针刺涂抹法。叶片针刺涂抹法的相对病情指数最小值、相对病情指数平均值均最大，这与前人结论一致。

菌液浇根法得出相对病情指数的平均值±标准差为28.69±12.71，与病圃剖秆法的

28.45±13.48最接近，其次为定量注菌法30.59±13.07，切根蘸菌法32.14±12.42，相差最大的是叶片针刺法37.48±11.15。说明供试棉花品种的数量越大，使用菌液浇根法，越能反应棉花在田间的黄萎病抗性情况。

### **2.3.4** **4**种温室鉴定方法与病圃剖秆鉴定法的抗病结果一致性

通过比较，发现采用切根蘸菌法得到的鉴定结果与病圃鉴定结果最接近。利用叶片针刺涂抹法所得到的抗病品种3个，耐病品种6个，感病品种15个，与病圃鉴定结果

一致的有17个品种，一致程度为70.83 %；采用切根蘸菌法所得到的高抗品种1个，抗

病品种5个，耐病品种4个，感病品种14个，与病圃鉴定结果的一致的有21个品种，

*新疆农业大学博士学位论文*

一致程度为87.5 %；定量注菌法所得到的高抗品种2个，抗病品种5个，耐病品种5个，

感病品种12个，与病圃鉴定结果一致的有19个品种，一致程度达79.17 %；菌液浇根

法所得到的高抗品种2个，抗病品种5个，耐病品种8个，感病品种9个，与病圃鉴定

结果的一致的有16个品种，一致程度达66.67 %。说明切根蘸菌法和定量注菌法较能反应多个棉花品种在田间的黄萎病抗性情况。

切根蘸菌法发病速度较快，仅次于叶片针刺涂抹法，且与病圃鉴定结果较为一致。原因可能是伤根相对较多。但是，不同的棉花品种，根系的发达程度不同，有些根系发达，有些根系稀松，因此，很难达到伤根均匀。因此品种根系的发达是否影响抗性鉴定结果这一问题需要进一步研究。

### **2.3.5** 温室接种方法与病圃鉴定方法对海岛棉品种的一致性

通过比较，发现对于海岛棉品种，采用菌液浇根法得到的鉴定结果与病圃鉴定结果最接近。利用叶片针刺涂抹法所得到的抗病品种3个，耐病品种1个，感病品种2个，

与病圃鉴定结果一致的有3个品种，一致程度为50.00 %；采用切根蘸菌法所得到的高

抗品种1个，抗病品种4个，感病品种1个，与病圃鉴定结果的一致的有3个品种，一

致程度为66.67 %；定量注菌法所得到的高抗品种2个，抗病品种2个，耐病品种1个，

感病品种1个，与病圃鉴定结果一致的有4个品种，一致程度达66.67 %；菌液浇根法

所得到的高抗品种2个，抗病品种2个，感病品种2个，与病圃鉴定结果的一致的有 5

个品种，一致程度达83.33 %。

### **2.3.6** 温室接种方法与病圃鉴定方法对陆地棉品种的一致性

通过比较，发现对于陆地棉品种，采用切根蘸菌法得到的鉴定结果与病圃鉴定结果最接近。利用叶片针刺涂抹法所得到的耐病品种5个，感病品种13个，与病圃鉴定结

果一致的有15个品种，一致程度为77.78 %；采用切根蘸菌法所得到的抗病品种2个，

耐病品种4个，感病品种12个，与病圃鉴定结果的一致的有17个品种，一致程度为

94.44 %；定量注菌法所得到的抗病品种3个，耐病品种4个，感病品种11个，与病圃鉴定结果一致的有15个品种，一致程度达83.33 %；菌液浇根法所得到的抗病品种3个，耐病品种8个，感病品种7个，与病圃鉴定结果的一致的有11个品种，一致程度达61.11 %。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

### **2.3.7** 温室接种方法与病圃剖秆鉴定法的相关关系

叶片针刺涂抹法、切根蘸菌法、定量注菌法、菌液浇根法与病圃剖秆法得到的相对病情指数都呈极显著正相关，其中定量注菌法与病圃剖秆鉴定法的相关系数为0.920，依次为切根蘸菌法0.850，菌液浇根法0.824，叶片针刺法0.818，说明定量注菌法对棉花品种的黄萎病抗性鉴定结果最接近棉花品种在田间的相对抗病指数。

环境条件是影响棉花黄萎病发生的重要因素，当环境条件不利于黄萎病的发生时，即使是感病品种也不表现病状[127]。所以，在棉花黄萎病的抗性鉴定中要严格控制环境因素，尤其是温度和湿度。

*新疆农业大学博士学位论文*

# 第3章 不同棉花品种（系）的黄萎病抗性及其与农艺性状的相关性

棉花黄萎病系维管束、土传病害，是严重危害棉花的重要病害之一。中国进入90

年代以后，棉花黄萎病在生产上发生较普遍，发病面积占全植棉面积的50 %以上，并出现整片病株落叶光秆的现象，严重影响了棉花的产量和品质，造成巨大的经济损失。因此，棉花对黄萎病的抗病性利用是非常重要的，世界各国均以选育抗病品种为防治黄萎病的重要手段[128]。

中国从80年代中期起，从幼苗开始抗病性鉴定，提早了直接鉴定时间，也全面符合生态抗性育种的要求[129]。以后的鉴定方法和技术也大不相同，前人也做过许多的抗性鉴定研究[130-133]，为抗黄萎病研究提供了可靠的方法和有价值的资料。棉花抗性鉴定的准确与否直接关系到新品种抗病性选择的成功，研究棉花黄萎病抗性是非常重要的，选育和种植抗病品种是防治棉花黄萎病的经济有效措施，是培育抗病、丰产、优质新品种的物质基础。而且，研究选育技术又是培育抗病品种的重要技术手段[134, 135]。所以加速棉花品种抗性鉴定是当务之急，抗性指标的优化也是十分关键的。

本试验通过对若干棉花品种（系）及不同组合棉花杂交群体农艺性状的调查，旨在寻找与棉花黄萎病抗性相关的农艺性状指标，以期了解棉花对黄萎病抗性的遗传规律，为分子标记辅助棉花抗性遗传育种提供依据。

## **3.1** 材料与方法

### **3.1.1** 棉花材料

陆地棉品种：川243、川737、辽棉18号、冀668、军棉1号、108夫、硕丰1号、新陆早1号、新陆早7号、新陆早23号、K222；海岛棉品种：新海16号、新海14号、

新海22号、新海20号、新海25号、新海17号、吉扎81、海92-4、苏K202、新海11

号、军海1号、pima90-53，共23个品种。（均由新疆农业大学遗传育种实验室提供）。配制抗×感类型杂交组合2个，繁殖出F1-F2世代，分别为海陆杂交（新海20号×

硕丰1号）F2群体：M37株系；陆陆杂交（辽棉18号×军棉1号）F2群体：M44株系。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

### **3.1.2** 农艺性状调查方法

2009年在石河子134团下野地试验站黄萎病自然病圃播种，常规管理，7月中旬打顶前测株高，棉花收获期测定始节高、始节数、果枝数、有效果枝数、单株结铃数、单株有效铃数和病情指数；棉花收获后测试纤维长度、衣分和单铃重等指标[136]。

### **3.1.3** 田间病情调查和统计方法

见叶鹏盛方法[137]，与2.1.2.8相同。

### **3.1.4** 数据处理

利用SPSS软件分析黄萎病抗性与各农艺性状间的遗传相关关系。

## **3.2** 结果与分析

### **3.2.1** 棉花品种（系）及杂交群体的病情调查

#### **3.2.1.1** 棉花品种（系）黄萎病抗性的鉴定

表3-1 棉花品种（系）黄萎病鉴定的相对病指和反应型

Table 3-1 Relative disease index and reaction type to*Verticillium wilt* in cotton

| 陆地棉品种 | 相对病指 | 反应型 | 海岛棉品种 | 相对病指 | 反应型 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 川 243 | 23.53 | T | 新海 14 号 | 14.71 | R |
| 川 737 | 29.41 | T | 新海 25 号 | 11.76 | R |
| 辽棉 18 号 | 23.53 | T | 新海 17 号 | 14.71 | R |
| 冀 668 | 23.53 | T | 吉扎 81 号 | 17.65 | R |
| K222 | 20.59 | T | 海 92-4 | 38.24 | S |
| 军棉 1 号 | 50.00 | S | 苏 K202 | 44.12 | S |
| 108 夫 | 35.299 | S | 新海 16 号 | 14.71 | R |
| 硕丰 1 号 | 41.18 | S | 新海 11 号 | 14.71 | R |
| 新陆早 1 号 | 38.24 | S | 军海 1 号 | 17.65 | R |
| 新陆早 7 号 | 44.12 | S | pima90-53 | 17.65 | R |
| 新陆早 23 号 | 50.00 | S | 新海 20 号 | 11.76 | R |
| 新海 22 号 | 20.59 | T |  |  |  |

R: 抗病T: 耐病S: 感病R: Resistant T: Tolerant S: Susceptible

*新疆农业大学博士学位论文*

23个棉花品种中，没有表现免疫的品种，9个表现抗病，占待测棉花品种39.13 %；

6个表现耐病，占待测棉花品种26.09 %；8个表现感病，占待测棉花品种34.78 %；9个海岛棉品种表现抗病，1个海岛棉品种表现耐病，2个海岛棉品种表现感病，分别占待测海岛棉品种的75.00 %、8.33 %和16.67 %；6个陆地棉品种表现耐病，6个陆地棉品种表现感病，分别占待测陆地棉品种的50.00 %和50.00 %。

#### **3.2.1.2** **M37**株系和**M44**株系黄萎病抗性的鉴定

收获期剖秆法调查M37株系和M44株系的病情指数，进行黄萎病抗性的鉴定。结果如表3-2：

表3-2 M37株系和M44株系不同反应型的株数比例（%）

Table 3-2 the proportion of different resistance of M37 and M44（%）

| 相对病情指数 | 0 | 0-10.0 | 10.1-20.0 | 20.1-35.0 | >35.1 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| M37 株系 | 0 | 16.44 | 17.81 | 30.14 | 35.61 |
| M44 株系 | 0 | 3.11 | 5.59 | 44.72 | 46.58 |

从表3-2可以看出，海陆杂交群体M37株系没有免疫单株，高抗单株占16.44 %，抗病单株占17.81 %，耐病单株占30.14 %，感病单株占35.61 %；陆陆杂交群体M44 株

系也没有免疫单株，高抗单株占3.11 %，抗病单株占5.59 %，耐病单株占44.72 %，感病单株占46.58 %；耐病单株和感病单株比率均高于M37。说明海陆杂交群体对黄萎病的抗性比陆陆杂交群体对黄萎病的抗性普遍高。

### **3.2.2** 棉花黄萎病抗性与农艺性状的相关性分析

#### **3.2.2.1** 陆地棉黄萎病抗性与农艺性状的相关性分析

陆地棉黄萎病抗性与农艺性状的相关性分析，结果如表3-3：

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

表3-3 陆地棉黄萎病抗性与农艺性状的相关关系

Table 3-3 The correlation between resistance and agriculture characters in*G. hirsutum*

|  | 株高 | 始节高 | 始节数 | 果枝数 | 有效果枝数 | 单株结铃数 | 单株有效铃数 | 相对病指 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 株高 | 1.00 | 0.17 | 0.16 | 0.05 | 0.26 | -0.14 | 0.39 | -0.08 |
| 始节高 | 0.17 | 1.00 | -0.33 | -0.85\*\* | -0.23 | -0.63\* | -0.25 | -0.01 |
| 始节数 | 0.16 | -0.33 | 1.00 | 0.15 | -0.25 | 0.27 | -0.12 | -0.05 |
| 果枝数 | 0.05 | -0.85\*\* | 0.15 | 1.00 | 0.53 | 0.73\*\* | 0.53 | -0.20 |
| 有效果枝数 | 0.26 | -0.23 | -0.25 | 0.53 | 1.00 | 0.50 | 0.93\*\* | -0.65\* |
| 单株结铃数 | -0.14 | -0.63\* | 0.27 | 0.73\*\* | 0.50 | 1.00 | 0.56 | -0.31 |
| 单株有效铃数 | 0.39 | -0.25 | -0.12 | 0.53 | 0.93\*\* | 0.56 | 1.00 | -0.64\* |
| 相对病指 | -0.08 | -0.01 | -0.05 | -0.20 | -0.65\* | -0.31 | -0.64\* | 1.00 |

\*\* ：表示在0.01水平上相关性极显著，\*：表示在0.05水平上相关性显著。下表同

\*\*: extremely significance at 0.01 levels. \*: significance at 0.01 levels. The next tables same as

陆地棉品种中，病情指数与有效果枝数、单株有效铃数呈显著负相关，相关系数分别为-0.65和-0.64，而与其它农艺性状无显著相关性（表3-3）。

#### **3.2.2.2** 陆陆杂交群体黄萎病抗性与农艺性状的相关性分析

陆陆杂交群体黄萎病抗性与农艺性状的相关性分析，结果如表3-4：

表3-4 M44株系黄萎病抗性与农艺性状的相关关系表

Table 3-4 The correlation between resistance and agriculture characters in M44

|  | 单铃重 | 衣分 | 纤维长度 | 株高 | 始节高 | 始节数 | 果枝数 | 有效果枝  数 | 单株结铃  数 | 单株有效  铃数 | 相对病指 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 单铃重 | 1.00 | 0.27\*\* | 0.00 | 0.04 | 0.07 | -0.01 | -0.17 | -0.02 | -0.06 | -0.03 | -0.15 |
| 衣分 | 0.27\*\* | 1.00 | 0.03 | 0.10 | 0.22\* | 0.36\*\* | -0.11 | -0.01 | -0.09 | -0.14 | 0.18 |
| 纤维长度 | 0.00 | 0.03 | 1.00 | 0.14 | 0.12 | 0.12 | 0.03 | 0.03 | 0.18\* | 0.07 | -0.11 |
| 株高 | 0.04 | 0.10 | 0.14 | 1.00 | 0.72\*\* | 0.32\*\* | 0.56\*\* | 0.66\*\* | 0.62\*\* | 0.41\*\* | -0.06 |
| 始节高 | 0.07 | 0.22\* | 0.12 | 0.72\*\* | 1.00 | 0.55\*\* | 0.09 | 0.40\*\* | 0.24\*\* | 0.18\* | 0.05 |
| 始节数 | -0.01 | 0.36\*\* | 0.12 | 0.32\*\* | 0.55\*\* | 1.00 | -0.06 | 0.12 | -0.03 | 0.03 | 0.05 |
| 果枝数 | -0.17 | -0.11 | 0.03 | 0.56\*\* | 0.09 | -0.06 | 1.00 | 0.56\*\* | 0.66\*\* | 0.31\*\* | 0.06 |
| 有效果枝数 | -0.02 | -0.01 | 0.03 | 0.66\*\* | 0.40\*\* | 0.12 | 0.56\*\* | 1.00 | 0.72\*\* | 0.63\*\* | -0.22\* |
| 单株结铃数 | -0.06 | -0.09 | 0.18\* | 0.62\*\* | 0.24\*\* | -0.03 | 0.66\*\* | 0.72\*\* | 1.00 | 0.59\*\* | -0.18\* |
| 单株有效铃数 | -0.03 | -0.14 | 0.07 | 0.41\*\* | 0.18\* | 0.03 | 0.31\*\* | 0.63\*\* | 0.59\*\* | 1.00 | -0.20\* |
| 相对病指 | -0.15 | 0.18 | -0.11 | -0.06 | 0.05 | 0.05 | 0.06 | -0.22\* | -0.18\* | -0.20\* | 1.00 |

*新疆农业大学博士学位论文*

通过黄萎病抗性与农艺性状相关关系的计算，辽棉18号和军棉1号的杂交群体M44株系的相对病指与有效果枝数、单株结铃数、单株有效铃数呈显著负相关，相关系数分别为-0.22、-0.18和-0.20，而与其它农艺性状无显著的相关性。这同表3-3中和陆地棉品种抗性相关的农艺性状的指标基本一致（表3-4）。

#### **3.2.2.3** 海岛棉黄萎病抗性与农艺性状的相关性分析

海岛棉黄萎病抗性与农艺性状的相关性分析，结果如表3-5：

表3-5 海岛棉黄萎病抗性与农艺性状的相关关系

Table 3-5 The correlation between resistance and agriculture characters inG. barbadense

|  | 株高 | 始节高 | 始节数 | 果枝数 | 有效果  枝数 | 单株结  铃数 | 单株有  效铃数 | 相对病  指 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 株高 | 1.00 | -0.07 | 0.36 | 0.44 | 0.26 | 0.32 | 0.49 | -0.65\* |
| 始节高 | -0.07 | 1.00 | 0.51 | -0.65\* | -0.03 | -0.46 | -0.14 | 0.09 |
| 始节数 | 0.36 | 0.51 | 1.00 | 0.06 | 0.22 | -0.08 | 0.16 | 0.17 |
| 果枝数 | 0.44 | -0.65\* | 0.06 | 1.00 | 0.62\* | 0.75\*\* | 0.65\* | -0.18 |
| 有效果枝数 | 0.26 | -0.03 | 0.22 | 0.62\* | 1.00 | 0.66\* | 0.80\*\* | -0.04 |
| 单株结铃数 | 0.32 | -0.46 | -0.08 | 0.75\*\* | 0.66\* | 1.00 | 0.88\*\* | -0.05 |
| 单株有效铃数 | 0.49 | -0.14 | 0.16 | 0.65\* | 0.80\*\* | 0.88\*\* | 1.00 | -0.18 |
| 相对病指 | -0.65\* | 0.09 | 0.17 | -0.18 | -0.04 | -0.05 | -0.18 | 1.00 |

在供试的12个海岛棉品种（系）中，相对病指与株高呈显著负相关，相关系数为

-0.65，与其它农艺性状无显著的相关性。

#### **3.2.2.4** 海岛棉和陆地棉黄萎病抗性与农艺性状的相关性分析

海岛棉和陆地棉黄萎病抗性与农艺性状的相关性分析，结果如表3-6：

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

表3-6 海岛棉和陆地棉品种（系）黄萎病抗性与农艺性状的相关关系

Table 3-6 The correlation between resistance and agriculture characters in*G. barbadense and G. hirsutum*

|  | 株高 | 始节高 | 始节数 | 果枝数 | 有效果枝数 | 单株结铃数 | 单株有效铃数 | 相对病指 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 株高 | 1.00 | 0.13 | 0.41 | 0.11 | 0.07 | 0.33 | 0.23 | -0.01 |
| 始节高 | 0.13 | 1.00 | 0.07 | -0.93\*\* | -0.65\* | -0.75\*\* | -0.58 | 0.62\* |
| 始节数 | 0.41 | 0.07 | 1.00 | -0.20 | -0.54 | -0.09 | -0.41 | 0.45 |
| 果枝数 | 0.11 | -0.93\*\* | -0.20 | 1.00 | 0.81\*\* | 0.89\*\* | 0.75\*\* | -0.68\* |
| 有效果枝数 | 0.07 | -0.65\* | -0.540 | 0.81\*\* | 1.00 | 0.81\*\* | 0.95\*\* | -0.84\*\* |
| 单株结铃数 | 0.33 | -0.75\*\* | -0.09 | 0.89\*\* | 0.81\*\* | 1.00 | 0.87\*\* | -0.73\* |
| 单株有效铃数 | 0.23 | -0.58 | -0.41 | 0.75\*\* | 0.95\*\* | 0.87\*\* | 1.00 | -0.85\*\* |
| 相对病指 | -0.01 | 0.62\* | 0.45 | -0.68\* | -0.84\*\* | -0.73\* | -0.85\*\* | 1.00 |

将参试的12个海岛棉和11个陆地棉品种的相对病指和所测的农艺指标进行相关程度和相关关系的分析（表3-6），得出病情指数与有效果枝数和单株有效铃数呈极显著负相关，与果枝数和单株结铃数呈显著负相关，与始节高呈显著正相关。

#### **3.2.2.5** 海陆杂交群体黄萎病抗性与农艺性状的相关性分析

海岛棉黄萎病抗性与农艺性状的相关性分析，结果如表3-7：

表3-7 M37株系黄萎病抗性与农艺性状的相关关系

Table 3-7 The correlation between resistance and agriculture characters in M37

|  | 单铃重 | 衣分 | 纤维长度 | 株高 | 始节高 | 始节数 | 果枝数 | 有效果枝数 | 单株结铃数 | 单株有效铃数 | 相对病指 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 单铃重 | 1.00 | 0.47\* | -0.49\* | -0.02 | 0.19 | 0.07 | -0.28 | -0.39 | -0.04 | -0.33 | -0.40 |
| 衣分 | 0.47\* | 1.00 | -0.07 | 0.06 | 0.25 | 0.42 | -0.01 | -0.16 | -0.12 | -0.26 | -0.28 |
| 纤维长度 | -0.49\* | -0.07 | 1.00 | 0.19 | 0.33 | 0.34 | 0.30 | 0.17 | -0.05 | 0.27 | 0.19 |
| 株高 | -0.02 | 0.06 | 0.19 | 1.00 | 0.27 | 0.10 | 0.48\* | 0.14 | 0.18 | 0.11 | -0.52\* |
| 始节高 | 0.19 | 0.25 | 0.33 | 0.27 | 1.00 | 0.79\*\* | -0.24 | 0.29 | 0.01 | 0.15 | -0.48\* |
| 始节数 | 0.07 | 0.42 | 0.34 | 0.10 | 0.79\*\* | 1.00 | -0.10 | 0.56\* | 0.07 | 0.28 | -0.32 |
| 果枝数 | -0.28 | -0.01 | 0.30 | 0.48\* | -0.24 | -0.10 | 1.00 | 0.22 | 0.25 | 0.30 | 0.11 |
| 有效果枝数 | -0.39 | -0.16 | 0.17 | 0.14 | 0.29 | 0.56\* | 0.22 | 1.00 | 0.35 | 0.66\*\* | 0.06 |
| 单株结铃数 | -0.04 | -0.12 | -0.05 | 0.18 | 0.01 | 0.070 | 0.25 | 0.35 | 1.00 | 0.74\*\* | 0.02 |
| 单株有效铃数 | -0.33 | -0.26 | 0.27 | 0.11 | 0.15 | 0.28 | 0.30 | 0.66\*\* | 0.74\*\* | 1.00 | 0.22 |
| 相对病指 | -0.40 | -0.28 | 0.19 | -0.52\* | -0.48\* | -0.32 | 0.11 | 0.06 | 0.02 | 0.22 | 1.00 |

*新疆农业大学博士学位论文*

通过抗病程度和相关关系的测定（表3-7），新海20号和硕丰1号的海陆杂交群体

M37株系的相对病指与株高和始节高呈显著负相关，相关系数分别为-0.52和-0.48，而与其它农艺性状无显著的相关性。这同与海岛棉抗性相关的株高指标一致。

## **3.3** 讨论

### **3.3.1** 海岛棉与陆地棉对黄萎病抗性差异

Zhang[72]研究指出Pima棉比陆地棉显示较高的黄萎病抗性，但是当抗病品种根系接种受伤后，表现相反。

本试验23个棉花品种中，没有表现免疫的品种，9个表现抗病，占待测棉花品种

39.13 %；6个表现耐病，占待测棉花品种26.09 %；8个表现感病，占待测棉花品种34.78 %；说明现在缺乏免疫品种，基本表现抗病、耐病和免疫。9个海岛棉品种表现抗病，1个海岛棉品种表现耐病，2个海岛棉品种表现感病，分别占待测海岛棉品种的75.00 %、

8.33 %和16.67 %；6个陆地棉品种表现耐病，6个陆地棉品种表现感病，分别占待测陆地棉品种的50.00 %和50.00 %；说明海岛棉品种抗病性普遍较高，陆地棉品种对黄萎病抗性较差，多为耐病和感病，这与Zhang结论一致。

### **3.3.2** 海陆杂交群体与陆陆杂交群体对黄萎病抗性的差异

潘家驹等[61]进行海岛棉（*G. barbadense*）与陆地棉（*G. hirsutum*）种间杂交，研究发现，海岛棉对陆地棉表现抗病性，受不完全显性或显性的单基因控制，属于质量遗传；而在陆地棉种内杂交试验中，得到的结论完全不同，棉花黄萎病抗性的遗传既存在数量性状遗传，也存在质量性状遗传。A1-Rawi 等[62]、校百才等[63]的研究结果则认为，微效多基因控制陆地棉对黄萎病的抗性，属于数量性状遗传。

Robb等[64]采用单菌系和混合菌系相结合的方法，Tzeng等[65]采用黄萎病菌毒素和

孢子接菌相结合的鉴定方法，进行了棉花对黄萎病抗性的遗传机制试验。结果表明，用单菌系鉴定时，棉花黄萎病抗性体现为单基因遗传；而用多菌系混合鉴定时，棉花黄萎病抗性体现为多基因遗传。

本试验采用单菌系鉴定，海岛棉亲本新海20号抗病，陆地棉亲本硕丰1号感病，

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

海陆杂交群体M37株系没有免疫单株，高抗单株占16.44 %，抗病单株占17.81 %，耐病单株占30.14 %，感病单株占35.61 %；陆地棉亲本辽棉18号耐病，陆地棉亲本军棉

1号感病，陆陆杂交群体M44株系没有免疫单株，高抗单株占3.11 %，抗病单株占5.59 %，

耐病单株占44.72 %，感病单株占46.58 %；耐病单株和感病单株比率均高于M37。说明海陆杂交群体对黄萎病的抗性比陆陆杂交群体对黄萎病的抗性普遍高。原因可能是海岛棉对陆地棉表现抗病性，受不完全显性或显性的单基因控制，属于质量遗传，海陆杂交群体表现海岛棉的高抗病性，使海陆杂交群体对黄萎病的抗性普遍高，微效多基因控制陆地棉对黄萎病的抗性，属于数量性状遗传，与前人结论相符。

### **3.3.3** 陆地棉和陆陆杂交群体对黄萎病抗性与农艺性状的关系

前苏联研究得出应在早代中选择棉花黄萎病抗性[138]，王忠义[139]研究观察发现黄萎病抗性与单株成铃数存在矛盾，认为选择时要把结铃性放在第一位，本试验结果也证实了这一点。本试验发现，陆地棉品种中，病情指数与有效果枝数、单株有效铃数呈显著负相关，相关系数分别为-0.65 和-0.64，而与其它农艺性状无显著相关性。陆地棉辽棉

18号和陆地棉军棉1号的杂交群体M44株系的相对病指与有效果枝数、单株结铃数、单株有效铃数呈显著负相关，相关系数分别为-0.22、-0.18和-0.20，而与其它经济性状无显著的相关性。说明黄萎病发病越严重，单株成铃性就越小。分析其原因，黄萎病的发生使得棉株吸收养分和水分发生困难，到成铃期时，养分和水分供应不足，影响棉铃的长成和成熟。分析结果表明，随着黄萎病发病程度的加剧，皮棉的产量会随之降低。

### **3.3.4** 海岛棉和海陆杂交群体对黄萎病抗性与农艺性状的关系

在海岛棉品种中，相对病指与株高呈显著负相关，海岛棉的株高普遍高于陆地棉，可能株高优势提供海岛棉比陆地棉较高的对黄萎病抗性。由于棉花黄萎病菌在棉株的根部侵染后，病原菌从侵入点开始沿植株纵向生长，有株高优势的棉株就延缓了病原菌的生长进程，从而延长了显症的时间。如海岛棉中苏K202和海92-4的株高比其它供试的海岛棉品种的株高偏低，病指相对偏高。

海陆杂交群体中，与抗病性相关的经济指标为株高，这同海岛棉的分析结果相同，可见海陆杂交后代中，与抗病性共同遗传的为株高，因此可将株高作为分子标记辅助抗

*新疆农业大学博士学位论文*

病育种的参考指标。

### **3.3.5** 棉花品种对黄萎病抗性与农艺性状的关系

通过对供试的海岛棉和陆地棉组成的数据进行整体分析，结果表明黄萎病严重时，显著降低有效果枝数和单株有效铃数，势必导致产量下降，因此有效果枝数和单株有效铃数可以作为对黄萎病抗性间接鉴定指标。

棉花黄萎病抗性遗传受到病原菌的致病能力、亲本材料的抗病能力和抗性鉴定方法等诸多因素的影响。所以需要采用更多的黄萎菌系和更多不同的亲本材料进行进一步的研究。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

# 第4章 棉花组织结构与黄萎病抗性的关系

棉花黄萎病是一种维管束病害，黄萎病病菌侵染后，通过维管束从棉花根部、茎部、枝条一直侵染至棉叶，在这一过程中，必将受到棉花组织的阻碍，有关研究表明棉花不同抗性品种的根和茎固有的组织结构与棉花对黄萎病的抗性紧密相关[140]。

本试验旨在通过对棉花黄萎病组织结构的研究，进一步明确棉花黄萎病组织结构抗性机制，从而优化棉花抗性鉴定体系，为棉花抗黄萎病育种的理论、方法和材料提供依据。

## **4.1** 材料与方法

### **4.1.1** 试验材料

#### **4.1.1.1** 菌株

由新疆农业大学农学院微生物实验室提供的生理型3号致病力中等的非落叶型菌株SHZ-134。

#### **4.1.1.2** 供试棉花

海岛棉（*Gossypium barbadence*）：新海20号、新海24号、新海14号、新海25号，

共4个品种。陆地棉（*G. hirsutum*）：军棉1号、苏K202、新陆早1号、硕丰1号、辽棉

18号，共5个品种；新海20号与硕丰1号海陆杂交后代株系：M44-237，M37-100，

M37-121，M37-86，M37-119，M37-49，M37-66；辽棉18号与军棉1号陆陆杂交后代株系：M44-223，M44-217，M44-200.

共19个品种（系）（由新疆农业大学农学院遗传育种实验室提供）。其中，军棉 1

号为本试验的感病对照品种。

### **4.1.2** 试验方法

#### **4.1.2.1** 棉种处理

棉苗种植和切根蘸菌法鉴定选择在新疆农业大学农学院温室。

*新疆农业大学博士学位论文*

棉种处理见**2.1.2.2。**

#### **4.1.2.2** 棉苗的种植和培育

棉苗的种植和培育见**2.1.2.3。**

#### **4.1.2.3** 孢子悬浮液制备

孢子悬浮液制备见**2.1.2.4。**

#### **4.1.2.4** 棉苗接种

棉苗接种使用切根蘸菌法，见**2.1.2.5。**

#### **4.1.2.5** 病情调查

采用剖秆法调查棉花发病情况，记载发病等级，然后进行品种抗病性划分，发病级别划分标准按石磊岩方法[30]。

#### **4.1.2.6** 石蜡切片

取生长一致的棉苗，截取地上1 cm~3 cm处茎部组织、地下1 cm~3 cm处主根组织和直径2 cm左右的真叶组织，作为石蜡切片的材料迅速放在FAA固定液中进行固定。材料经过脱水-置换-浸蜡-包埋后，采用旋转式石蜡切片机切片，染色采用番红-固绿法，将切片放在数码显微镜下观察，用数码显微镜测量根、茎部的表皮细胞面积、薄壁细胞面积、导管面积和木质部细胞面积，叶部的上表皮细胞面积、薄壁细胞面积、下表皮细胞面积，每种结构部位选取2个最大细胞、2个最小细胞、1个中等细胞，测定细胞面积，取5个细胞面积的平均值；参见[143]。

### **4.1.3** 数据处理

采用Excel和spss软件进行数据分析。

## **4.2** 结果与分析

### **4.2.1** 棉花品种（系）黄萎病抗性

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

采用切根蘸菌法，测得19个棉花品种（系）黄萎病抗性级别如表4-1。

表4-1 剖杆法鉴定棉花品种黄萎病抗性结果表

Table 4-1 Cutting-stalk identification of cotton cultivars resistance toVerticillium wilt

| 品种  （系） | 相 对 病  情指数 | 反应  型 | 品种  （系） | 相对病  情指数 | 反应  型 | 品种（系） | 相对病  情指数 | 反应  型 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 新海 20 号 | 9.33 | HR | M37-86 | 16.67 | R | 军棉 1 号 | 50.00 | S |
| 新海 24 号 | 5.56 | HR | 辽棉 18 号 | 27.78 | T | 苏 K202 | 44.44 | S |
| M44-237 | 8.34 | HR | M44-223 | 27.78 | T | 新陆早 1 号 | 55.33 | S |
| 新海 14 号 | 9.33 | HR | M37-119 | 31.67 | T | 硕丰 1 号 | 66.66 | S |
| 新海 25 号 | 16.67 | R | M37-49 | 27.78 | T | 37-66 | 55.33 | S |
| M37-100 | 20.00R | R |  |  |  | M44-217 | 66.66 | S |
| M37-121 | 16.67R | R |  |  |  | M44-200 | 66.66 | S |

HR：高抗 R：抗病 T：耐病 S：感病

HR: High resistant R: resistant T: tolerant S: susceptible

高抗品种（系）：新海20号，新海24号，M44-237，新海14号；抗病品种（系）：

新海25号，M37-100，M37-121，M37-86；耐病品种（系）：辽棉18号，M44-223，M37-119，

M37-49；感病品种（系）：军棉1号，苏K202，新陆早1号，硕丰1号，M37-66，M44-217，

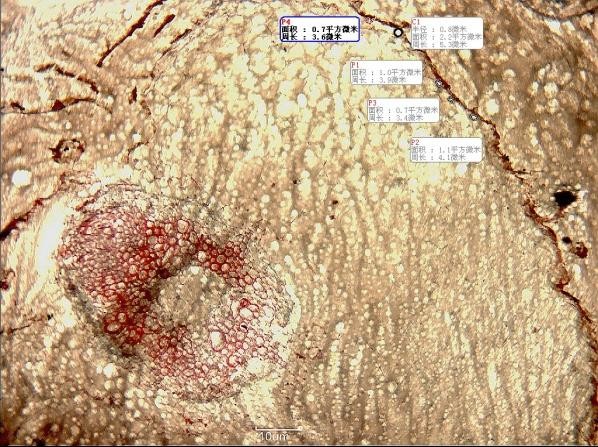
M44-200.

### **4.2.2** 棉花黄萎病抗性与组织结构的关系

#### **4.2.2.1** 不同抗性品种在接菌前后的根部石蜡切片显微照相图

以下切片观察均是在目镜10×/18，物镜4×/0.10的显微镜下进行的。不同抗性品种根部组织结构如图4-1所示。

*新疆农业大学博士学位论文*



测量接菌前新海20号的根表皮细胞面积（HR）测量接菌后新海20号的根薄壁细胞面积（HR）



测量接菌前辽棉18号的根表皮细胞面积（R）测量接菌后辽棉18号的根薄壁细胞面积（R）



测量接菌前新海17号的根表皮细胞面积（T）测量接菌后新海17号的根导管细胞面积（T）

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*



测量接菌前军棉1号的根木质部细胞面积（S）测量接菌后辽棉18号的根导管细胞面积（S）

注：HR：高抗R：抗病T：耐病 S：感病

HR: High Resistant, R: Resistant, T: Tolerant, S: Susceptible.

图4-1 高抗、抗病、耐病和感病棉花品种（株系）根部石蜡切片的显微照片

Fig. 4-1 Photomicrographes of high resistant，resistant，tolerant and susceptible cotton cultivar（line）

Root slices

#### **4.2.2.2** 不同抗性品种的茎部石蜡切片显微照相图

以下切片观察均是在目镜10×/18，物镜4×/0.10的显微镜下进行的。不同抗性品种茎部组织结构如图4-2所示。



测量接菌前新海20号的茎部表皮细胞面积（HR）测量接菌后新海20的茎部薄壁细胞面积（HR）

*新疆农业大学博士学位论文*



测量接菌前辽棉18号茎部导管细胞面积（R）测量接菌后辽棉18号茎部木质部细胞面积（R）

测量接菌前新海17号茎部薄壁细胞面积（T）测量接菌后新海17号茎部薄壁部细胞面积（T）





测量接菌前军棉1号茎部导管细胞面积（S）测量接菌后军棉1号茎部木质部细胞面积（S）

注：HR：高抗R：抗病T：耐病 S：感病

HR: High Resistant, R: Resistant, T: Tolerant, S: Susceptible.

图4-2 高抗、抗病、耐病和感病棉花品种（株系）茎部石蜡切片的显微照片

Fig. 4-2 Photomicrographes of high resistant，resistant，tolerant and susceptible cotton cultivar（line）

Stem slices

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

#### **4.2.2.3** 不同抗性品种的叶部石蜡切片显微照相图

以下切片观察均是在目镜10×/18，物镜4×/0.10的显微镜下进行的。不同抗性品种叶部组织结构如图4-3所示。





测量接菌前新海20号叶部上表皮细胞面积（HR）测量接菌后新海20号叶部下表皮细胞面积（HR）



测量接菌前辽棉18号叶部下表皮细胞面积（R）测量接菌后辽棉18号叶部上表皮细胞面积（R）



测量接菌前新海17号叶部下表皮细胞面积（T）测量接菌后新海17号叶部上表皮细胞面积（T）

图4-3 高抗、抗病和耐病棉花品种（株系）叶部石蜡切片的显微照片

Fig. 4-3 Photomicrographes of high resistant，resistant and tolerant cotton cultivar（line）leaf slices

*新疆农业大学博士学位论文*

### **4.2.3** 棉花不同抗性品种根部、茎部组织结构的比较

通过对供试棉花的根、茎部的石蜡切片测量，结果见表4-2。

表4-2 不同抗病性品种根、茎部的组织结构差异

Table 4-2 Comparison on tissue structure of different resistant cultivars

（*S*/µm2）

|  | 观测项目 | 高抗品种（株系） | 抗病品种（株系） | 耐病品种（株系） | 感病品种（株系） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 表皮细胞面积 | 根 | 824.4±71.0 | 1402.0±76.2 | 1112.8±122.9 | 1183.2±94.1 |
|  | 茎 | 349.8±68.2 | 393.4±7.9 | 436.8±23.7 | 595.5±26.6 |
| 薄壁细胞面积 | 根 | 2635.6±139.3 | 2547.8±143 | 2825.6±178.8 | 3074.8±181.1 |
|  | 茎 | 2107.3±391.0 | 2181.3±200.6 | 2753.7±159.0 | 3249.5±158.4 |
| 导管细胞面积 | 根 | 153.3±15.2 | 181.1±24.1 | 590.8±37.8 | 372.1±18.3 |
|  | 茎 | 544.6±52.7 | 570.9±67.2 | 795.1±58.5 | 913.0±55.2 |
| 木质部细胞面积 | 根 | 2031.7±253.2 | 2254.7±147.3 | 2498.5±233.7 | 2363.8±126.5 |
|  | 茎 | 2892.4±153.2 | 2915.6±202.2 | 3105.0±224.6 | 3204.3±169.6 |

在根表皮细胞面积数据中，抗病品种1402.0±76.2，为最大值；高抗品种824.4±71.0，为最小值，耐病品种1112.8±122.9，感病品种1183.2±94.1比耐病品种大；在茎表皮细胞面积数据中，感病品种595.5±26.6，为最大值；高抗品种349.8±68.2，为最小值，抗病品种和耐病品种依次介于两组之间；

在根薄壁细胞面积平均值数据中，感病品种3074.8±181.1，为最大值；抗病品种2547.8±143，为最小值，耐病品种2825.6±178.8，比高抗品种2635.6±139.3大；在茎薄壁细胞面积平均值数据中，感病品种3249.5±158.4，为最大值；高抗品种2107.3±391.0，为最小值，耐病品种和抗病品种依次介于两组之间；

在根导管细胞面积平均值数据中，耐病品种590.8±37.8，为最大值；高抗品种153.3±15.2，为最小值，感病品种372.1±18.3，比抗病品种181.1±24.1大；在茎导管细胞面积平均值数据中，感病品种913.0±55.2，为最大值；高抗品种544.6±52.7，为最小值，耐病品种和抗病品种依次介于两组之间；

在根木质部细胞面积平均值数据中，耐病品种2498.5±233.7，为最大值；高抗品种

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

2031.7±253.2，为最小值，感病品种2363.8±126.5，比抗病品种2254.7±147.3大；在茎木质部细胞面积平均值数据中，感病品种3204.3±169.6，为最大值；高抗品种2892.4±153.2，为最小值，耐病品种和抗病品种依次介于两组之间。

高抗棉花品种的根、茎部表皮细胞、薄层组织细胞、导管细胞和木质部细胞都最小，细胞排列紧密。

### **4.2.4** 棉花不同抗性品种叶部组织结构的比较

通过对供试棉花的叶部石蜡切片观察，结果见表4-3。

表4-3 不同抗病性品种叶部的组织结构差异

Table 4-3 Comparison on tissue structure of different resistant cultivars

*S*/µm2

| 叶部 | 高抗品种（株系） | 抗病品种（株系） | 耐病品种（株系） | 感病品种（株系） |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 上表皮细胞面积 | 403.6±40.0 | 494.7±63.7 | 581.5±70.4 | 660.6±81.3 |
| 薄壁细胞面积 | 325.9±30.7 | 2031.3±219.8 | 1356.1±148.9 | 2180.4±109.7 |
| 下表皮细胞面积 | 662.5±87.9 | 1147.5±107.9 | 1618.8±194.7 | 1772.6±148.7 |

在叶部上表皮细胞面积平均值数据中，感病品种660.6±81.3，为最大值；高抗品种403.6±40.0，为最小值，耐病品种和抗病品种依次介于两组之间；在叶部薄壁细胞面积平均值数据中，感病品种2180.4±109.7，为最大值；高抗品种325.9±30.7，为最小值，抗病品种2031.3±219.8，比耐病品种1356.1±148.9大；在叶部下表皮细胞面积平均值数据中，感病品种1772.6±148.7，为最大值；高抗品种662.5±87.9，为最小值，耐病品种和抗病品种依次介于两组之间；

高抗品种的叶部上表皮细胞面积、薄壁组织细胞面积、下表皮细胞面积比感病品种小，抗病、耐病品种依次介于两者之间，抗病薄壁细胞面积较耐病的高，说明高抗棉花品种的叶上表皮细胞面积、薄壁组织细胞面积、下表皮细胞细胞面积都最小，细胞排列紧密。

### **4.2.5** 根、茎、叶部组织结构与相对病情的相关关系

计算棉花根、茎、叶部细胞面积与相对病情的相关关系，见表4-4、4-5、4-6。

*新疆农业大学博士学位论文*

表4-4 根部组织结构与相对病情相关关系表

Table 4-4 Correlation between structure of root orgenization and opposite disease index

| 表皮细胞面积 | | 薄壁细胞面  积 | 导管细胞面  积 | 木质部细胞面积 | 相对病情指  数 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 表皮细胞面积 | 1.000 | 0.228 | 0.074 | 0.264 | 0.201 |
| 薄壁细胞面积 | 0.228 | 1.000 | 0.288 | 0.172 | 0.587\*\* |
| 导管细胞面积 | 0.074 | 0.288 | 1.000 | 0.457\* | 0.445 |
| 木质部细胞面积 | 0.264 | 0.172 | 0.457\* | 1.000 | 0.269 |
| 相对病情指数 | 0.201 | 0.587\*\* | 0.445 | 0.269 | 1.000 |

根部薄壁细胞面积与相对病情指数呈极显著正相关，相关系数为0.587，表皮细胞面积、导管细胞面积、木质部细胞面积与相对病情指数相关不显著。

表4-5 茎部组织结构与相对病情相关关系表

Table 4-5 Correlation between structure of stem orgenization and opposite disease index

|  | 表皮细胞面  积 | 薄壁细胞面  积 | 导管细胞面  积 | 木质部细胞面  积 | 相对病情指数 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 表皮细胞面积 | 1.000 | 0.521\* | 0.736\*\* | 0.314 | 0.813\*\* |
| 薄壁细胞面积 | 0.521\* | 1.000 | 0.575\*\* | 0.399 | 0.711\*\* |
| 导管细胞面积 | 0.736\*\* | 0.575\*\* | 1.000 | 0.285 | 0.803\*\* |
| 木质细胞面积 | 0.314 | 0.399 | 0.285 | 1.000 | 0.249 |
| 相对病情指数 | 0.813\*\* | 0.711\*\* | 0.803\*\* | 0.249 | 1.000 |

茎部表皮细胞面积、薄壁细胞面积、导管细胞面积与相对病情指数呈极显著正相关，相关系数分别为0.813、0.711和0.803；木质部细胞面积与相对病情指数无显著相关性。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

表4-6 叶部组织结构与相对病情相关关系表

Table 4-6 Correlation between structure of leaf orgenization and opposite disease index

| 上表皮细胞面积 | | 薄壁细胞面积 | 下表皮细胞面积 | 相对病情指数 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 上表皮细胞面积 | 1.000 | 0.418 | 0.706\*\* | 0.664\*\* |
| 薄壁细胞面积 | 0.418 | 1.000 | 0.618\*\* | 0.667\*\* |
| 下表皮细胞面积 | 0.706\*\* | 0.618\*\* | 1.000 | 0.761\*\* |
| 相对病情指数 | 0.664\*\* | 0.667\*\* | 0.761\*\* | 1.000 |

叶部上表皮细胞面积、薄壁组织细胞面积、下表皮细胞细胞面积均与相对病情指数呈极显著正相关，相关系数分别为0.664、0.667和0.761。茎部表皮细胞面积比根部、叶部表皮细胞均小，与抗病性相关系数比根部、叶部表皮细胞与抗病性相关系数均大。

## **4.3** 讨论

### **4.3.1** 棉花不同抗性品种根部、茎部组织结构的比较

不同黄萎病抗性能的棉花品种在组织结构方面存在着一定的差异，棉花品种的抗病性与微管束结构有直接的关系。马远莉等[144]发现，黄萎病菌主要以菌丝和孢子的形态存在于导管内，同时也观察到导管内的胶状物和侵填体。

本试验表明高抗棉花品种（株系）的根、茎部表皮细胞、薄壁组织细胞、导管细胞和木质部细胞都最小，细胞排列紧密，可能黄萎病菌较难侵入，也较难定殖。而感病棉花品种（株系）的茎部表皮细胞、根、茎部薄壁组织细胞、茎部导管细胞和木质部细胞都最大，细胞排列松散，可能容纳更多的黄萎病菌菌丝和孢子，这与前人结论相近。

### **4.3.2** 棉花不同抗性品种叶部组织结构的比较

马远莉等[144]发现，黄萎病菌侵入后，叶部薄壁细胞排列紊乱，扭曲成不规则性状，导管管壁有增厚现象。陈旭升等[145]研究发现，棉花感染黄萎病后，叶部和茎部导管管壁均增厚，根部导管有侵填体，管壁未增厚。

本试验中，高抗品种的叶部上表皮细胞面积、薄壁组织细胞面积、下表皮细胞面积比感病品种小，抗病、耐病品种依次介于两者之间，抗病薄壁细胞面积较耐病的高，说

*新疆农业大学博士学位论文*

明高抗棉花品种的叶上表皮细胞面积、薄壁组织细胞面积、下表皮细胞细胞面积都最小，细胞排列紧密，有利于阻挡黄萎病病菌侵入。

### **4.3.3** 根、茎、叶部组织结构与相对病情的相关关系

蒋玉蓉等[146]研究发现，抗病棉花品种其主根，侧根和茎部的导管细胞壁比感病品种较厚，导管小，数目多，木质部髓射线数目和单位面积细胞数量也多于感病品种，而且单位面积薄壁细胞数多。

本试验中，根部薄壁细胞面积与相对病情指数呈极显著正相关，表皮细胞面积、导管细胞面积、木质部细胞面积与相对病情指数相关不显著，这与前人研究根导管面积小，抗病性高的相关关系不相符。可能是根部表皮、导管、木质部细胞壁厚，坚硬，感菌后变化较小；而薄壁细胞的细胞壁较薄，易被黄萎病菌丝侵染并增厚变得不规则，容易感病。茎部表皮细胞面积、薄壁细胞面积、导管细胞面积与相对病情指数呈极显著正相关，木质部细胞面积与相对病情指数无显著相关性，可能是木质部细胞最坚硬，感菌后变化较小。叶部上表皮细胞面积、薄壁组织细胞面积、下表皮细胞细胞面积均与相对病情指数呈极显著正相关。

本试验茎部表皮细胞面积比根部、叶部表皮细胞均小，与抗病性相关系数比根部、叶部表皮细胞与抗病性相关系数均大，可能是感病后茎部细胞大小更容易变化，小细胞更容易感病。

### **4.3.4** 细胞面积大小的遗传规律

本试验抗病组4个品种（株系）为：新海25号，M37-100，M37-121，M37-86，抗病品种的根表皮细胞面积平均值为1402.0±76.2，在所有抗病类型中为最大值；M37感病母本硕丰1号的根表皮细胞面积为1597.34，可能是M37株系根表皮细胞面积表现母本硕丰1号根表皮细胞面积性状。

耐病组的4个品种（株系）为：辽棉18号，M44-223，M37-119，M37-49，耐病品种的根导管细胞面积平均值为590.8±37.8，在所有抗病类型中为最大值；M44株系的感病母本军棉1号根导管细胞面积为436.16，在感病品种中最大，M44株系的抗病父本辽棉18号根导管细胞面积为586.1，所以M44株系根导管细胞面积较大；M37-119, M37-49

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

的根导管细胞面积分别为520.17和560.38，接近感病母本硕丰1号的426.15；在根木质部细胞面积平均值数据中，耐病品种2498.5±233.7，在所有抗病类型中为最大值；原因可能是杂交株系的根导管、木质部细胞大小倾向于表现母本的根导管、木质部细胞大小。

在叶部薄壁细胞面积平均值数据中，抗病品种2031.3±219.8，比耐病品种

1356.1±148.9大；M37感病母本硕丰1号的叶部薄壁细胞面积为2389.36，可能是M37

株系叶部薄壁细胞面积表现母本硕丰1号叶部薄壁细胞面积性状。

*新疆农业大学博士学位论文*

# 第5章 棉花黄萎病抗性的Th理Th化机制

棉花对黄萎病最敏感的时期是在棉花的2～6真叶期，而其发病的主要时期是在棉花现蕾后，所以一旦发病就很难进行防治。种植抗病品种是当前控制棉花黄萎病的重要措施。因此准确的筛选抗病品种是棉花抗黄萎病育种的关键。同时对于棉花生理生化抗性的研究可以作为筛选抗病品种的辅助手段。

超氧化物歧化酶（SOD）存在于植物细胞的各部分，是植物防御氧化损伤的主要酶类，能够减少病害产生自由基对膜系统造成较大的损伤[147]。过氧化物酶（POD）存在于植物细胞的各个部分，可以催化木质素前体如松柏醇的形成，催化脂肪酸、芳香胺和酚类物质等化合物的氧化，细胞壁碳水化合物与蛋白质之间共价键的形成，以及乙烯的生物合成等。研究表明，POD提供棉花抗病性的机制可能是促进生成如木质素、植保素等，这些抑菌物质抑制病菌延伸，使植物表现抗病性[148, 149]。苯丙氨酸解氨酶（PAL）是苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶，研究认为植物防御病原生物侵染与该途径的中间产物（酚类物质）以及终产物（木质素、黄酮、异类黄酮等物质）有关，所以PAL是一种防御酶，是调节寄主体内代谢途径、抗病性反应的主要酶系之一[150] 。

本试验采用不同抗性的棉花品种（株系）作为试验材料，通过测定供试棉花品种的

SOD、POD和PAL活性，探求寄主-病原菌互作的生理生化抗性机制，以期为棉花品种的抗性鉴定、抗病品种的选育和分子标记辅助育种提供依据。

## **5.1** 材料与方法

### **5.1.1** 试验材料

#### **5.1.1.1** 供试棉花

7个海岛棉品种：新海14号、新海16号、新海17号、新海20号、新海22号、新海24号、苏K202；

14个陆地棉品种：系9号、新陆早1号、新陆早13号、新陆早20号、新陆早23

号、新陆早26号、新陆早33号、新陆早36号、新陆早42号、新陆早48号、GK-2、

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

军棉1号、硕丰1号、辽棉18号；

杂交后代：军棉1号和新海20号杂交的F5后代9个株系：M37-121，M37-100，

M37-128, M37-198, M37-231, M37-204, M37-86, M37-73, M37-165;

辽棉18号和硕丰1号杂交的F5后代7个株系：M44-211, M44-16, M44-168，M44-158，M44-61，M44-105，M44-83.

#### **5.1.1.2** 试验试剂

0.05 mmol·L -1磷酸缓冲液（pH=7.8），提取介质50 mmol·L -1（pH=7.8）磷酸缓冲液，130 mmol·L -1甲硫氨酸（MET）溶液，750µmol·L -1 NBT, 100µmol·L -1核黄素溶液。100 mmol·L -1磷酸盐缓冲液pH=6.0，愈创木酚28µl，30 % H2O2 19µl, PVP，巯基乙醇的硼酸缓冲液（pH=8.3）。

### **5.1.2** 试验方法

#### **5.1.2.1** 病圃鉴定

棉花对黄萎病的抗性鉴定在新疆农业大学农学院黄萎病圃进行。随机排列种植棉花品种，每棉花品种行长300 cm，行距40 cm，株距20 cm，5次重复。播种后常规田间管理，收获期剖秆调查，记载发病等级[151]。用各材料的五个重复平均值进行棉花抗病性分级，尽量消除重复间的误差对抗病鉴定结果的影响[152]。田间病情调查和统计方法见

**2.1.2.8**.

#### **5.1.2.2** 棉叶取样方法

挑选饱满的棉种进行催芽处理，待种芽长度达到1 cm时播种。将塑料营养钵剪去底，装入灭菌土，种植催芽后的棉苗，每钵种植6粒种子，每个品种5钵，种植后将营

养钵放入盛满清水的塑料托盘内，放置在恒温光照培养室中培养，光照12 h（温度为

27℃），黑暗12 h（温度为22℃）。棉种出苗后，每营养钵中留棉苗4株。待棉苗长出3片真叶后，10: 00取6-7 cm2的第一片真叶，现采现用。

#### **5.1.2.3** 超氧化物歧化酶（**SOD**）活性的测定**[**153**]**

取待测棉花叶片（去叶脉）0.5 g于预冷的研钵中，加2 ml预冷的提取介质，冰浴下研磨成均浆，加入提取介质冲洗研钵，并使终体积为10 ml，于4 ℃下10500 r·min -1

*新疆农业大学博士学位论文*

离心20 min，上清液即为SOD粗酶液。做显色反应时，取4只质地相同、透明度好的试管，2只为对照管，2只为测定管，加入试剂。混匀后，用比试管稍长的双层黑色硬纸套住1只对照管，遮光，与其他各只试管同时放置于光照培养箱内，待反应10～20min后，在各只试管加入下列试剂：磷酸缓冲液1.5 ml，甲硫氨酸（met）溶液0.3 ml, NBT

溶液0.3 ml，EDTA—Na 0.3 ml，核黄素溶液0.3 ml，酶液0.1 ml, H2O 0.5 ml，总体积

3.3 ml，计算吸光度560 nm的酶活性。

#### **5.1.2.4** 过氧化物酶（**POD**）活性的测定（比色法）**[**154**]**

在有过氧化氢酶存在时，过氧化物酶能使邻甲氧基苯酚（愈创木酚）氧化，生成茶褐色物质4-邻甲氧基苯酚，该物质在470 nm处有最大吸收，可用分光光度计测量470 nm处的吸光度变化测定过氧化物酶活性。

#### **5.1.2.5** 苯丙氨酸解氨酶（**PAL**）的提取和测定

采用欧阳光察法[155]，取1 g叶，加入0.5 gPVP，冰浴研磨，分3次加入10 ml含5 mmol·L-1硫基乙醇的硼酸缓冲液（pH=8.3），过滤后10000 r·min -1离心15 min，取上清液测定PAL活性。

试管中加入2 ml蒸馏水、1 ml 0.02 mol·L-1 Phe溶液、0.2 ml酶提取液，在751 G分光光度计上测0.1 h的OD290，以每g鲜重每min增加0.01 OD290为1个酶活性单位。

### **5.1.3** 计算公式

#### **5.1.3.1** 计算**SOD**活性**[153]**

SOD活性按式（5-1）计算：

SOD 活性＝（A0-AS）×VT/A0×0.5×FW×V1 (5-1)

式中SOD总活性以每g鲜重酶单位表示；A0：照光对照光管的光吸收值（1.08） AS：样品管的光吸收值（560 nm下的吸光度值）VT：样液总体积（ml）（3.3 ml） V1：测定时样品用量（ml）（0.1 ml）

FW：样品鲜重（g）（0.5 g）

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

#### **5.1.3.2** 计算**POD**活性**[154]**

POD活性按式（5-2）计算：

POD 活性=△A470/W×Vs×T (5-2)

用每min内A470变化0.01为1个过氧化酶活性单位（U）表示。以上式中△A470：反应时间内吸光度的变化 W：植物鲜重（1 g）

Vs：测定时取用酶液体积（0.1 ml）T：反应时间（3 min）

## **5.2** 结果与分析

### **5.2.1** 病圃鉴定的结果

#### **5.2.1.1** **2010**年病圃鉴定

2010年在病圃鉴定，进行剖秆调查的结果如表5-1：

表5-1 2010年不同棉花品种的相对病情指数In值和抗性级别

Table 5-1 In value and resistant degree of different cotton caltivars in 2010

| 品种（株系） | In 值 | 抗性级别 | 品种（株系） | In 值 | 抗性级别 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| M37-231 | 0.00 | I | 新陆早 1 号 | 22.55 | T |
| 新陆早 20 号 | 0.00 | I | M44-158 | 22.90 | T |
| M44-83 | 5.65 | HR | M44-168 | 23.20 | T |
| M44-16 | 4.89 | HR | M37-204 | 24.04 | T |
| M37-25 | 8.43 | HR | M37-121 | 26.67 | T |
| GK-2 | 10.00 | HR | 新陆早 36 号 | 33.09 | T |
| 新海 14 号 | 10.00 | HR | 硕丰 1 号 | 44.58 | S |
| M37-86 | 13.34 | R | M37-73 | 46.50 | S |
| 新海 24 号 | 15.00 | R | M37-198 | 46.96 | S |
| M37-128 | 16.56 | R | 军棉 1 号 | 50.00 | S |
| M37-100 | 20.00 | R | 系 9 号 | 55.00 | S |
|  |  |  | M44-211 | 55.35 | S |

此表5-1计算结果可以看出，免疫品种（株系）占全品种（株系）的8.70 %，高抗

*新疆农业大学博士学位论文*

品种（株系）占21.74 %，抗病品种（株系）占17.39 %，耐病品种（株系）占26.09 %，

感病品种（株系）占26.09 %。

海岛棉抗病性为高抗、抗病；7个陆地棉中，免疫品种1个，占14.29 %，高抗品

种1个，占14.29 %，无抗病品种，耐病品种2个，占28.57 %，感病品种3个，占42.86 %；

9个海陆杂交M37株系中，免疫株系1个，占11.11 %，高抗株系1个，占11.11 %，抗

病株系3个，占33.33 %，耐病株系2个，占22.22 %，感病株系2个，占22.22 %；5个陆陆杂交M44株系中，无免疫株系，高抗株系2个，占40.00 %，无抗病株系，耐病株系2个，占40.00 %，感病株系1个，占20.00 %。

#### **5.2.1.2** **2011**年病圃鉴定

2011年在病圃鉴定，进行剖秆调查的结果如表5-2：

表5-2 2011年不同棉花品种的相对病情指数In值和抗性级别

Table 5-2 In value and resistant degree of different cotton caltivars in 2011

| 品种（株系） | In 值 | 抗性级别 | 品种（株系） | In 值 | 抗性级别 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| M44-16 | 4.69 | HR | M44-158 | 22.90 | T |
| 新海 17 号 | 4.67 | HR | M44-168 | 23.20 | T |
| 新海 16 号 | 4.89 | HR | M37-204 | 24.04 | T |
| 新海 20 号 | 5.31 | HR | M37-121 | 26.67 | T |
| 新海 22 号 | 5.58 | HR | M44-105 | 26.98 | T |
| M44-83 | 5.65 | HR | 苏 K202 | 32.93 | T |
| 新陆早 26 号 | 5.63 | HR | 新陆早 36 号 | 33.09 | T |
| 新陆早 13 号 | 5.77 | HR | 新陆早 33 号 | 33.70 | T |
| 新陆早 48 号 | 12.83 | R | 硕丰 1 号 | 44.58 | S |
| 辽棉 18 号 | 13.11 | R | M37-73 | 46.50 | S |
| M37-86 | 13.34 | R | M44-61 | 49.51 | S |
| M37-128 | 16.56 | R | 军棉 1 号 | 50.00 | S |
| 新陆早 23 号 | 21.22 | T | M37-165 | 50.45 | S |
| 新陆早 1 号 | 22.55 | T | M44-211 | 55.35 | S |
| 新陆早 42 号 | 22.79 | T |  |  |  |

由表5-2计算结果可以看出，高抗品种（株系）占27.59 %，抗病品种（株系）占

13.79 %，耐病品种（株系）占37.93 %，感病品种（株系）占20.69 %。

5个海岛棉品种中，高抗品种4个，占80.00 %，耐病品种1个，占20.00 %；11 个

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

陆地棉中，高抗品种2个，占18.18 %，抗病品种2个，占18.18 %，耐病品种5个，占

45.45 %，感病品种2个，占18.18 %；6个海陆杂交M37株系中，无免疫株系，抗病株系2个，占33.33 %，耐病株系2个，占33.33 %，感病株系2个，占33.33 %；7个陆陆杂交M44株系中，无免疫株系，高抗株系2个，占28.57 %，无抗病株系，耐病株系

3个，占42.86 %，感病株系2个，占28.57 %。

### **5.2.2** 不同病级棉花品种（株系）的**SOD**活性、**POD**活性和**PAL**活性测定结果

#### **5.2.2.1** 不同病级棉花品种（株系）的超氧物歧化酶（**SOD**）活性测定结果

2011年测定SOD活性如下图5-1，可以看出不同抗性的棉花品种（株系）的SOD活性不同。高抗、抗病品种（株系）的SOD酶活性相对较高，介于110.854 U·g -1鲜叶至131.875 U·g -1鲜叶之间；高抗品种（株系）中，新海26号酶活最高，达130.775 U·g -1

鲜叶，新海16号酶活最低，为110.854 U·g -1鲜叶，新海20号、新海22号、M44-16、

新陆早13号、新陆早26号与新海26号的酶活接近，新海17号与新海16号酶活接近，

高抗组平均酶活为125.795 U·g -1鲜叶。

抗病品种（株系）中，M37-86酶活最高，达131.875 U·g -1鲜叶，辽棉18号酶活最低，为112.565 U·g -1鲜叶，M37-128酶活131.387，与M37-86酶活接近，抗病组平均酶活为125.184 U·g -1鲜叶。

耐病品种（株系）中，新陆早23号酶活最高，达130.042 U·g -1鲜叶，苏K202酶活

最低，为79.687 U·g -1鲜叶，当相对抗病指数介于21.22～26.98之间时，酶活介于109.631 U·g -1鲜叶～131.753 U·g -1鲜叶，从苏K202（耐病）开始，SOD酶活性明显减少，当相对抗病指数介于32.93～33.7之间时，酶活介于79.687 U·g -1鲜叶～84.943 U·g -1鲜叶，耐病组平均酶活为111.798 U·g -1鲜叶。

感病品种（株系）中，硕丰1号酶活最高，达126.987 U·g -1鲜叶，M37-165酶活最

低，为76.510 U·g -1鲜叶。M37-73株系是新海20号和硕丰1号杂交后代，酶活123.198

U·g -1鲜叶，接近新海20号酶活129.675 U·g -1鲜叶和硕丰1号酶活126.987 U·g -1鲜叶,

感病组平均酶活为95.250 U·g -1鲜叶。

至相对病情指数最高的M44-211, SOD酶活性减少至66.366 U·g -1鲜叶。综合来看，

*新疆农业大学博士学位论文*

感病品种（株系）的SOD酶活性比其他品种（株系）低，感病性越高SOD酶活性越低，酶活性变化与品种感病性基本一致。

140

120

SOD活性（U·g-1鲜叶）

100

80

60

40

20

M44-16

新海17新海16新海20新海22 M44-83

新陆早26新陆早13新陆早48辽棉18 M37-86 M37-128

新陆早23新陆早1新陆早42 M44-158 M44-168 M37-204 M37-121 M44-105苏K202

新陆早36新陆早33硕丰1号 M37-73 M44-61

军棉1号 M37-165 M44-211

0

品种

图5-1 不同棉花品种（株系）的SOD活性（U·g -1鲜叶）

Fig. 5-1 SOD activity of different cotton cultivars （U·g -1 fresh leaf）

#### **5.2.2.2** 不同病级棉花品种（株系）的过氧化物酶（**POD**）活性测定结果

2011年测定POD活性如下图5-2，可以看出不同抗性的棉花品种（株系）的POD

活性差异很大。高抗品种（株系）中，新陆早26号的POD酶活性最高，达到2.867 U·g -1

鲜叶·min -1, M44-83的POD酶活性最低，为0.32 U·g -1鲜叶·min -1，平均值1.053 U·g -1

鲜叶·min -1.

抗病品种（株系）中，新陆早48号的酶活最高，达到3.137 U·g -1鲜叶・min -1，这也是所有品种（株系）中最高的POD酶活性，辽棉18号达到3.077 U·g -1鲜叶・min -1，M37-128的POD酶活性最低，为0.45 U·g -1鲜叶・min -1，平均值2.221 U·g -1鲜叶・min -1。

耐病品种（株系）中，新陆早42号的酶活最高，达到1.753 U·g -1鲜叶・min -1, M37-204的POD酶活性最低，为0.113 U·g -1鲜叶・min -1，这也是POD活性最低值，平均值0.860 U·g -1鲜叶・min -1。

感病品种（株系）POD活性普遍较低，军棉1号的酶活最高，达到1.383 U·g -1 鲜

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

叶・min -1, M37-73的POD酶活性最低，为0.237 U·g -1鲜叶・min -1，平均值0.872U·g -1鲜叶・min -1。综合来看，抗病品种（株系）的POD酶活性最高，耐病品种（株系）、感病品种（株系）POD活性普遍较低。

POD活性（U·g-1鲜叶·min-1

3.5

3

2.5

2

1.5

1

0.5

M44-16

新海17新海16新海20新海22 M44-83

新陆早26新陆早13新陆早48辽棉18 M37-128

新陆早23新陆早1新陆早42 M44-158 M44-168 M37-204 M37-121 M44-105苏K202

新陆早36新陆早33硕丰1号 M37-73 M44-61

军棉1号 M37-165 M44-211

0

品种

图5-2 不同棉花品种（株系）的POD活性（U·g -1鲜叶·min -1）

Fig. 5-2 POD activity of different cotton cultivars （U·g -1 fresh leaf·min -1）

#### **5.2.2.3** 不同病级棉花品种（株系）的苯丙氨酸解氨酶（**PAL**）活性测定结果

2010年测定PAL活性如下图5-3，可以看出不同抗性的棉花品种（株系）的PAL

活性不同。

免疫品种（株系）中，M37-231的酶活最高，为2.56 U·g -1鲜叶，新陆早20号的酶

活最低，为2.35 U·g -1鲜叶，平均值2.46 U·g -1鲜叶。

高抗品种（株系）的PAL酶活性较高，其中新海14的酶活最高，为2.45 U·g -1 鲜

叶，M44-83的酶活最低，为0.85 U·g -1鲜叶，平均值1.65 U·g -1鲜叶。

抗病品种（株系）中，M37-86的酶活最高，为2.55 U·g -1鲜叶，M37-128的酶活最低，为0.79 U·g -1鲜叶，平均值1.30 U·g -1鲜叶。从新海24号（抗病）开始，PAL酶活

性明显降低至0.98 U·g -1鲜叶，并且均低于1.87 U·g -1鲜叶。

耐病品种（株系）中，M44-158的酶活最高，为1.87 U·g -1鲜叶，新陆早1号的酶

活最低，为0.44 U·g -1鲜叶，平均值1.07 U·g -1鲜叶。

*新疆农业大学博士学位论文*

感病品种（株系）中，M44-211的酶活最高，为1.00 U·g -1鲜叶，M37-73的酶活最低，为0.55 U·g -1鲜叶，平均值0.83 U·g -1鲜叶。

综合来看，感病性越高，PAL酶活性越低。

3.00

PAL活性（U·g-1鲜叶）

2.50

2.00

1.50

1.00

0.50

M37-231

新陆早20号

M44-83 M44-16 M37—25

GK-2

新海14号

M37-86

新海24号 M37-128 M37-100

新陆早1号

M44-158 M44-168 M37-204 M37—121

新陆早36号

硕丰1号 M37-73 M37-198

军棉1号

系9号

M44-211

0.00

品种

图5-3 不同棉花品种的PAL活性（U·g -1鲜叶）

Fig. 5-3 PAL activity of different cotton cultivars （U·g -1 fresh leaf）

### **5.2.3** 不同病级棉花品种（株系）**SOD**活性、**POD**活性、**PAL**活性与抗病性相关关系

#### **5.2.3.1** 不同病级棉花品种（株系）**SOD**活性与抗病性的相关关系

计算不同病级棉花品种（株系）SOD活性与相对病情指数和抗病性的相关关系，得到结果见表5-3。

表5-3 棉花SOD活性与相对病情和抗病性的相关关系表

Table 5-3 Correlation between SOD activity and opposite disease index，disease resistance

|  | SOD 活性 | 相对病情指数 | 病级 |
| --- | --- | --- | --- |
| SOD 活性 | 1.000 | -0.690 \*\* | -0.536 \*\* |
| 相对病情指数 | -0.690 \*\* | 1.000 | 0.950 \*\* |
| 病级 | -0.536 \*\* | 0.950 \*\* | 1.000 |

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

结果显示，SOD活性与相对病情指数、病级呈极显著负相关，相关指数分别为-0.690和-0.536，即SOD活性越高，抗病性越高；SOD活性越低，抗病性越低。

#### **5.2.3.2** 不同病级棉花品种（株系）**POD**活性与抗病性的相关关系

计算不同病级棉花品种（株系）POD活性与相对病情指数和抗病性的相关关系，得到结果见表5-4。

表5-4 棉花POD活性与相对病情和抗病性的相关关系表

Table 5-4 Correlation between POD activity and opposite disease index，disease resistance

|  | POD 活性 | 相对病情指数 | 病级 |
| --- | --- | --- | --- |
| POD 活性 | 1.000 | 0.363 | 0.243 |
| 相对病情指数 | 0.363 | 1.000 | 0.950\*\* |
| 病级 | 0.243 | 0.950\*\* | 1.000 |

结果显示，POD活性与病级无显著相关关系。

#### **5.2.3.3** 不同病级棉花品种（株系）**PAL**活性与抗病性的相关关系

计算不同病级棉花品种（株系）PAL活性与抗病性的相关关系，结果见表5-5。

表5-5 棉花PAL活性与相对病情和抗病性的相关关系表

Table 5-5 Correlation between PAL activity and opposite disease index，disease resistance

|  | PAL 活性 | 相对病情指数 | 病级 |
| --- | --- | --- | --- |
| PAL 活性 | 1.000 | 0.950\*\* | -0.645\*\* |
| 相对病情指数 | 0.950\*\* | 1.000 | 0.943\*\* |
| 病级 | -0.645\*\* | 0.943\*\* | 1.000 |

结果显示，PAL活性与相对病情指数和病级呈极显著负相关，相关指数分别为-0.561和-0.645，即PAL活性越高，抗病性越高；PAL活性越低，抗病性越低。

### **5.2.4** 不同病级棉花品种（株系）**SOD**活性、**POD**活性、**PAL**活性与抗病性多重比较

#### **5.2.4.1** 不同病级棉花品种（株系）**SOD**活性与抗病性的多重比较

*新疆农业大学博士学位论文*

对不同病级棉花品种（株系）SOD活性与抗病性进行多重比较，结果见表5-6。

表5-6 棉花SOD活性与抗病性的多重比较表

Table 5-6 Multiple comparisons between SOD activity and disease resistance

（I）抗

病性

（J）抗

病性

平均差（I-J）标准误显著性

95 % 置信区间

下限上限

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 高抗 | 抗病 | 0.611 | 10.945 | 0.956 | -21.930 | 23.152 |
|  | 耐病 | 13.997 | 8.305 | 0.104 | -3.107 | 31.101 |
|  | 感病 | 30.545(\*) | 9.652 | 0.004 | 10.665 | 50.424 |
| 抗病 | 高抗 | -0.611 | 10.945 | 0.956 | -23.152 | 21.930 |
|  | 耐病 | 13.386 | 10.435 | 0.211 | -8.106 | 34.878 |
|  | 感病 | 29.934(\*) | 11.537 | 0.016 | 6.173 | 53.694 |
| 耐病 | 高抗 | -13.997 | 8.305 | 0.104 | -31.101 | 3.107 |
|  | 抗病 | -13.386 | 10.435 | 0.211 | -34.878 | 8.106 |
|  | 感病 | 16.548 | 9.071 | 0.080 | -2.134 | 35.229 |
| 感病 | 高抗 | -30.545(\*) | 9.652 | 0.004 | -50.424 | -10.665 |
|  | 抗病 | -29.934(\*) | 11.537 | 0.016 | -53.694 | -6.173 |
|  | 耐病 | -16.548 | 9.071 | 0.080 | -35.229 | 2.134 |

高抗组的SOD活性与感病组的SOD活性有显著差异，平均差为30.545；抗病组的

SOD活性与感病组的SOD活性有显著差异，平均差为29.934；其它抗病性等级组的SOD活性之间无显著差异，说明测定的SOD活性可以区分高抗与感病、抗病与感病这些不同抗病性等级的组，不能区分其它抗病性等级组。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

#### **5.2.4.2** 不同病级棉花品种（株系）**POD**活性与抗病性的多重比较

对不同病级棉花品种（株系）POD活性与抗病性进行多重比较，结果见表5-7。

表5-7 棉花POD活性与抗病性的多重比较表

Table 5-7 Multiple comparisons between POD activity and disease resistance

（I）抗

（J）抗

平均差（I-J）标准误显著性

95 % 置信区间

| 病性 | 病性 |  |  |  | 下限 | 上限 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 高抗 | 抗病 | -0.721 | 7.353 | 0.923 | -15.864 | 14.422 |
|  | 耐病 | 0.105 | 5.579 | 0.985 | -11.386 | 11.59 |
|  | 感病 | -10.646 | 6.484 | 0.113 | -24.001 | 2.709 |
| 抗病 | 高抗 | 0.721 | 7.353 | 0.923 | -14.421 | 15.864 |
|  | 耐病 | 0.826 | 7.010 | 0.907 | -13.613 | 15.264 |
|  | 感病 | -9.925 | 7.750 | 0.212 | -25.887 | 6.037 |
| 耐病 | 高抗 | -0.105 | 5.579 | 0.985 | -11.595 | 11.386 |
|  | 抗病 | -0.826 | 7.010 | 0.907 | -15.264 | 13.613 |
|  | 感病 | -10.751 | 6.094 | 0.090 | -23.301 | 1.799 |
| 感病 | 高抗 | 10.646 | 6.484 | 0.113 | -2.709 | 24.001 |
|  | 抗病 | 9.926 | 7.750 | 0.212 | -6.037 | 25.887 |
|  | 耐病 | 10.751 | 6.094 | 0.090 | -1.799 | 23.301 |

所有抗病性等级组的POD活性之间无显著差异，耐病组的POD活性与感病组的

POD活性之间的显著性为0.090，在表中最小，说明这两组间的差异比其它组间的差异大，但不能区分所有抗病性等级组。

#### **5.2.4.3** 不同病级棉花品种（株系）**PAL**活性与抗病性的多重比较

对不同病级棉花品种（株系）PAL活性与抗病性进行多重比较，结果见表5-8。

*新疆农业大学博士学位论文*

表5-8 棉花PAL活性与抗病性的多重比较表

Table 5-8 Multiple comparisons between PAL activity and disease resistance

（I）抗病性

（J）抗病性

平均差（I-J）标准误显著性

95 %置信区间下限上限

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 免疫 | 高抗 | 0.805 | 0.480 | 0.111 | -0.204 | 1.814 |
|  | 抗病 | 1.153（\*） | 0.497 | 0.032 | 0.108 | 2.197 |
|  | 耐病 | 1.387（\*） | 0.469 | 0.008 | 0.402 | 2.371 |
|  | 感病 | 1.627（\*） | 0.469 | 0.003 | 0.642 | 2.611 |
| 高抗 | 免疫 | -0.805 | 0.480 | 0.111 | -1.814 | 0.204 |
|  | 抗病 | 0.348 | 0.385 | 0.379 | -0.461 | 1.156 |
|  | 耐病 | 0.582 | 0.348 | 0.112 | -0.149 | 1.312 |
|  | 感病 | 0.822（\*） | 0.348 | 0.03 | 0.092 | 1.552 |
| 抗病 | 免疫 | -1.153（\*） | 0.498 | 0.032 | -2.197 | -0.108 |
|  | 高抗 | -0.348 | 0.385 | 0.379 | -1.156 | 0.461 |
|  | 耐病 | 0.234 | 0.371 | 0.535 | -0.544 | 1.013 |
|  | 感病 | 0.474 | 0.371 | 0.217 | -0.304 | 1.253 |
| 耐病 | 免疫 | -1.387（\*） | 0.469 | 0.008 | -2.371 | -0.402 |
|  | 高抗 | -0.582 | 0.348 | 0.112 | -1.312 | 0.149 |
|  | 抗病 | -0.234 | 0.371 | 0.535 | -1.013 | 0.544 |
| 感病 0.240 | | | 0.331 | 0.478 | -0.456 | 0.936 |
| 感病 免疫 -1.627（\*） | | | 0.469 | 0.003 | -2.611 | -0.642 |
| 高抗 | | -0.822（\*） | 0.348 | 0.03 | -1.552 | -0.092 |

免疫组的PAL活性与抗病组的PAL活性有显著差异，平均差为1.153；免疫组的

PAL活性与耐病组的PAL活性有显著差异，平均差为1.387；免疫组的PAL活性与感病组的PAL活性有显著差异，平均差为1.627；高抗组的PAL活性与感病组的PAL活性有显著差异，平均差为0.822；其它抗病性等级组的PAL活性之间无显著差异，说明测定的PAL活性可以区分免疫与抗病、免疫与耐病、免疫与感病、高抗与感病这些不同抗病性等级的组，而不能区分其它抗病性等级组。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

## **5.3** 讨论

### **5.3.1** 不同抗病性棉花品种的**SOD**酶活性

郭海军等[156]研究发现，感病棉叶的SOD活性比健株棉叶低。本研究发现，高抗、抗病品种（株系）的SOD酶活性相对较高，介于110.854 U·g -1鲜叶至131.875 U·g -1 鲜

叶之间；高抗品种（株系）中，新海26号酶活最高，达130.775 U·g -1鲜叶，新海16 号

酶活最低，为110.854 U·g -1鲜叶，新海20号、新海22号、M44-16、新陆早13号、新

陆早26号与新海26号的酶活接近，新海17号与新海16号酶活接近，高抗组平均酶活

为125.795 U·g -1鲜叶。表现出新陆早13号、新陆早26号广适应性的特点。

抗病品种（株系）中，M37-86酶活最高，达131.875 U·g -1鲜叶，辽棉18号酶活最低，为112.565 U·g -1鲜叶，M37-128酶活131.387，与M37-86酶活接近，抗病组平均酶活为125.184 U·g -1鲜叶，接近高抗组平均酶活。

耐病品种（株系）中，新陆早23号酶活最高，达130.042 U·g -1鲜叶，苏K202酶活

最低，为79.687 U·g -1鲜叶，当相对抗病指数介于21.22～26.98之间时，酶活介于109.631 U·g -1鲜叶～131.753 U·g -1鲜叶，从苏K202（耐病）开始，SOD酶活性明显减少，当相对抗病指数介于32.93～33.7之间时，酶活介于79.687 U·g -1鲜叶～84.943 U·g -1鲜叶，耐病组平均酶活为111.798 U·g -1 鲜叶。可见耐病棉花品种随着相对抗病指数的增加，

SOD酶活降低。

感病品种（株系）中，硕丰1号酶活最高，达126.987 U·g -1鲜叶，M37-165酶活最

低，为76.51 U·g -1鲜叶。M37-73株系是新海20号和硕丰1号杂交后代，酶活123.198 U·g -1

鲜叶，接近新海20号酶活129.675 U·g -1鲜叶和硕丰1号酶活126.987 U·g -1鲜叶，感病

组平均酶活为95.250 U·g -1鲜叶。

至相对病情指数最高的M44-211, SOD酶活性减少至66.366 U·g -1鲜叶。综合来看，感病品种（株系）的SOD酶活性比其他品种（株系）低，感病性越高SOD酶活性越低，酶活性变化与品种感病性基本一致。

M37-73株系是新海20号和军棉1号杂交后代，酶活123.198 U·g -1鲜叶，接近新海

20号酶活129.675 U·g -1鲜叶和硕丰1号酶活126.987 U·g -1鲜叶。硕丰1号，品种属陆

*新疆农业大学博士学位论文*

地棉特早熟类型，植株塔型，Ⅰ、Ⅱ式果枝，株型好，叶色浓绿，叶片较小，掌状五裂，缺刻深，叶层分布合理，通透性良好，结铃早且集中，棉铃圆形，中等略小。吐絮早、畅、快且集中，含絮力适中，不掉絮。生长稳健，发育进程快，早熟不早衰，青枝绿叶吐白絮，絮白，弹性好。生育期104～119 d，经试验品比，生育期较新陆早10号早熟 6

d，较新陆早13号早熟4.6 d。抗枯萎病病指9.6，耐黄萎病病指32.1。籽棉单铃重4.8～5.3 g，衣分43.5 %～45.4 %，纤维主体长度29～29.5 mm，比强度27～29 cn/tex，马克隆值4.1[157]。可能是这些生长势旺盛，综合性状好的特点赋予硕丰1号较高的SOD酶活。

### **5.3.2** 不同抗病性棉花品种的**POD**酶活性

郭海军等[156]研究发现，感病棉叶的POD活性比健株棉叶低。田秀明等[41]研究发现，陆地棉不同抗性品种幼芽内过氧化物酶活性差异明显，抗黄萎病品种幼芽内酶活性低。而纪好勤等[158]研究发现，抗黄萎病品种的POD活性比感病品种高；这与本试验结论较一致。

杨玉锋[159]研究发现，抗病品种的POD活性比感病品种低。

本试验发现，不同抗性的棉花品种（株系）的POD活性差异很大。高抗品种（株系）中，陆地棉新陆早26号的POD酶活性最高，达到2.867 U·g -1鲜叶・min -1, M44-83的POD酶活性最低，为0.32 U·g -1鲜叶・min -1，平均值1.053 U·g -1鲜叶・min -1。

抗病品种（株系）中，陆地棉新陆早48号酶活最高，达到3.137 U·g -1鲜叶・min -1，这也是所有品种（株系）中最高的POD活性，陆地棉辽棉18号达到3.077 U·g -1鲜叶・min -1, M37-128的POD活性最低，为0.45 U·g -1鲜叶・min -1，平均值2.221 U·g -1鲜叶・min -1。陆地棉新陆早48号是近年培育的抗病棉花品种，长势旺；陆地棉辽棉18号属早熟品种，长势旺而稳键，开花结铃集中，开絮畅而集中，含絮性适中，该品种高抗枯黄萎病，

2000～2001年度沈阳农业大学植保系进行枯黄萎病鉴定，两年平均枯萎病指0.38，黄萎病指7.15，评定为高抗（HR）；对苗病和铃疫病也有较强抗性；丰产性突出，纤维品质优良，适应性广[71]。可能是长势旺、广谱抗病性的特性赋予新海48号、辽棉18号高的

POD活性。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

耐病品种（株系）中，新陆早42号的酶活最高，达到1.753 U·g -1鲜叶・min -1, M37-204的POD酶活性最低，为0.113 U·g -1鲜叶・min -1，这也是POD活性最低值，平均值0.860 U·g -1鲜叶・min -1。

感病品种（株系）POD 活性普遍较低，陆地棉军棉 1 号的酶活最高，达到 1.383 U·g -1

鲜叶·min -1， M37-73 的 POD 活性最低，为 0.237 U·g -1 鲜叶·min -1，平均值 0.872 U·g -1

鲜叶・min -1。军棉1号以c1470为母本，五一大铃、352l、147-夫、早落叶、2u3、c1470等品种为父本混合授粉多次选择与1986年育成。其特征特性为：生育期130 d左右，株高70～80 cm，单铃籽棉重6～8g，千粒重125 g左右，衣分36～40 %，纤维长度30～33 mm，易抓苗，适应性强，耐碱、耐瘠薄，结铃性较原推广品种为好。在蕾铃后期植株健壮，不早衰，尤其是在肥力较低的条件下比c1470长势壮；较原推广品种c1470 平

均增产 10.24 ％[160]。

综合来看，抗病品种（株系）的POD活性最高，耐病品种（株系）、感病品种（株系）POD活性普遍较低。新疆近年来自育品种新陆早26号、新陆早33号、新陆早42号、新陆早48号的POD活性较高，可能与近年来注重抗病高产品质好的育种目标有关。

### **5.3.3** 不同抗病性棉花品种的**PAL**酶活性

杨玉锋[159]研究发现，抗病品种的POD活性比感病品种低，抗病品种的PAL活性比感病品种高，本试验可以看出不同抗性的棉花品种（株系）的PAL活性不同。综合来看，感病性越高，PAL活性越低。这与前人研究结论相符。

免疫品种（株系）中，M37-231的酶活为2.56 U·g -1鲜叶，新陆早20号的酶活为2.35

U·g -1鲜叶，平均值2.46 U·g -1鲜叶。

高抗品种（株系）的PAL酶活性较高，其中新海14的酶活最高，为2.45 U·g -1 鲜

叶，M44-83的酶活最低，为0.85 U·g -1鲜叶，平均值1.65 U·g -1鲜叶。

抗病品种（株系）中，M37-86的酶活最高，为2.55 U·g -1鲜叶，M37-128的酶活最低，为0.79 U·g -1鲜叶，平均值1.30 U·g -1鲜叶。从新海24号（抗病）开始，PAL酶活

性明显降低至0.98 U·g -1鲜叶，并且均低于1.87 U·g -1鲜叶。

耐病品种（株系）中，M44-158的酶活最高，为1.87 U·g -1鲜叶，新陆早1号的酶

*新疆农业大学博士学位论文*

活最低，为0.44 U·g -1鲜叶，平均值1.07 U·g -1鲜叶。

感病品种（株系）中，M44-211的酶活最高，为1.00 U·g -1鲜叶，M37-73的酶活最低，为0.55 U·g -1鲜叶，平均值0.83 U·g -1鲜叶。

新疆近年来自育品种新陆早20号、新陆早36号的PAL酶活较高，可能与近年来注重抗病高产品质好的育种目标有关。

### **5.3.4** 不同病级棉花品种（株系）**SOD**活性、**POD**活性、**PAL**活性与抗病性相关关系

本试验结果显示，SOD活性与相对病情指数、病级呈极显著负相关，相关指数分别为-0.690和-0.536，即SOD活性越高，抗病性越高；SOD活性越低，抗病性越低。POD活性与病级无显著相关关系。PAL活性与相对病情指数和病级呈极显著负相关，相关指数分别为-0.561和-0.645，即PAL活性越高，抗病性越高；PAL活性越低，抗病性越低。反映SOD酶活与PAL酶活随抗病性增高而增高，可能作为棉花黄萎病抗性的鉴定指标。

### **5.3.5** 不同病级棉花品种（株系）**SOD**活性、**POD**活性、**PAL**活性与抗病性多重比较

高抗组的SOD活性与感病组的SOD活性有显著差异，平均差为30.545；抗病组的

SOD活性与感病组的SOD活性有显著差异，平均差为29.934；其它抗病性等级组的SOD活性之间无显著差异，说明测定的SOD活性可以区分高抗与感病、抗病与感病这些不同抗病性等级的组，不能区分其它抗病性等级组。

所有抗病性等级组的POD活性之间无显著差异，耐病组的POD活性与感病组的

POD活性之间的显著性为0.090，在表中最小，说明这两组间的差异比其它组间的差异大，但不能区分所有抗病性等级组。

免疫组的PAL活性与抗病组的PAL活性有显著差异，平均差为1.153；免疫组的

PAL活性与耐病组的PAL活性有显著差异，平均差为1.387；免疫组的PAL活性与感病组的PAL活性有显著差异，平均差为1.627；高抗组的PAL活性与感病组的PAL活性有显著差异，平均差为0.822；其它抗病性等级组的PAL活性之间无显著差异，说明测定的PAL活性可以区分免疫与抗病、免疫与耐病、免疫与感病、高抗与感病这些不同抗病性等级的组，而不能区分其它抗病性等级组。

对于使用SOD、POD、PAL 活性来探讨棉花对黄萎病抗性时，如果设定指标的范

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

围合适，可见区分抗病性不同的等级。

试验表明，测定SOD、POD和PAL活性都有一定的限制，受环境影响大，对取样时间和取样部位要求高，在探讨这些抗性因素时，应考虑到它们表达的时间特征，对抗性机制进行多方位认识。

*新疆农业大学博士学位论文*

# 第6章 棉花黄萎病抗性的分子标记

要想获得棉花稳产高产，必须具备优良的种子品质、栽培条件、土壤养分、环境条件等多种条件，而且缺一不可，而病虫害是不易控制的生物因素，棉花黄萎病极大地影响棉花生产。

自Carpenter 1914年首次报道在美国弗吉尼亚发现棉花黄萎病以来，现已遍及世界各产棉国。美国在1952年至1990年近40年中，平均每年由于黄萎病危害而损失全国棉花总产的2.23 % [161,162]。黄萎病在1982年已蔓延到中国18个省（市、区）的477个县，发病面积达148.2万hm2 [163]。1993年全国黄萎病大爆发，发生面积已达270万hm2，严重病田

67万hm2，当年损失皮棉10万t [164]。1995年、1996年，黄萎病在我国连续大发生，重病田病株率高达80％～90 %，并且出现发病连片，病株落叶变成光秆的现象，危害极为严重[165]。黄萎病严重威胁和阻碍着棉花的生产与发展。近年来，黄萎病在我国三大棉区连续流行危害，且有逐年加重的趋势[166]。

近年来，分子生物学技术在棉花上的应用，为通过分子数量遗传学手段寻找棉花抗黄萎病QTLs基因、创造新抗源打下了坚实的基础[167, 168]。其中，挖掘与重要农艺性状基因紧密连锁的分子标记，是探寻棉花抗黄萎病QTLs基因的有效方法，是分离、克隆抗病相关基因，从而进行分子标记辅助选择的基础[132]。传统的抗黄萎病鉴定方法是先接种病原菌，再鉴定抗病性，判断是否存在某一抗性基因，由于不同抗性基因间可能存在上位作用或遮盖作用，难以准确区分和鉴定抗性基因。分子标记为实现对基因型的直接选择提供了可能。如果某个分子标记与抗病相关基因紧密连锁，那么检测分子标记基因型，就能够检测并获得抗病相关基因[169]。采用以生化与分子标记辅助育种的新方法可以显著提高对黄萎病的鉴定，从而育出优良品种[170]。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

## **6.1** 材料与方法

### **6.1.1** 试验材料

#### **6.1.1.1** 供试棉花

本试验选用海岛棉抗病品种新海20 号和陆地棉感病品种硕丰1 号及其杂交后代

M37群体的F2:3家系50个株系，陆地棉抗病品种辽棉18号和陆地棉感病品种军棉1号及其杂交后代M44群体的F2:3家系85个株系，作为供试材料。选择的单株为：M37-128-C、M37-158-D、M37-128-B、M37-165-D、M37-195-B、M37-139-D、M37-121、M37-120-B、M37-222-C、M37-61-B、M37-188-D、M37-76、M37-219-D、M37-100-E、M37-116-B、M37-8、M37-101、M37-85、M37-192、M37-205、M37-61、M37-216、M37-73、M37-66、M37-158-B、M37-131、M37-101-B。

#### **6.1.1.2** 引物

10对RGA引物，由上海生工生物技术公司合成，RGA引物序列见附录表1；21

对SSR对引物，由北京六合华大基因科技股份有限公司合成，SSR引物序列见附录表2；

SRAP引物14个上游引物和17个下游引物两两组合成238对SRAP引物，由北京六合华大基因科技股份有限公司合成，SRAP引物序列见附录表3。上述引物序列参照LiG等的标准序列。

#### **6.1.1.3** 试验试剂

所用试剂均为分析纯，CTAB、EDTA、SDS、Tris、β-Mercaptoethanol、PVP40购自Sigma公司，其他化学试剂为国产分析纯，除PVP40、SDS外，其余有关提取试剂均121 ℃高温灭菌20 min. Taq DNA聚合酶（5 U·μl-1）、10×buffer(MgCl2-free)、MgCl2 25 mM、dNTP（10 Mm each）；丙烯酰胺、亚甲基双丙烯酰胺、TEMED、Tris、

Boric·Acid、EDTA·Na 2、(NH4) 2S2O8等产自Sanger公司，其它试剂均为国产。引物的稀释参见引物合成报告单，先稀释为100μM的母液-20℃放置。

提取缓冲液：100 mmol·L -1 Tris-HC1, pH=8.0；50 mmol·L -1 EDTA，pH=8.0; 1.0 mol·L

-1 NaCl；2 ％SDS；2 ％PVP40; 30μL·ml-1 β-Mer（现用现加）；10 ％CTAB Buffer: 100 mmol·L -1 Tris-HCl，pH=8.0；50 mmol·L -1 EDTA，pH=8.0; 10％CTAB；2 ％PVP40

*新疆农业大学博士学位论文*

### **6.1.2** 试验方法

#### **6.1.2.1** 田间黄萎病抗性鉴定

见**2.1.2.6**和**2.1.2.8.**

#### **6.1.2.2** 棉花总**DNA**提取方法及步骤

参见曲延英方法[171]。

（1）称取0.2 g新鲜棉花叶片，置于玻璃研钵中，加入液氮迅速研磨，加3次液氮，

研磨3次成为灰白色粉末状，快速装入1.5 ml离心管；

（2）将提取缓冲液在65℃水浴中预热，加入800μl于上述离心管中，混匀，继续于

65℃水浴，30～50 min；

（3）加入1/3体积，约300μL冰冷的5 mol·L -1 KAC，冰浴30～60 min，重量平衡后4℃离心，12000 rpm 10 min；

（4）取上清，加入1/5体积，约200μl的10％CTAB Buffer，混匀，65℃水浴10～20 min，取出室温冷却5 min；

（5）加入等体积的氯仿/异戊醇（24: 1）抽提1～2次，至界面清澈，室温10000 rpm

离心5 min；

（6）取上清，加入2/3体积异丙醇，混匀，室温放置30～60 min，6000～8000 rpm

室温离心5 min；

（7）弃上清，用70％乙醇洗涤沉淀，反复洗涤两次。抽干沉淀，加400μl ddH2O

灭菌水溶解；

（8）加1/10体积3 mol·L -1 NaAC（pH=5.2），加2倍体积无水乙醇，混匀，-20 ℃放置10 min, 6000 rpm室温离心5 min，用70％乙醇反复洗涤沉淀两次，真空抽干，加适量TE溶解，-20 ℃放置备用。

#### **6.1.2.3** 琼脂糖凝胶电泳检测**DNA**

（1）琼脂糖凝胶电泳检测试剂的配制

1×TBE（pH=8.0）母液：Tris 54 g

Boric·Acid 27.5 g

0.5 mol·L-1 EDTA·Na 2 20 ml

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

加dd H2O定容至5000 ml

（2）1 %的琼脂糖凝胶电泳

1×TBE，5μl样品，设定稳压为120 V，电流为100 mA，在溴化乙淀中浸泡10 min，用紫外凝胶成像仪观察。

#### **6.1.2.4** **RGA-PCR**反应体系及扩增程序

（1）RGA-PCR反应体系

表6-1 10μl RGA-PCR反应体系

Table 6-1 Reaction system of 10μl RGA-PCR

| DNA 模板  （50 ng·μl-1） | 10× PCR  buffer | dNTP  （10 μmol·L-1） | 引物（F+R）  （5 μmol·L-1） | Taq 聚合酶  （5 U·μl-1） | ddH2O  （μl） | MgCl2 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1.00 | 1.00 | 0.20 | 1.00 | 0.20 | 5.80 | 0.80 |

（2）RGA-PCR扩增程序

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 预变性 | 95 | ℃ | 5 min |  |
| 变性 | 95 | ℃ | 1 min |
| 复性 | 62 | ℃ | 1 min | 35 个循环 |
| 延伸 | 72 | ℃ | 1 min |  |
| 延伸 | 72 | ℃ | 7 min |  |
| 保存 | 4 | ℃ | + ∞ |  |

#### **6.1.2.5** **SSR-PCR**反应体系及扩增程序

（1）SSR-PCR反应体系

表6-2 10μl SSR-PCR反应体系

Table 6-2 Reaction system of 10μl SSR-PCR

| DNA 模板(  50 ng·μl-1) | 10× PCR  buffer | dNTP  （10 μmol·L-1） | 引物（F+R）  （5 μmol·L-1） | Taq 聚合酶(5  U·μl-1) | ddH2O  （μl） | MgCl2 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1.00 | 1.00 | 0.20 | 1.00 | 0.20 | 5.10 | 1.50 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | 新疆农业大学博士学位论文 |
|  |  |  |  |  |
| （2） SSR-PCR 扩增程序  预变性 | 95 | ℃ | 5 min |  |
| 变性 | 95 | ℃ | 1 min |  |
| 复性 | 55 | ℃ | 1 min | 35 个循环 |
| 延伸 | 72 | ℃ | 1 min |  |
| 延伸 | 72 | ℃ | 7 min |  |
| 保存 | 4 | ℃ | + ∞ |  |

#### **6.1.2.6** **SRAP-PCR**反应体系及扩增程序

（1）SRAP-PCR反应体系

表6-3 10μl PCR反应体系

Table 6-3 Reaction system of 10μl PCR

| DNA 模板  （50 ng·μl-1） | 10× PCR  buffer | dNTP  （10 μmol·L-1） | 引物（F+R）  （5 μmol·L-1） | Taq 聚合酶  （5 U·μl-1） | ddH2O  （μl） | MgCl2 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1.00 | 1.00 | 0.25 | 1.00 | 0.20 | 5.8 | 0.75 |

（2）SRAP-PCR扩增程序

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 预变性 | 94 | ℃ | 5 min |  |
| 变性 | 94 | ℃ | 1 min |
| 复性 | 35 | ℃ | 1 min | 5 个循环 |
| 延伸 | 72 | ℃ | 1 min |  |
| 变性 | 94 | ℃ | 1 min |  |
| 复性 | 50 | ℃ | 1 min | 35 个循环 |
| 延伸 | 72 | ℃ | 1 min |  |
| 延伸 | 72 | ℃ | 10 min |  |
| 保存 | 4 | ℃ | + ∞ |  |

#### **6.1.2.7** **SRAP-PCR**产物的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

（1）试剂准备

1）30 %非变性聚丙烯酰胺母液：

丙烯酰胺：亚甲基双丙烯酰胺（29:1）丙烯酰胺290 g

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

亚甲基双丙烯酰胺10 g

加ddH2O定容至1000 ml （定性滤纸过滤4 ℃，放置）；

2）5×TBE（pH=8.0）母液：Boric·Acid 27.5 g

Tris 54 g

0.5 mol·L -1 EDTA·Na 2 20 ml

加ddH2O定容至1000 ml；

3）10 %(NH4) 2S2O8液（APS）：1 g (NH4) 2S2O8定容至10 ml，分装，-20 ℃放置，备用；

4）1 %Na2S2O3液100 ml: 1 g Na2S2O3定容至100 ml，4℃放置；

5）固定液配方1 L：

冰乙酸5 ml

无水乙醇50 ml

加ddH2O定容至500 ml ；

6）染色液1L: 0.2 %的AgNO3溶液；

7）显色液1L: 1.4 %的NaOH溶液，使用前加入10.0 m1 37 %甲醛；

8）终止显色液1 L: 0.75 % Na2CO3;

9）10 %非变性聚丙烯酰胺凝胶的配置[172]，使用试剂见表6-4。

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 胶浓度 | 30 %非变性聚丙烯酰胺母液 | 5×TBE | APS | TEMED | ddH2O | 体积 |
| 10 % | 13.3 ml | 10 ml | 700 μl | 30 μl | 25.5 ml | 50 ml |

表6-4 10 %非变性聚丙烯酰胺凝胶配制表Table 6-4 Ingredient of 10 % SDS-PAGE gel

（2）电泳准备

用清水浸泡玻璃板和梳子，纱布反复擦洗干净，清水和蒸馏水依次冲洗，自然晾干。取一对玻璃板，合理组装，用琼脂糖将玻璃板的底部封住，底封好后，将玻璃板固

定在电泳槽中。按上述凝胶的配方，配制凝胶并立刻灌胶，必要时可以用针赶走气泡，避免凝胶中残留气泡，灌满凝胶后，将梳子插在玻璃上方夹缝。静置10 min待凝。

电泳前要在PCR扩增产物中加入2μl加样缓冲液（0.25 %溴酚蓝，0.25 %二甲苯青

*新疆农业大学博士学位论文*

FF，40 %蔗糖水溶液）。

（3）电泳

拔掉梳子，分别在负极电泳槽和正极电泳槽中加入l×TBE电泳缓冲液。缓冲液液面一定要超过短玻璃板上沿。每个点样孔加2.50μl样品，200 V恒电压，电流400 mA，功率100 W，电泳约1 h。电泳结束后，轻轻将两块玻璃板分开，可以在固定液中轻微摇晃，促使玻璃板与凝胶分离。

（5）银染显色

1）电泳结束取胶，置于固定液中固定10～12 min；

2）倒去固定液，用纯蒸馏水冲洗一次，加入染色液染色10 min；

3）再用纯蒸馏水洗两次，在第二次冲洗中加入10mg/ml的Na2S2O3200 ul·L -1；

4）倒去蒸馏水，加入显影液，在摇床上以30 rpm轻摇至条带清晰；

5）取出胶片用保鲜膜包裹，记录编号在X胶片观察灯上读带记录[173]。

6）统计带型或照相。

### **6.1.3** **SRAP-PCR**产物统计

统计M37株系扩增产物与亲本扩增产物一致的后代数量，并分别计算与抗病性符合数及与株高符合数。

### **6.1.4** **SRAP**差异条带分析

#### **6.1.4.1** 两亲本间多态性引物筛选的标准

在同一引物且其他的试验条件完全一致的情况下，两亲本在扩增产物条带存在明显差异的引物记为一对多态性引物。对新海20号与硕丰1号、辽棉18号与军棉1号这两对亲本进行亲本间多态性引物筛选。

#### **6.1.4.2** 多态性引物在抗感基因池中的检验

根据M37株系的单株病级，挑出M37株系中病级为0的10个单株DNA，并将其稀释到同一浓度混合形成抗病基因池，同样将病级为4的10个单株DNA用同种方法制成感病基因池。将挑选出的多态性引物在其他试验条件完全一致的情况下同时对亲本新海20与硕丰1号和杂交后代抗感基因池进行扩增，找到存在稳定性差异的多态性引物。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

按照公式（6-1）计算分子量：

logMW=K-bX (6-1)

注：MW为分子量，X为迁移率，K、b均为常数。

#### **6.1.4.3** 差异片段的回收及二次**PCR**扩增

用蒸馏水浸泡聚丙烯酰胺凝胶板，从凝胶上切下差异条带，放入0.5 ml离心管中，加入40μl PCR buffer，80℃水浴30 min, 12000 rpm离心30 s，吸取1μl上清液作为模板进行二次PCR扩增[174]。琼脂糖凝胶电泳检测扩增后的产物，并将二次扩增后的产物送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。

## **6.2** 结果与分析

### **6.2.1** **M37**单株田间抗病性调查结果

对M37单株在田间进行黄萎病抗性鉴定，结果见下表6-5。

表6-5 M37单株田间抗病性鉴定结果表

Table 6-5 Identify results of M37 single plant resistance toVerticillium Wilt in field

| 单株序号 | 单株名称 | 病级 | 抗病性 | 单株序号 | 单株名称 | 病级 | 抗病性 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | M37-128-C | 1 | S | 15 | M37-116-B | 1 | S |
| 2 | M37-158-D | 1 | S | 16 | M37-8 | 0 | I |
| 3 | M37-128-B | 0 | I | 17 | M37-101 | 0.6 | R |
| 4 | M37-165-D | 2 | S | 18 | M37-85 | 0.2 | R |
| 5 | M37-195-B | 1 | S | 19 | M37-192 | 0.4 | R |
| 6 | M37-139-D | 2 | S | 20 | M37-205 | 0.2 | R |
| 7 | M37-121 | 1 | S | 21 | M37-61 | 0.8 | R |
| 8 | M37-120-B | 1 | S | 22 | M37-216 | 1.6 | S |
| 9 | M37-222-C | 0 | I | 23 | M37-73 | 0.4 | R |
| 10 | M37-61-B | 0 | I | 24 | M37-66 | 0.4 | R |
| 11 | M37-188-D | 4 | S | 25 | M37-158-B | O | I |
| 12 | M37-76 | 1 | S | 26 | M37-131 | 0.6 | R |
| 13 | M37-219-D | 2 | S | 27 | M37-101-B | 2 | S |
| 14 | M37-100-E | 0 | I |  |  |  |  |

I：免疫R：抗病S：感病

*新疆农业大学博士学位论文*

I: Immunity R: Resistent S: Susceptible

27个M37单株中，免疫的有6株，占22.22 %；抗病的有8株，占29.63 %；感病

的有13株，占48.15 %。

### **6.2.2** **M37**单株株高

田间测量27株M37单株的株高，并构建高池（株高超过60 cm）和矮池（株高低于60 cm），结果见下表6-6。

表6-6 M37单株株高及高池、矮池表

Table 6-6 Height, high pool and short pool of M37 generations

| 株高超过 60 cm 构成的高池 | | | 株高低于 60 cm 构成的矮池 | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 单株序号 | 单株名称 | 株高（cm） | 单株序号 | 单株名称 | 株高（cm） |
| 1 | M37-128-C | 95.6 | 2 | M37-158-D | 53.8 |
| 3 | M37-128-B | 99.8 | 4 | M37-165-D | 49.6 |
| 5 | M37-195-B | 101.2 | 8 | M37-120-B | 38.9 |
| 6 | M37-139-D | 74.8 | 10 | M37-61-B | 48.9 |
| 7 | M37-121 | 68.6 | 11 | M37-188-D | 53.2 |
| 9 | M37-222-C | 62.1 | 15 | M37-116-B | 35.2 |
| 12 | M37-76 | 62.2 | 17 | M37-101 | 50.0 |
| 13 | M37-219-D | 80.4 | 18 | M37-85 | 48.9 |
| 14 | M37-100-E | 73.2 | 21 | M37-61 | 56.3 |
| 16 | M37-8 | 69.2 | 23 | M37-73 | 54.7 |
| 19 | M37-192 | 84.8 | 24 | M37-66 | 51.2 |
| 20 | M37-205 | 78.8 | 26 | M37-131 | 59.8 |
| 22 | M37-216 | 85.5 | 27 | M37-101-B | 46.0 |
| 25 | M37-158-B | 64.3 |  |  |  |

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

株高最高的是M37-195-B，为101.2 cm，株高最矮的是M37-116-B，为35.2 cm，

27个单株的平均株高64.70；其中株高超过60 cm的有14株，构建高池的平均株高78.61

cm，株高低于60 cm的有13株，构建矮池的平均株高49.73 cm。

### **6.2.3** 两个亲本筛选引物

用78对SRAP引物对新海20号和硕丰1号进行扩增，表现不同条带的有7对引物。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



注：M. 分子量标记D2000; 1. 硕丰1号me1×em3, 2. 新海20号me1×em3, 3. 硕丰1号me1×em11, 4. 新海20号me1×em11, 5. 硕丰1号me2×e m1，6. 新海20号me2×em1, 7. 硕丰1号me3×em5, 8. 新海20号me3×em5, 9. 硕丰1号me3×em13, 10. 新

海20号me3×em13, 11. 硕丰1号me4×em11, 12. 新海20号me4×em11, 13. 硕丰1号me5×em7, 14. 新海20号me5×em7

图6-1 两个亲本在不同引物下的PCR扩增产物

Fig. 6-1 PCR production of two parents using different primers

在新海20号和硕丰1号之间能扩增出不同条带的引物有7对，分别是me1×em3、me1×em11、me2×em1、me3×e m5、me3×e m13、me4×em11、me5×e m7。可以使用这7对引物在杂交后代群体单株中进行扩增，筛选分子标记。

*新疆农业大学博士学位论文*

### **6.2.4** 多态性引物在群体单株的验证

#### **6.2.4.1** 父本新海**20**号与**M37**后代单株的**SRAP-PCR**产物

使用7对能在抗感性不同的亲本间扩增出不同条带的引物，对M37群体单株进行

SRAP-PCR，其中与父本新海20号扩增出相同条带的如图6-2。



注：M. 分子量标记D2000, 1. M37-128-C, 2. M37-158-D, 3. M37-128-B, 4. M37-195-B, 5. M37-121, 6. M37-219-D, 7. M37-85,

8. M37-192, 9. M37-61, 10. M37-73, 11. M37-61, 12. M37-101-B

图6-2 M37后代中与父本新海20号扩增出相同条带的PCR产物（引物me1×em11）Fig. 6-2 PCR production of M37 generations same with male（Xinhai20）

使用SRAP引物me1×em11，扩增M37-128-C、M37-158-D、M37-128-B、M37-195-B、M37-121、M37-219-D、M37-85、M37-192、M37-61、M37-73、M37-61、M37-101-B 单

株的总DNA，扩增出与父本新海20号相同条带800 bp、750 bp、500 bp、490 bp、410 bp、330 bp、300 bp、240 bp、230 bp、210 bp、190 bp、150 bp。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

#### **6.2.4.2** 母本硕丰**1**号与**M37**后代单株的**SRAP-PCR**产物

使用7对能在抗感性不同的亲本间扩增出不同条带的引物，对M37群体单株进行

SRAP-PCR，其中与母本硕丰1号扩增出相同条带的如图6-3。



注：1. M37-216, 2. M37-76, 3. M37-76, 4. M37-116-B, 5. M37-116-B, 6. M37-8, 7. M37-8, 8. M37-101, 9. M37-101, 10. M37-205,

11. M37-205, 12. M37-216, 13. M37-216, M. 分子量标记D2000

图6-3 M37后代中与母本硕丰1号扩增相同条带的PCR产物（引物me1×em11）Fig. 6-3 PCR production of M37 generations same with female Shuofeng1（Primer me1×em11）

使用SRAP引物me1×em11，扩增M37-216、M37-76、M37-116-B、M37-8、M37-101、

M37-205、M37-216单株的总DNA，扩增出与母本硕丰1号相同条带800 bp、750 bp、500 bp、90 bp、410 bp、330 bp、250 bp、240 bp、230 bp、210 bp、190 bp、150 bp。

*新疆农业大学博士学位论文*

### **6.2.5** **SRAP-PCR**产物统计结果

统计M37扩增产物与亲本扩增产物一致的后代数量，并分别计算与抗病性符合率及平均株高，结果如表6-7。

表6-7 M37后代SRAP扩增产物与亲本一致的单株及与抗病性符合数和与株高符合数

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SRAP 引物 | 与抗病父本条带一致的 M37 后代单株 | 与抗病  性符合数 | 与株高  的高池符合数 | 与感病母本条带  一致的 M37 后代单株 | 与抗病  性符合数 | 与株高的  矮池符合数 |
| me1× em3 | **1，2，3，5，12，13，**  **15，16，18，19，20，**  **23，24** | **7** | **8** | 7，17，21 | 1 | 2 |
| me1× em11 | **1，2，3，5，13，18，**  **19，21，23，27** | **5** | **5** | 12，15，16，17，  20，22 | 3 | 2 |
| me2× em1 | 1，2，3，5，12，13，  18，19，20，22，23，  27 | 5 | 6 | 15，16，17，21，  27 | 1 | 4 |
| me3× em5 | 1，2，3，5，13，15，  18，19，20，22，23，  27 | 5 | 7 | 12，16，17，21 | 1 | 3 |
| me3× em13 | 1，2，3，5，13，18，  19，22，23，27 | 4 | 6 | 7，12，15，16，  17，20，21 | 3 | 3 |
| me4× em11 | 1，2，3，5，13，18，  19，20，22，23，27 | 5 | 6 | **12，15，16，17** | **2** | **2** |
| me5× em7 | **1，2，3，5，18，19，**  **22，23** | **4** | **5** | 7，12，13，15，  16，17，20，21，  27 | 5 | 4 |

Table 6-7 SRAP production of M37 generations according with parent，number according with disease resistence and height

注：加粗数字表示抗病性符合数，与株高的符合数均≥50 %

Note: Thick number according with disease resistence and height are more than fifty percent

从表6-7可以看出，与父本（抗病海岛棉新海20号）扩增产物一致的后代数量较多，有9~14个，且与抗病性符合数较高，介于4~7之间，且与株高的高池符合数较高，介于5~8之间；其中me1×em3，me1×em11，me5×em7这三个引物的扩增结果与抗病性符合数，与株高的高池符合数均≥50 %。

与母本（感病陆地棉硕丰1号）扩增产物一致的后代数量较少，仅3~9个，与抗病性符合率较低，介于1~5之间，与矮池符合率低，介于2~4之间，均低于与抗病父本扩增产物一致后代的对应指标；其中me5×em7扩增结果与抗病性符合数、与株高的矮池

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

符合数均≥50 %。可见，用这4对SRAP引物较易筛选出与黄萎病抗性符合的棉花材料。

### **6.2.6** **M37**扩增结果与抗病性符合率及株高符合率的相关关系

计算表6-6中数据的平均值、标准差和相关关系，结果如表6-8。

表6-8 M37抗病性符合数及株高符合数的平均值、标准差和相关关系

Table 6-8 Mean, SD and correlation between number according with disease resistence and Height

|  | 抗病单株 | 感病单株 |
| --- | --- | --- |
| 抗病性符合数 | 5.000±1.000 | 2.286±1.496 |
| 株高符合数 | 6.143±0.169 | 2.857±0.900 |
| 抗病性符合数与株高  符合数的相关系数 | 0.780\* | 0.283 |

从表6-8可以看出，抗病单株抗病性符合数的标准差比感病单株的抗病性符合数的标准差小，株高符合数的标准差也小；抗病单株扩增产物与抗病性符合数及与株高符合数的相关关系达到0.780，说明株高既与抗病性显著相关，又与抗病性共同遗传，控制株高的基因与抗病性基因有一定连锁关系。

### **6.2.7** **M37**株系病情调查结果

M37株系的所有单株病级如表6-9所示。

表 6-9 M37株系的单株病级表

Table 6-9 Disease degree of M37 generations

| 株系名称 | 第一株 | 第二株 | 第三株 | 第四株 | 第五株 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 37-8 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 37-18 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| 37-25 | 0 | 0 | 1 | 0 | 4 |
| 37-26 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 |
| 37-37 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| 37-59 | 1 | 2 | 3 | 3 | 0 |
| 37-66 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 |
| 37-73 | 3 | 4 | 3 | 2 | 3 |
| 37-85 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 37-86 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| 37-94 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 37-96 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |

*新疆农业大学博士学位论文*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 续表6-9 |  |  |  |  |  |
| 37-98 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 37-101 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| 37-109 | 4 | 无 | 4 | 3 | 3 |
| 37-116 |  |  |  |  |  |
| 37-119 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 37-120 | 2 | 0 | 2 | 3 | 0 |
| 37-121 | 2 | 无 | 2 | 2 | 无 |
| 37-122 | 1 | 2 | 无 | 2 | 2 |
| 37-124 | 3 | 无 | 4 | 无 | 4 |
| 37-126 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 |
| 37-128 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| 37-131 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| 37-146 | 0 | 0 | 3 | 3 | 0 |
| 37-144 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 |
| 37-149 | 0 | 2 | 0 | 2 | 3 |
| 37-151 | 无 | 无 | 3 | 无 | 4 |
| 37-156 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 37-158 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 37-163 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 37-165 | 2 | 无 | 无 | 2 | 无 |
| 37-168 | 0 | 1 | 1 | 4 | 3 |
| 37-172 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 37-175 | 0 | 3 | 0 | 4 | 0 |
| 37-179 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 |
| 37-181 | 0 | 3 | 0 | 0 | 4 |
| 37-188 | 0 | 2 | 4 | 3 | 0 |
| 37-189 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 |
| 37-192 | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| 37-198 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 37-200 | 2 | 2 | 0 | 3 | 0 |
| 37-204 | 2 | 0 | 3 | 0 | 2 |
| 37-205 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| 37-219 | 4 | 0 | 3 | 3 | 0 |
| 37-220 | 0 | 3 | 0 | 3 | 4 |
| 37-221 | 2 | 4 | 4 | 4 | 无 |
| 37-222 | 0 | 3 | 0 | 0 | 4 |
| 37-225 | 0 | 2 | 4 | 4 | 0 |
| 37-250 | 2 | 0 | 3 | 4 | 4 |

M37株系单株共237株，其中病级为0的有105株，占总株数的44.30 %；病级为

1的有15株，占总株数的6.33 %；病级为2的有36株，占总株数的15.19 %；病级为 3

的有50株，占总株数的21.10 %；病级为4的有31株，占总株数的13.08 %；有足够的抗病株和感病株构成抗池和感池。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

### **6.2.8** **DNA**检测结果

将提取的亲本及后代的135个DNA通过琼脂糖凝胶电泳进行检测，图6-4是选取其中浓度较高的DNA进行琼脂糖凝胶电泳检测的结果。

注：1. M37-216, 2. M37-128-C, 3. M37-158-D, 4. M37-128-B, 5. M37-165-D, 6. M37-195-B, 7. M37-139-D, 8. M37-120-B,



9. M37-222-C, 10. M37-61-B, 11. M37-188-D

图6-4 亲本基因组DNA及部分M37单株基因组DNA琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 6-4 Electrophoresis picture of parents total DNA and same M37 generations total DNA

从图6-4中可看出，提取的DNA质量较好，可以用来进行后续的PCR试验。

### **6.2.9** 在亲本间扩增出多态性的引物筛选结果

#### **6.2.9.1** **RGA**在亲本间扩增出多态性的结果

使用10对RGA引物对两对亲本进行PCR扩增，其中3对引物的PCR扩增产物有明显差异，占RGA筛选引物的14.2 %，电泳结果如图6-5所示。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



注：箭头标示两对亲本间的多态性条带（1、2、3、4）. 引物Gbrga18, （5、6、7、8）. 引物Gbrga8, （9、10、11、12）. 引物Gbrga42,

其中1、5、9使用抗病亲本新海20号的DNA, 2、6、10使用感病亲本硕丰1号， 3、7、11使用抗病亲本辽棉18号的DNA，

4、8、12使用感病亲本军棉1号的DNA

图6-5 3对RGA引物在两对亲本间多态性条带的电泳图

Fig. 6-5 Electrophoresis picture of two pairs of parents using three pairs RGA primers

*新疆农业大学博士学位论文*

结果显示，使用引物Gbrga18、Gbrga8、Gbrga42可以在新海20号和硕丰1号之间扩增出差异带，使用引物Gbrga18、Gbrga8、Gbrga42可以在辽棉18号和军棉1号之间扩增出差异带。

#### **6.2.9.2** **SSR**引物在亲本间扩增出多态性的结果

使用21对SSR引物对两对亲本进行PCR扩增，其中4对引物的PCR扩增产物有明显差异，占SSR筛选引物的19.0 %，电泳结果如图6-6所示。



注：箭头标示两对亲本间的多态性条带（1、2、3、4）.引物BNL3558, （5、6、7、8）.引物BNL1414, （9、10、11、12）.引物BNL1681，

（13、14、15、16）.引物BNL1721, 其中1、5、9、13使用抗病亲本新海20号的DNA, 2、6、10、14使用感病亲本硕丰1号，3、7、11、15使用抗病亲本辽棉18号的DNA, 4、8、12、16使用感病亲本军棉1号的DNA

图6-6 4对SSR引物在两对亲本间多态性条带的电泳图

Fig. 6-6 Electrophoresis picture of two pairs of parents using four pairs SSR primers

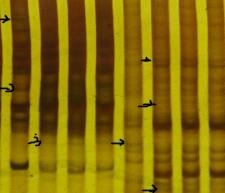
结果显示，使用引物BNL3558、BNL1414、BNL1681、BNL1721可以在新海20号和硕丰1号之间扩增出差异带，使用引物BNL3558、BNL1414、BNL1681、BNL1721可以在辽棉18号和军棉1号之间扩增出差异带。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

#### **6.2.9.3** **SRAP**引物在亲本间扩增出多态性的结果

使用8对SRAP引物对两对亲本进行PCR扩增，其中3对引物的PCR扩增产物有明显差异，占SRAP筛选引物的37.5 %，电泳结果如图6-7所示。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



注：箭头标示两对亲本间的多态性条带（1、2、3、4）.引物me1×em3, （5、6、7、8）：引物me1×em5, （9、10、11、12）.引物me6×em2, 其中1、5、9使用抗病亲本新海20的DNA, 2、6、10使用感病亲本硕丰1号， 3、7、11使用抗病亲本辽棉18的DNA, 4、8、12使用感病亲本军棉1号的DNA

图6-7 3对SRAP引物在两对亲本间多态性条带的电泳图

Fig. 6-7 Electrophoresis picture of two pairs of parents using three pairs SRAP primers

结果显示，使用引物me1×em3、me1×em5、me6×em2可以在新海20号和硕丰1号之间扩增出差异带，使用引物me1×em3、me1×em5、me6×em2可以在辽棉18号和军棉1号之间扩增出差异带。

### **6.2.10** **SRAP**多态性引物在抗感基因池中的检测

#### **6.2.10.1** **SRAP**多态性引物在亲本和抗、感基因池的检测

SRAP多态性引物在亲本和抗、感基因池的检测结果如图6-8所示，4对引物中有 3

对引物在亲本和抗、感基因池间存在多态性条带。

*新疆农业大学博士学位论文*



注：（1-12）.引物me1×em3, （13-24）：引物me1×em11, M.1500marker, （25-36）.引物me4×em11（37-48）.引物me5×em7,

其中1、5、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45使用抗病亲本新海20号的DNA, 2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46

使用抗病基因池的DNA, 3、7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47使用感病亲本硕丰1号的DNA, 4、8、12、16、20、24、28、

32、36、40、44、48使用感病基因池的DNA

图6-8 SRAP多态性引物在亲本和抗、感基因池扩增产物的电泳图

Fig. 6-8 Electrophoresis picture of PCR production of parents, resistant DNA pool and susceptible DNA pool using SRAP primers

#### **6.2.10.2** 引物**me1**×**em3**在亲本和抗、感基因池中的扩增结果

引物me1×em3在亲本和抗、感基因池中的差异性条带如图6-9所示，图中的四个泳道是图6-8中的9-12这四个泳道。

1 2 3 4

注：箭头所标示的为两对亲本间筛选出的多态性条带1。新海20号2. 抗病基因池 3。硕丰1号4. 感病基因池



Note: The arrows showed different fragments of production of parents, 1. Xinhai 20, 2. resistant DNA pool, 3. Shuofen 1, 4. susceptible DNA pool

图6-9 引物me1×em3在亲本和抗、感基因池中的差异性条带

Fig. 6-9 Different fragment of PCR production of parents, resistant DNA pool and susceptible DNA pool using primer me1×em3

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

使用me1×em3扩增出的条带汇总如表6-10所示，共扩增出15条带，介于100 bp～900

bp之间，新海20号和抗池扩增出113 bp，硕丰1号和感池未扩增出113 bp，可以看出差异带的大小在113 bp。

表6-10 引物me1×em3扩增的亲本、抗池和感池条带汇总表

Table 6-10 Total fragments of PCR production of parents, resistant DNA pool and susceptible DNA pool using primer me1×em3

*MW*/bp

| 新海20 | 抗池 | 硕丰1号 | 感池 |
| --- | --- | --- | --- |
| 900 | 900 | 900 | 900 |
| 713 | 713 | 713 | 713 |
| 612 | 612 | 612 | 612 |
| 456 | 456 | 456 | 456 |
| 426 | 426 | 426 | 426 |
| 389 | 389 | 389 | 389 |
| 300 | 300 | 300 | 300 |
| 277 | 277 | 277 | 277 |
| 251 | 251 | 251 | 251 |
| 231 | 231 | 231 | 231 |
| 200 | 200 | 200 | 200 |
| 189 | 189 | 189 | 189 |
| 137 | 137 | 137 | 137 |
| 123 | 123 | 123 | 123 |
| 113 | 113 | / | / |
| 100 | 100 | 100 | 100 |

*新疆农业大学博士学位论文*

#### **6.2.10.3** 引物**me1**×**em11**在亲本和抗、感基因池中的扩增结果

引物me1×em11在抗感基因池中的差异性条带如图6-10所示，图中的四个泳道是图6-8中的33-36这四个泳道。

1 2 3 4

注：箭头所标示的为两对亲本间筛选出的多态性条带1。新海20号2. 抗病基因池 3。硕丰1号4. 感病基因池



Note: The arrows showed different fragments of production of parents, 1. Xinhai 20, 2. resistant DNA pool, 3. Shuofen 1, 4. susceptible DNA pool

图6-10 引物me1×em11在亲本和抗、感基因池中的差异性条带

Fig. 6-10 Different fragment of PCR production between parents, resistant DNA pool and susceptible DNA pool using primer me1×em11

使用me1×em11扩增出的条带汇总如表6-11所示，共扩增出18条带，介于100 bp～

1500 bp之间，新海20号和抗池扩增出1366 bp，硕丰1号和感池未扩增出1366 bp，可以看出差异带的大小在1366 bp。

表6-11 me1×em11扩增出的条带汇总表

Table 6-11 Total fragments of PCR production of parents, resistant DNA pool and susceptible DNA pool using primer me1×em11

MW/bp

| 新海20号 | 抗池 | 硕丰1号 | 感池 |
| --- | --- | --- | --- |
| 1500 | 1500 | 1500 | 1500 |
| 1366 | 1366 | / | / |
| 1215 | 1215 | 1215 | 1215 |
| 1124 | 1124 | 1124 | 1124 |
| 924 | 924 | 924 | 924 |
| 700 | 700 | 700 | 700 |
| 636 | 636 | 636 | 636 |
| 500 | 500 | 500 | 500 |

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 续表6-11 |  |  |  |
| 476 | 476 | 476 | 476 |
| 456 | 456 | 456 | 456 |
| 387 | 387 | 387 | 387 |
| 352 | 352 | 352 | 352 |
| 276 | 276 | 276 | 276 |
| 197 | 197 | 197 | 197 |
| 178 | 178 | 178 | 178 |
| 168 | 168 | 168 | 168 |
| 134 | 134 | 134 | 134 |
| 100 | 100 | 100 | 100 |

#### **6.2.10.4** 引物**me4**×**em11**在亲本和抗、感基因池中的扩增结果

引物me4×em11在抗感基因池中的差异性条带如图6-11所示，图中的四个泳道是图6-8中的17-20这四个泳道。

1 2 3 4

注：箭头所标示的为两对亲本间筛选出的多态性条带1。新海20号2. 抗病基因池 3。硕丰1号4. 感病基因池



Note: The arrows showed different fragments of production of parents, 1. Xinhai 20, 2. resistant DNA pool, 3. Shuofen 1, 4. susceptible DNA pool

图6-11 引物me4×em11在亲本和抗、感基因池中的差异性条带

Fig. 6-11 Different fragment of PCR production between parents, resistant DNA pool and susceptible DNA pool using primer me4×em11

*新疆农业大学博士学位论文*

使用me4×em11扩增出的条带汇总如表6-12所示，共扩增出20条带，介于72 bp～1500 bp之间，新海20号和抗池未扩增出126 bp，硕丰1号和感池可以扩增出126 bp，可以看出差异带的大小在126 bp。

表6-12 me4×em11扩增出的条带汇总表

Table 6-12 Total fragments of PCR production of parents, resistant DNA pool and susceptible DNA pool using primer me4×em11

*MW*/bp

| 新海20号 | 抗池 | 硕丰1号 | 感池 |
| --- | --- | --- | --- |
| 1500 | 1500 | 1500 | 1500 |
| 1253 | 1253 | 1253 | 1253 |
| 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| 700 | 700 | 700 | 700 |
| 600 | 600 | 600 | 600 |
| 526 | 526 | 526 | 526 |
| 500 | 500 | 500 | 500 |
| 451 | 451 | 451 | 451 |
| 446 | 446 | 446 | 446 |
| 381 | 381 | 381 | 381 |
| 300 | 300 | 300 | 300 |
| 255 | 255 | 255 | 255 |
| 200 | 200 | 200 | 200 |
| 143 | 143 | 143 | 143 |
| 132 | 132 | 132 | 132 |
| / | / | 126 | 126 |
| 111 | 111 | 111 | 111 |
| 100 | 100 | 100 | 100 |
| 88 | 88 | 88 | 88 |
| 72 | 72 | 72 | 72 |

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

### **6.2.11** 差异片段二次**PCR**扩增后的检测

用琼脂糖凝胶电泳检测差异片段二次PCR后的产物，检测结果如图6-12所示。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



注：1-12. 引物me1×em3的差异片段回收二次扩增产物, M. 1500 Molecular marker

图6-12 差异片段二次扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 6-12 Electrophoresis picture of two-times PCR production

由图6-12可看出，扩增出的片段在100bp左右，差异片段回收后经二次PCR扩增得到的产物的量不大，但可以送至测序公司测序。

### **6.2.12** 差异片段二次扩增产物的测序结果

样品用引物me1×em3测序，从峰图上看，由于引物与模板结合的不好导致测序信号值非常弱，有可能与模板浓度比较低有关系。

## **6.3** 讨论

### **6.3.1** 抗病性常规鉴定方法与分子标记鉴定方法结果的差异

本试验中，有些M37后代在田间调查结果是表现与父本一致即抗病，但是在实验室用分子标记的方法检测出来的结果却与母本的表现一致即感病；而有些M37后代在田间调查出来的结果是与母本的表现一致即感病，但是在实验室中检测出来的结果却与父本的表现一致即抗病，所以在实验室用分子标记的方法检测出来的结果可能存在一定的误

*新疆农业大学博士学位论文*

差。

病害三角的构成要素是：病原菌、寄主和在一定的环境条件，这三者相互作用才会发生黄萎病，如果这三者寄主与病原菌的互作关系不合适，将很难获得准确可靠的试验结果，更难以找到棉花黄萎病抗性遗传规律，那么，接种的病原菌必须有适宜的浓度和接种量，接种时期要适宜，病原菌与寄主处在良好的环境条件下，才能获得准确可靠的试验结果[175]。而在实验室的结果存在误差可能是SRAP重现性不够高所造成的，需要在试验中多做重复。

### **6.3.2** 亲本**PCR**扩增产物之间差异带的判断

以新海20号、硕丰1号以及新海20号×硕丰1号的杂交后代M37株系为材料，利用4对SRAP引物找出差异性片段，4对引物中有3对引物在抗感基因池中存在差异性条带。根据logMW=K-bX计算出这3对引物扩增出的所有条带大小，此式中：MW为分子量，X为迁移值，k、b均为常数。因为此公式中有两个常数，而X是认为测量出的，存在一定的误差，会影响计算结果，因而计算出的扩增的条带大小有一定误差。

本试验以新海20号与硕丰1号及辽棉18号与军棉1号两对亲本为材料，采用10对RGA引物、21对SSR引物、8对SRAP引物对亲本进行多态性的扩增，筛选具有稳定多态性的引物。采用10对RGA引物对亲本进行扩增，共得到3对多态性引物，分别是：引物Gbrga18、Gbrga8、Gbrga42；采用21对SSR引物对亲本进行扩增，共得到4对多态性引物分别是：引物BNL3558、BNL1414、BNL1681、BNL1721；采用8 对

SRAP引物对亲本进行扩增，共得到3对多态性引物分别是：引物me1×em3、引物me1×

em5、引物me6×em2。多态性引物的得率是：RGA引物30 %；SSR引物19.05 %；SRAP引物37.5 %。可见使用RGA引物、SSR引物、SRAP引物均可得到与黄萎病抗性连锁的分子标记。

### **6.3.3** 杂交后代抗、感基因池多态性条带的克隆成败原因

以新海20号、硕丰1号以及新海20号×硕丰1号的杂交后代M37株系为材料，利用4对SRAP引物找出差异性片段，4对引物中有3对引物在抗、感基因池中存在多态性条带，分别是：引物me1×em3、引物me1×em11、me4×em11。引物me1×em3扩增

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

出的差异带的大小在113 bp，引物me1×em11扩增差异带的大小在1366 bp，引物me4×

em11扩增出的出差异带的大小在126 bp。

差异片段回收后经二次PCR扩增，得到的产物利用琼脂糖凝胶电泳检测时，部分条带有拖尾，其原因可能是提取的DNA中有杂质或者扩增产物中有部分断裂。二次扩增产物。送至测序公司，样品用相应引物测序，从峰图上看，由于引物与模板结合的不好导致测序信号值非常弱，有可能与模板浓度比较低有关系，可重新制备样品。本试验为后期抗黄萎病基因的定位和遗传图谱的构建奠定了基础。

*新疆农业大学博士学位论文*

# 第7章 棉花黄萎病抗性的分子标记筛选

随着不断扩大新疆北部植棉面积，20世纪90年代从内地棉区大量引种，如豫棉、辽棉、中棉、冀棉以及自育品种等，有些盲目和私自引种，致使棉花黄萎病强致病类型病原菌侵入北疆棉区，2002年博乐农五师发生了强致病型黄萎病，棉花产量损失严重，部分棉田绝产，大部分耕地种植棉花，很难轮作倒茬，20世纪90年代，北疆又推广了秸秆还田措施，使无病田变成发病田，轻病田变成重病田对棉花生产造成重大损失[176]。

20世纪80年代以来，由于分子生物学、基因工程理论和技术的迅猛发展，研究植物诱导抗病性成为植物病理学乃至生命科学的热点，研究资料多样，成果卓著，内容有抗病信号在生物体中的转导、信号通路、激发子功能、防卫基因的表达、调控和应用，研究对象从模式植物拟南芥扩展到多种单子叶、双子叶植物。目前，植物诱导抗病性的有些研究成果已在生产上开始推广应用，开辟了一条防治植物病害的新途径[177]。

吴洵耻等[178]研究了棉株上接种黄萎病菌（*Verticillium dahliae* Kleb.）弱菌株对后继感染的强菌株所致病害的影响，发现接种弱菌株可减轻诱发的棉花黄萎病的病情。

植物诱导抗病性的影响因子有多种激素（JA、SA、ETH、GA）、核黄素、Harpins蛋白、水通道蛋白、几丁质酶、防御素、壳寡糖、聚胺氧化酶等，研究这些抗病性影响因子的基因在不同抗、感病性棉花品种中的分布，以及与黄萎病抗性状的一致性，对筛选抗黄萎病激发子基因，发掘其与棉花黄萎病抗性状的关系，进一步阐明棉花抗黄萎病遗传机制具有重要意义。

## **7.1** 材料与方法

### **7.1.1** 试验材料

#### **7.1.1.1** 供试棉花

陆地棉品种：川243、川737、辽棉18号、冀668、军棉1号、108夫、硕丰1号、新陆早1号、新陆早23号、新陆早13号、新陆早42号。

海岛棉品种：新海16号、新海14号、新海25号、吉扎81号、海92-4、苏K202、

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

军海1号、pima90-53、新海20号。（均由新疆农业大学遗传育种实验室提供）。

#### **7.1.1.2** 引物

38对PCR引物，由上海生工生物技术公司合成，引物序列见附录表2、表3、表4。上述引物序列参照LiG等的标准序列。

#### **7.1.1.3** 试验试剂

所用试剂均为分析纯，CTAB、EDTA、SDS、Tris、β-Mercaptoethanol、PVP40购自Sigma公司，其他化学试剂为国产分析纯，除PVP40, SDS外，其余有关提取试剂均121 ℃高温灭菌20 min. Taq DNA聚合酶（5U·μl-1）、10× buffer(MgCl2-free)、MgCl2 25 mM、dNTP（10 mM each）；丙烯酰胺、亚甲基双丙烯酰胺、TEMED、Tris、

Boric·Acid、EDTA·Na 2、(NH4) 2S2O8等产自Sanger公司，其它试剂均为国产。引物的稀释参见引物合成报告单，稀释为100uM的母液-20℃放置。

提取缓冲液：100 m mol·L-1 Tris-HC1, pH=8.0；50 m mol·L-1 EDTA，pH=8.0; 1.0

mol·L-1 NaC1; 2 ％SDS；2％PVP40; 30μl·mlβ-Me(r

现用现加）；10 ％CTAB Buffer：

100 m mol·L-1 Tris-HCl, pH=8.0; 50 mmol·L-1 EDTA, pH=8.0; 1.0 mol·L-1 NaCl; 10 ％

CTAB; 2 ％PVP40

#### **7.1.1.4** 培养基

Ml固体培养基：Ms无机盐，BS培养基，维生素，蔗糖30 g·L -1，琼脂7.5 g·L -1，

PH 5.8～6.0.

### **7.1.2** 试验方法

#### **7.1.2.1** 棉苗培养

棉籽消毒及温汤浸种同**2.1.2.2**方法，然后置于Ml固体培养基的三角瓶中[179]，25℃恒温光照培养室，16 h光照，8 h黑暗，待子叶长至直径1 cm时备用。

#### **7.1.2.2** 田间黄萎病抗性鉴定

见**2.1.2.6**和**2.1.2.8.**

*新疆农业大学博士学位论文*

#### **7.1.2.3** 棉花总**DNA**提取方法及步骤

见曲延英方法[171]，与**6.1.2.2**相同。

#### **7.1.2.4** 琼脂糖凝胶电泳检测**DNA**

同**6.1.2.3**方法。

#### **7.1.2.5** **PCR**反应体系及扩增程序

（1）PCR反应体系

表7-1 10μl PCR反应体系

Table 7-1 Reaction system of 10μl PCR

| DNA 模板  （50 ng·μl-1） | 10× PCR  buffer | dNTP  （10 μmol·L-1） | 引物（F+R）  （5 μmol·L-1） | Taq 聚合酶  （5 U·μl-1） | ddH2O (μl) | MgCl2 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1.00 | 1.00 | 0.20 | 1.00 | 0.20 | 5.80 | 0.80 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| （2） PCR 扩增程序  预变性 | 95℃ | 5 min |
| 变性 | 95℃ | 1 min |
| 复性 | 62℃ | 1 min 35 个循环 |
| 延伸 | 72℃ | 1 min |
| 延伸 | 72℃ | 7 min |
| 保存 | 4℃ | + ∞ |

#### **7.1.2.6** **PCR**产物的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

同**6.1.2.7**方法。

### **7.1.3** **PCR**产物统计

统计每个棉花品种扩增产物的条带及分子量。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

## **7.2** 结果与分析

### **7.2.1** 棉花品种的病情调查

#### **7.2.1.1** 海岛棉品种的相对病指及反应型

对海岛棉剖秆鉴定得到的黄萎病抗性结果见表7-2。

表7-2 海岛棉的黄萎病抗性鉴定

Table 7-2 Identification of resistance toVerticillium wilt in barbadence

| 棉花品种 | 相对病指 | 反应型 | 棉花品种 | 相对病指 | 反应型 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 新海 14 号 | 14.71 | R | 海 92-4 | 38.24 | S |
| 新海 16 号 | 14.71 | R | 苏 K202 | 44.12 | S |
| 新海 20 号 | 11.76 | R | 军海 1 号 | 17.65 | R |
| 新海 25 号 | 11.76 | R | pima90-53 | 17.65 | R |
| 吉扎 81 号 | 17.65 | R |  |  |  |

海岛棉品种中无免疫、高抗和耐病品种，相对病指在11.76~44.12之间，平均值为

35.58，抗病品种（R）7个，占所测定棉花品种的77.78 %，感病品种（S）2个，占所测定棉花品种的22.22 %。

#### **7.2.1.2** 陆地棉品种的相对病指及反应型

收获期对陆地棉进行剖秆，对照剖秆分级标准得出陆地棉群体的黄萎病抗性，记录分析结果见表7-3。

表7-3 陆地棉的黄萎病抗性鉴定

Table 7-3 Identification of resistance to Verticillium wilt inhisutum

| 棉花品种 | 相对病指 | 反应型 | 棉花品种 | 相对病指 | 反应型 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 川 243 | 23.53 | T | 硕丰 1 号 | 41.18 | S |
| 川 737 | 29.41 | T | 新陆早 1 号 | 38.24 | S |
| 棉 18 | 23.53 | T | 新陆早 13 号 | 30.53 | T |
| 冀 668 | 23.53 | T | 新陆早 23 号 | 50.00 | S |
| 军棉 1 号 | 50.00 | S | 新海 42 号 | 46.08 | S |
| 108 夫 | 35.30 | S |  |  |  |

陆地棉品种中，无免疫、高抗和抗病品种，相对病指在23.53~50.00之间，平均值

*新疆农业大学博士学位论文*

为20.92，耐病品种（T）5个，占45.45 %，感病品种（S）6个占54.55 %。

### **7.2.2** **PCR**扩增产物电泳图

进行PCR扩增后，各黄萎病抗性影响因子引物扩增产物的电泳条带见图7-1、图7-2、图7-3。

使用引物BNL1721进行PCR扩增的产物，在海岛棉新海16号、新海14号、新海

25号、吉扎81号、海92-4、苏K202、军海1号、pima90-53、新海20号扩增出两条差异带270bp和490bp，而陆地棉川243、川737、辽棉18号、冀668、军棉1号、108夫、硕丰1号、新陆早1号、新陆早13号、新陆早23号、新陆早42号未能扩增出这两条带。



490bp

270bp

注：M. DNA 分子量标记 100 ladder, 1. 川 243, 2. 川 737, 3. 辽棉 18 号， 4. 冀 668, 5. 军棉 1 号， 6. 108 夫， 7. 硕丰 1 号， 8. 新陆

早 1 号， 9. 新陆早 13 号， 10. 新陆早 23 号， 11. 新海 16 号， 12. 新海 14 号， 13. 新海 25 号， 14. 吉扎 81 号， 15. 海 92-4, 16. 苏

K202, 17. 军海 1 号, 18. pima90-53, 19. 新海 20 号， 20. 新陆早 42 号

M. DNA molecular marker 100 ladder, 1. Chuan 243, 2. Chuan 737, 3. Liaomian 18, 4. Ji668, 5. Junmian 1, 6. 108 fu, 7. Shuofeng 1,

8. Xinluzao 1, 9. Xinluzao 13, 10. Xinluzao 23, 11. Xinhai 16, 12. Xinhai 14, 13. Xinhai 25, 14. Jizha 81, 15. Hai 92-4, 16. Su K202,

17. Junhai 1, 18. Pima90-53, 19. Xinhai 20, 20. Xinluzao 42

图7-1 引物BNL1721进行PCR扩增产物电泳图

Fig. 7-1 Electrophoresis picture of PCR production using primer BNL1721

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

使用引物BNL1414进行PCR扩增的产物，在海岛棉新海16号、新海14号、新海



330bp

130bp

25号、吉扎81号、海92-4、苏K202、军海1号、pima90-53、新海20号扩增出两条差异带130bp和330bp，而陆地棉川243、川737、辽棉18号、冀668、军棉1号、108夫、硕丰1号、新陆早1号、新陆早13号、新陆早23号、新陆早42号未能扩增出这两条带。

注：M. DNA 分子量标记 100 ladder, 1. 川 243, 2. 川 737, 3. 辽棉 18 号， 4. 冀 668, 5. 军棉 1 号， 6. 108 夫， 7. 硕丰 1 号， 8. 新陆

早 1 号， 9. 新陆早 13 号， 10. 新陆早 23 号， 11. 新海 16 号， 12. 新海 14 号， 13. 新海 25 号， 14. 吉扎 81 号， 15. 海 92-4, 16. 苏

K202, 17. 军海 1 号, 18. pima90-53, 19. 新海 20 号， 20. 新陆早 42 号

M. DNA molecular marker 100 ladder, 1. Chuan 243, 2. Chuan 737, 3. Liaomian 18, 4. Ji668, 5. Junmian 1, 6. 108 fu, 7. Shuofeng 1, 8.

Xinluzao 1, 9. Xinluzao 13, 10. Xinluzao 23, 11. Xinhai 16, 12. xXinhai 14, 13. Xinhai 25, 14. Jizha 81, 15. Hai 92-4, 16. Su K202,

17. Junhai 1, 18. Pima90-53, 19. Xinhai 20, 20. Xinluzao 42

图7-2 引物BNL1414进行PCR扩增产物电泳图

Fig. 7-2 Electrophoresis picture of PCR production using primer BNL1414

*新疆农业大学博士学位论文*

使用引物me6×em2进行PCR扩增的产物，在海岛棉新海16号、新海14号、新海



400bp

120bp

25号、吉扎81号、海92-4、苏K202、军海1号、pima90-53、新海20号扩增出两条差异带120bp和400bp，而陆地棉川243、川737、辽棉18号、冀668、军棉1号、108夫、硕丰1号、新陆早1号、新陆早13号、新陆早23号、新陆早42号未能扩增出这两条带。

注：M. DNA 分子量标记 100 ladder, 1. 川 243, 2. 川 737, 3. 辽棉 18 号， 4. 冀 668, 5. 军棉 1 号， 6. 108 夫， 7. 硕丰 1 号， 8. 新陆

早 1 号， 9. 新陆早 13 号， 10. 新陆早 23 号， 11. 新海 16 号， 12. 新海 14 号， 13. 新海 25 号， 14. 吉扎 81 号， 15. 海 92-4, 16. 苏

K202, 17. 军海 1 号, 18. pima90-53, 19. 新海 20 号， 20. 新陆早 42 号

M. DNA molecular marker 100 ladder, 1. Chuan 243, 2. Chuan 737, 3. Liaomian 18, 4. Ji668, 5. Junmian 1, 6. 108 fu, 7. Shuofeng 1, 8.

Xinluzao 1, 9. Xinluzao 13, 10. Xinluzao 23, 11. Xinhai 16, 12. xXinhai 14, 13. Xinhai 25, 14. Jizha 81, 15. Hai 92-4, 16. Su K202,

17. Junhai 1, 18. Pima90-53, 19. Xinhai 20, 20. Xinluzao 42

图7-3 引物me6×em2进行PCR扩增产物电泳图

Fig. 7-3 Electrophoresis picture of PCR production using primer me6×em2

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

### **7.2.3** **PCR**扩增产物的条带

进行PCR扩增后，各黄萎病抗性影响因子扩增的条带见表7-4。

表7-4 黄萎病抗性影响因子PCR扩增的条带

Table 7-4 PCR fragments of resistant factors to*Verticillium wilt*

（*MW*/bp）

| 引物 | 新海  16号 | 新海  14号 | 新海  25号 | 吉扎  81号 | 军海  1号 | Pima 90-5  3 | 新海  20号 | 川  243 | 川  737 | 辽棉  18号 | 冀  668 | 新陆早13 号 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| VM13 | 950 | 950 | 950 | 950 |  | 950 | 950 |  | 950 |  |  | 950 |
|  | 930 | 930 | 930 | 930 |  | 930 | 930 |  | 930 |  |  | 930 |
|  | 760 | 760 | 760 | 760 | 760 | 760 | 760 |  | 760 |  |  | 760 |
|  | 660 | 660 | 660 | 660 | 660 | 660 | 660 |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  | 650 |  | 650 | 650 |
|  | 640 | 640 | 640 | 640 | 640 | 640 | 640 |  |  |  |  |  |
|  | 590 | 590 | 590 | 590 | 590 | 590 | 590 |  | 590 | 590 | 590 | 590 |
|  | 540 | 540 | 540 | 540 | 540 | 540 | 540 |  | 540 |  |  | 540 |
|  | 310 | 310 | 310 | 310 |  | 310 | 310 |  | 310 | 310 | 310 | 310 |
|  | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 |
| me1× em5 | 380 | 380 | 380 | 380 | 380 | 380 | 380 |  | 380 | 380 | 380 | 380 |
|  | 230 | 230 |  | 230 | 230 | 230 | 230 |  |  | 230 |  | 230 |
|  |  |  |  |  |  | 190 |  |  | 190 | 190 | 190 |  |
|  | 180 | 180 |  |  | 180 |  | 180 |  |  |  |  | 180 |
|  | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |  |  | 50 | 50 | 50 | 50 |
| BNL0946 | 980 | 980 | 980 | 980 | 980 | 980 | 980 |  | 980 | 980 | 980 | 980 |
|  | 780 | 780 | 780 | 780 | 780 | 780 | 780 |  | 780 | 780 | 780 | 780 |
|  | 700 | 700 | 700 | 700 |  | 700 |  |  | 700 | 700 |  | 700 |
|  | 550 | 550 | 550 | 550 |  | 550 | 550 |  | 550 | 550 |  | 550 |
|  | 380 | 380 | 380 | 380 | 380 | 380 | 380 |  |  | 380 |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  | 370 |  | 370 | 370 |
|  | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 |  | 280 | 280 | 280 | 280 |
| BNL1721 |  |  |  |  |  |  |  | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
|  | 490 | 490 | 490 | 490 | 490 | 490 | 490 |  |  |  |  |  |
|  | 350 | 350 | 350 | 350 | 350 | 350 | 350 |  | 350 | 350 | 350 | 350 |
|  |  |  |  |  | 280 |  | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 |
|  | 270 | 270 | 270 | 270 |  | 270 |  |  |  |  |  |  |
| BNL1414 |  |  |  |  |  |  |  | 340 | 340 | 340 | 340 | 340 |
|  | 330 | 330 | 330 | 330 | 330 | 330 | 330 |  |  |  |  |  |
|  | 270 | 270 | 270 | 270 |  | 270 | 270 | 270 | 270 |  |  | 270 |
|  | 180 | 180 | 180 | 180 |  | 180 | 180 | 180 | 180 |  |  | 180 |
|  |  |  |  |  |  |  |  | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 |

*新疆农业大学博士学位论文*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 |  |  |  |  |  |
| me6× em2 | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 |
|  | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 |  |  |  |  |  |
|  | 160 | 160 | 160 | 160 | 160 | 160 | 160 | 160 | 160 | 160 | 160 | 160 |
|  | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  | 120 | 120 | 120 | 120 | 120 |
| VM25 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |  |  |  |  | 1000 |
|  | 960 | 960 | 960 | 960 | 960 | 960 | 960 |  |  |  |  | 960 |
|  | 870 | 870 | 870 | 870 | 870 | 870 | 870 |  |  |  |  | 870 |
|  | 700 | 700 | 700 | 700 | 700 | 700 | 700 |  |  | 700 |  | 700 |
|  |  | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 |  |  |  |  | 510 |
|  | 500 |  |  |  |  |  |  |  |  | 500 | 500 |  |
|  | 320 | 320 | 320 | 320 | 320 | 320 | 320 |  |  | 320 |  | 320 |
|  | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 |  |  | 280 | 280 | 280 |
| VM23 | 650 | 650 | 650 | 650 |  |  |  |  |  |  |  | 650 |
|  | 310 | 310 | 310 | 310 | 310 |  |  |  |  |  |  | 310 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  | 300 |  |  |  |
|  | 290 | 290 | 290 | 290 | 290 |  |  |  | 290 |  |  | 290 |
|  | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 |  |  |  |  |  |  | 280 |
| VM17 | 700 | 700 | 700 | 700 |  |  |  |  | 700 | 700 | 700 | 700 |
|  | 510 | 510 | 510 | 510 |  |  |  |  | 510 | 510 | 510 | 510 |
|  | 430 | 430 | 430 | 430 |  |  |  |  | 430 | 430 | 430 | 430 |
|  | 390 | 390 | 390 | 390 |  |  |  |  | 390 | 390 | 390 | 390 |
|  | 370 | 370 | 370 | 370 |  |  |  |  | 370 | 370 | 370 | 370 |

续表7-4

Continue Table 7-4

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 军棉 硕丰1 | | | | 新陆早 | 新陆早 苏 新陆早42 | | | |
|  | 1号 |  | 号 | 1号 | 23号 |  | K202 | 号 |
| VM13 |  |  |  |  | 950 | 950 |  | 950 |
|  |  |  |  |  | 930 | 930 |  | 930 |
|  |  |  |  |  | 760 | 760 |  | 760 |
|  |  |  |  |  |  | 660 |  |  |
|  | 650 | 650 | 650 | 650 | 650 |  |  | 650 |
|  |  |  |  |  |  | 640 |  |  |
|  | 590 | 590 | 590 | 590 | 590 | 590 |  | 590 |
|  | 540 | 540 | 540 |  |  | 540 |  | 540 |
|  | 310 | 310 | 310 | 310 | 310 | 310 |  | 310 |
|  | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 |  | 140 |
| me1× em5 | 380 | 380 | 380 | 380 | 380 | 380 | 380 | 380 |
|  |  | 230 | 230 | 230 | 230 | 230 | 230 | 230 |
|  | 190 | 190 |  | 190 | 190 |  |  | 190 |
|  |  |  | 180 |  |  | 180 | 180 |  |

引物108夫海92-4

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| BNL0946 | 980 | 980 | 980 | 980 | 980 | 980 | 980 | 980 |
|  | 780 | 780 | 780 | 780 | 780 | 780 | 780 | 780 |
|  |  |  |  |  | 700 | 700 | 700 | 700 |
|  |  | 550 |  |  |  | 550 | 550 | 550 |
|  |  |  | 380 |  | 380 | 380 | 380 |  |
|  | 370 | 370 |  | 370 |  |  |  | 370 |
|  | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 |
| BNL1721 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |  |  | 500 |
|  |  |  |  |  |  | 490 |  |  |
|  | 350 | 350 | 350 |  | 350 | 350 | 350 | 350 |
|  | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 |
| BNL1414 | 340 | 340 | 340 | 340 | 340 |  |  | 340 |
|  |  |  |  |  |  | 330 | 330 |  |
|  | 270 | 270 |  |  | 270 | 270 | 270 | 270 |
|  | 180 | 180 |  | 180 | 180 | 180 | 180 | 180 |
|  | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 |  |  | 140 |
|  |  |  |  |  |  | 130 | 130 |  |
| me6× em2 | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 |
|  |  |  |  |  |  | 400 | 400 |  |
|  | 160 | 160 | 160 | 160 | 160 | 160 | 160 | 160 |
|  |  |  |  |  |  | 130 | 130 |  |
|  | 120 | 120 | 120 | 120 | 120 |  |  | 120 |
| VM25 |  | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
|  |  | 960 | 960 | 960 | 960 | 960 | 960 | 960 |
|  |  | 870 | 870 | 870 | 870 | 870 | 870 | 870 |
|  |  | 700 | 700 | 700 | 700 | 700 | 700 | 700 |
|  |  |  |  |  | 510 | 510 | 510 |  |
|  | 500 | 500 | 500 | 500 |  |  |  | 500 |
|  |  | 320 | 320 | 320 | 320 | 320 | 320 | 320 |
|  | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 | 280 |
| VM23 |  | 650 | 650 |  | 650 |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  | 310 | 310 |  |
|  |  | 300 | 300 | 300 | 300 |  |  | 300 |
|  |  | 290 | 290 | 290 | 290 | 290 | 290 | 290 |
|  |  |  |  |  |  | 280 | 280 |  |
| VM17 | 700 | 700 | 700 | 700 | 700 | 700 |  |  |
|  | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 | 510 |  |  |
|  | 430 | 430 | 430 | 430 | 430 | 430 |  |  |
|  | 390 | 390 | 390 | 390 | 390 | 390 |  |  |
|  | 370 | 370 | 370 | 370 | 370 | 370 |  |  |

有9对引物PCR扩增出条带：VM13扩增出10条，介于140 bp～950 bp之间；VM17

*新疆农业大学博士学位论文*

扩增出5条，介于370 bp～700 bp之间；VM23扩增出5条，介于280 bp～650 bp之间；VM25扩增出8条，介于280 bp～1000 bp之间；BNL0946扩增出8条，介于280 bp～980 bp之间；BNL1414扩增出6条，介于130 bp～340 bp之间；BNL1721扩增出5条；介于270 bp～500 bp之间, em6×me2扩增出5条；介于120 bp～510 bp之间，em1×me5扩增出5条；介于50 bp～380 bp之间；其中VM13、VM23、VM25、BNL0946、

BNL1414、BNL1721、em6×me2和em1×me5这8对引物在不同品种间扩增的条带不同，VM17在不同品种间扩增的条带相同。

### **7.2.4** 扩增出条带的各抗病性分子标记的来源

PCR扩增出条带的引物来源如下表7-5。

表 7-5 PCR扩增出条带的引物来源

Table 7-5 Origin of primers could obtain PCR fragments

| 引物 | 来源 |
| --- | --- |
| VM13 | 海岛棉类似黄萎病抗性基因的蛋白 Vd2 的基因序列 |
| VM17 | 陆地棉分离的 Gh-RGA3 抗病相关染色体序列 |
| VM23 | 陆地棉分离的 vdrg17 抗病性相关 mRNA 序列 |
| VM25 | 棉花抗黄萎病蛋白 Ve2 的基因序列 |
| BNL1721、BNL1414、BNL0946 | 与黄萎病抗性有关的 SSR 引物 |
| em6× me2、em1× me5 | 与黄萎病抗性有关的 SRAP 引物 |

能扩增出条带的引物来源于与黄萎病抗性基因有关的蛋白基因序列、染色体序列、

mRNA序列、SSR引物和SRAP引物，其他编码茉莉酸、水杨酸、乙烯、核黄素、Harpins蛋白、几丁质酶前体、防御素、壳寡糖的引物未扩增出条带。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

### **7.2.5** 各抗病性分子标记与黄萎病抗性的符合程度

对各抗病性分子标记扩增条带与抗黄萎病品种进行统计，表7-6列出抗病品种普遍出现的扩增条带，与品种抗性的符合程度。

表7-6 抗病品种扩增条带及与抗病性符合率

Table 7-6 PCR fragments of resistant cultivars and rate according with resistance toVerticillium wilt

| 引物 | 抗病品种扩增条带（MW/bp） | 与抗病品种符  合率 | 与耐病品种符  合率 | 与感病品种符  合率 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| VM13 | 950、930、760、660、640、590、540、310、  140 | 0.857 | 0 | 0.125 |
| em1× me5 | 380、230、180、50 | 0.429 | 0.2 | 0.375 |
| BNL0946 | 980、780、700、550、380、280 | 0.714 | 0.2 | 0.5 |
| BNL1721 | 490、350、270 | 0.714 | 0 | 0 |
| BNL1414 | 330、270、180、130 | 0.857 | 0 | 0.25 |
| em6× me2 | 510、400、160、130 | 1 | 0 | 0.25 |
| VM25 | 1000、960、870、700、510、320、280 | 0.857 | 0.2 | 0.375 |
| VM23 | 650、310、290、280 | 0.571 | 0.2 | 0 |
| VM17 | 700、510、430、390、370 | 0.714 | 0.8 | 0.75 |

由表7-6可见，引物em6×me2扩增条带与抗病品种符合率最高，达到1，VM13、

BNL1414、VM25扩增条带与抗病品种符合率为0.857，引物VM13、BNL1721、

BNL1414和em6×me2扩增条带与耐病品种符合率最低，为0；BNL1721、VM23与感病品种符合率最低，为0，VM13与感病品种符合率较低，为0.125，BNL1414、em6×me2与感病品种符合率较低，为0.25。

*新疆农业大学博士学位论文*

### **7.2.6** 各抗病性分子标记与品种来源的关系

对各抗病性分子标记扩增条带与品种来源进行统计，表7-7列出新疆自育品种普遍出现的扩增条带，与新疆自育品种、其它地区所育品种的符合程度。

表7-7 新疆自育品种扩增条带及与品种来源符合率

Table 7-7 PCR fragments of cultivars breeded in Xinjiang and rate according with origon

| 引物 | 新疆自育品种较多出现的扩增条带（MW/bp） | 与新疆品种符  合率 | 与其它地区品  种符合率 |
| --- | --- | --- | --- |
| VM13 | 950、930、760、590、540、310、140 | 0.545 | 0.444 |
| em1× me5 | 380、230、180、50 | 0.455 | 0.222 |
| BNL0946 | 980、780、380、280 | 0.636 | 0.555 |
| BNL1721 | 500、350、280 | 0.455 | 0.444 |
| BNL1414 | 340、270、180、140 | 0.364 | 0.333 |
| em6× me2 | 510、160、120 | 0.545 | 0.555 |
| VM25 | 1000、960、870、700、510、320、280 | 0.545 | 0.444 |
| VM23 | 650、310、290 | 0.364 | 0.111 |
| VM17 | 700、510、430、390、370 | 0.727 | 0.666 |
| 平均值 |  | 0.515 | 0.419 |

由表7-7 可见，新疆自育品种较多出现的扩增条带，与新疆自育品种符合率介于

0.364～0.727 之间，平均值为0.515；与其它地区所育品种的符合率介于0.111～0.666

之间，平均值为0.419，与新疆自育品种符合率略高于与其它地区所育品种的符合率。

## **7.3** 讨论

### **7.3.1** 供试棉花抗病性与分子标记筛选效果的关系

刘海洋等[180] 2009～2011年共鉴定了120份棉花品种的黄萎病抗性，全部供试材料来自新疆南、北部棉区参加生产示范及常规区试的品种，没有对棉花黄萎病免疫或高抗的品种。鉴定为抗黄萎病的棉花品种为01-2，仅占到鉴定棉花品种总数的0.8 %，棉花黄萎病病情指数为20。耐黄萎病品种包括GD-5、81-3、新炮台1号、新陆早33号、中

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

棉所41号、中棉所49号等53个品种，占到鉴定棉花品种总数的44.2 %，棉花黄萎病病情指数范围为20.1～34.9。感病品种占到比例最大，占鉴定总数的57.5 %。

本试验供试海岛棉品种无免疫、高抗和耐病品种，相对病指在11.76～44.12之间，平均值为35.58, 7个抗病品种，抗病品种占所测定棉花品种的77.78 %，2个感病品种，感病品种占所测定棉花品种的22.22 %；陆地棉品种中，无免疫、高抗和抗病品种，相对病指在23.53～50.00之间，平均值为20.92, 5个耐病品种，耐病品种占45.45 %，6个感病品种，感病品种占54.55 %，如果供试材料中有免疫、高抗材料，可能筛选出与免疫、高抗紧密连锁的分子标记。

### **7.3.2** 供试分子标记的选择

翟庆哲[181]在拟南芥中发现，茉莉酸（JA）能够诱导受伤反应。理论上茉莉酸激活下游信号转导时间而最终诱导抗性基因表达。但到目前为止，还未鉴定出茉莉酸的受体。许多实验室通过各种茉莉酸信号途径中的突变体，但多年来也只鉴定得到*COI1*，*JAR1*，

*JIN1*和*CEV1*等为数甚少的几个基因。

朱有勇等[182]根据大丽轮枝菌核糖体基因ITS区段克隆测序结果，设计和筛选两个引物，只对大丽轮枝菌模板DNA扩增出324bp的特异分子片段，且扩增量十分显著。中国农业科学院与中国科学院合作，成功地克隆和修饰了植物来源的几丁质酶基因，获得了抗黄萎病的转基因棉花。国外学者研究转葡萄糖氧化酶基因（*GO*基因）对植株的抗病性及农艺性状的影响。Wu等[183]报道在转基因*GO*马铃薯内产生了大量过氧化氢。

Murray等[184]将来自Talaromyces flavus的*GO*基因转入棉花，该基因表达后，棉株对黄萎病菌产生一定的抗菌活性，

本试验使用38对黄萎病抗性相关影响因子设计的引物进行PCR扩增，有9对引物扩增出条带，其中VM13、VM23、VM25、BNL0946、BNL1414、BNL1721、em6×me2和em1×me5这8对引物扩增出不同的条带，来源于抗病相关基因的蛋白、染色体、mRNA序列、SSR和SRAP引物，可能直接编码抗病相关基因、染色体、mRNA序列更容易筛选出与黄萎病抗性紧密连锁的分子标记。其他编码茉莉酸、水杨酸、乙烯、核黄素、Harpins 蛋白、几丁质酶前体、防御素、壳寡糖的引物未扩增出条带，可能是这

*新疆农业大学博士学位论文*

些抗病性相关影响因子虽然在抗病性中起作用，但目前研究未找到受体，且大多是在信号通路中起作用，需经过病原物诱导，由前体合成，积累再通过信号通路转导，才起抗病作用。

### **7.3.3** 分子标记筛选结果与供试棉花品种来源的关系

引物em6×me2扩增条带与抗病品种符合率最高，达到1，VM13、BNL1414、VM25扩增条带与抗病品种符合率为0.857，引物VM13、BNL1721、BNL1414和em6me2扩增条带与耐病品种符合率最低，为0；BNL1721、VM23与感病品种符合率最低，为0，VM13与感病品种符合率较低，为0.125，BNL1414、em6×me2与感病品种符合率较低，为0.25。引物VM13、BNL1414、em6×me2扩增条带与抗病品种符合率高于0.857，与感病品种符合率低于0.25，这3种引物的扩增条带可以作为黄萎病抗性的分子标记鉴定指标。

新疆自育品种较多出现的扩增条带，与新疆自育品种符合率介于0.364～0.727之间，平均值为0.515；与其它地区所育品种的符合率介于0.111～0.666，平均值为0.419，与新疆自育品种符合率略高于其它地区所育品种的符合率，可能是因为新疆自育品种有些本身来源于外地品种，如苏联品种108夫、美国品种PIMA，所以不易用分子标记区分。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

# 第8章 结论

1. **对比5种接种鉴定方法，出现感病症状的时间由短到长的顺序为叶片针刺涂抹法、切根蘸菌法、定量注菌法、菌液浇根法。**叶片针刺涂抹法操作简便，适宜短期处理大批棉株，快速鉴定棉花对黄萎病的抗性；与病圃剖秆鉴定法的一致性达到70.83 %。切根蘸菌法和定量注菌法较能反应多个棉花品种在田间的黄萎病抗性情况。

2. **棉花黄萎病抗性与农艺性状有相关关系。**海岛棉品种抗病性普遍较高，陆地棉品种对黄萎病抗性较低。海陆杂交群体对黄萎病的抗性比陆陆杂交群体对黄萎病的抗性普遍高。

陆地棉品种中，抗病品种比感病品种的有效果枝数、单株有效铃数多；陆陆杂交群体M44中，抗病株系比感病株系有效果枝数、单株结铃数、单株有效铃数多。黄萎病发病越严重，单株成铃性就越小。在海岛棉品种中，随相对病情指数增加，株高呈显著矮化，海岛棉的株高普遍高于陆地棉；海陆杂交群体中，随相对病情指数增加，植株矮

化。

**3. 抗病棉花品种（株系）与感病棉花品种（株系）的根、茎、叶部细胞结构存在**

**差异。**高抗棉花品种（株系）的根、茎部表皮细胞、薄壁组织细胞、导管细胞和木质部细胞都最小；而感病棉花品种（株系）的茎部表皮细胞、根、茎部薄壁组织细胞、茎部导管细胞和木质部细胞都最大。高抗品种的叶部上表皮细胞面积、薄壁组织细胞面积、下表皮细胞面积比感病品种小，抗病、耐病品种依次介于两者之间，抗病薄壁细胞面积较耐病的高。茎部表皮细胞面积比根部、叶部表皮细胞均小，与抗病性相关系数比根部、叶部表皮细胞与抗病性相关系数均大。

4. **抗病棉花品种（株系）与感病棉花品种（株系）的SOD、POD、PAL活性存在差异。**10: 00测定苗期第一片真叶，高抗、抗病品种（株系）SOD活性相对较高，感病品种（株系）SOD活性比其他品种（株系）低，感病性越高SOD活性越低，酶活性变化与品种感病性基本一致。抗病品种（株系）的POD活性最高，耐病品种（株系）、感病品种（株系）POD活性普遍较低。感病性越高，PAL活性越低。

**5. 利用抗病品种海岛棉新海20号、感病品种陆地棉硕丰1号及杂交群体M37 后**

*新疆农业大学博士学位论文*

**代的总DNA为材料，分别使用78对SRAP引物进行筛选，得到与黄萎病抗性相关的4个SRAP标记，分别是me1**×**em3，me1**×**em11，me4**×**em11和me5**×**em7，用这4对SRAP引物较易筛选出与田间抗病性符合的棉花材料。**在抗病新海20号、感病硕丰

1号及抗病辽棉18号与感病军棉1号间得到3对RGA多态性引物，分别是Gbrga18、

Gbrga8、Gbrga42；得到4对SSR多态性引物分别是BNL3558、BNL1414、BNL1681、

BNL1721；得到3对SRAP多态性引物，分别是me1×em3、me1×em5、me6×em2。**以新海20号、硕丰1号以及新海20号×硕丰1号的杂交后代M37株系为材料，有3对引物在抗、感基因池中存在多态性条带，分别是SRAP引物me1**×**em3、me1**×**em11、me4**×

**em11。**引物me1×em3扩增出的差异带的大小在113 bp，引物me1×em11扩增差异带的大小在1366 bp，me4×em11扩增出的差异带的大小在126 bp。

**6. 使用38对黄萎病抗性相关影响因子设计的引物进行PCR扩增后，VM13、VM23、**

**VM25、BNL0946、BNL1414、BNL1721、em6**×**me2和em1**×**me5这8对引物进行PCR扩增出不同的条带。**来源于抗病相关基因的蛋白、染色体、mRNA序列、SSR和SRAP引物。引物VM13、BNL1414、em6×me2扩增条带与抗病品种符合率高于0.857，与感病品种符合率低于0.25，这3种引物的扩增条带可以作为黄萎病抗性的分子标记鉴定指标。

新疆自育品种较多出现的扩增条带，与新疆自育品种符合率介于0.364～0.727之间，平均值为0.515；与其它地区所育品种的符合率介于0.111～0.666之间，平均值为0.419，与新疆自育品种符合率略高于与其它地区所育品种的符合率。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

参考文献

[1] 许宗弘. 棉花枯黄萎病研究现状及展望[J]. 知识经济, 2010, （16）: 113.

[2] Y. Bolek, A. A. Bell, K. M. El-Zik. Reaction of cotton cultivars and an F2 population to stem inoculation with isolates *Verticillium dahlia*[J]. Blackwell Verlag, Berlin, 2005, (153): 269-273.

[3] 马存. 棉花枯萎病和黄萎病的研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.

[4] 袁文力, 胡新友, 何海芬. 棉花黄萎病在石河子棉区发病重的原因分析[J]. 新疆农垦科技, 2010, （4）: 35-36.

[5] 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.

[6] 马存, 简桂良, 孙文姬. 我国棉花抗黄萎病育种现状、问题及对策[J]. 中国农业科学, 1997, 30（2）: 58-64.

[7] 乐锦华, 祝建波, 崔百明, 等. 新疆棉花抗黄、枯萎病转基因研究[A]. 中国科协首届学术年会, 1999: 10.

[8] 刘桂珍, 蓝海燕, 田颖川, 等. 利用激光微束穿刺法获得抗黄萎病转基因棉花的研究[J]. 中国激光, 2000, 27(3): 279-283.

[9] 邓先明. 棉花黄萎病菌种的鉴定[J]. 西北农学院学报, 1983, 8（1）: 90-94.

[10] 姚理文, 朱颖初, 石磊岩, 等. 长江流域棉区黄萎病菌“种”的鉴定简报[J]. 植物保护, 1984, 1（4）: 42.

[11] 张绪振, 张树琴, 李庆基, 等. 我国棉花黄萎病菌“种”的鉴定[J]. 植物病理学报, 1981, 1（3）: 13-18.

[12] 吴洵耻, 杨翠云, 姜士理, 等. ft东省棉花黄萎病菌“种”的鉴定[J]. ft东农业大学学报, 1984, 2（1）: 105-112.

[13] 石磊岩. 中国棉花枯、黄萎病菌研究[J]. 棉花学报, 1996, 8（6）: 292-294.

*[14]* C W Schnathorst, E D Mathre. Host range and differentiation of a severe form of *Verticillium albo-atrum*in cotton[J]. Phytopathology, 1966, 56: 1155-1161.

[15] 刘学堂, 宋晓轩, 郭金城, 等. 我国棉花黄萎病菌群体遗传分析研究初报[J]. 棉花学报, 1997, 9（4）: 223-224.

[16] 王杰, 郭金城, 李为. 河南省棉花黄菱病菌致病力测定初报[J]. 棉花学报, 1993, 5（1）: 95.

[17] 吴献忠, 李风玲, 郑长英, 等. ft东棉花黄萎病菌致病力分化的研究[J]. 植物保护, 1995, 27（6）: 2-5.

[18] 朱荷琴, 宋晓轩, 简桂良. 棉花黄萎病菌致病力变异生理机制的初步研究[J]. 棉花学报, 2004, 16(5）: 275-279.

[19] 吕金殿, 甘莉, 阎龙飞. 棉花黄萎病菌毒素的纯化与特性研究[J]. 植物病理学报, 1991, 21（2）: 129-133.

*新疆农业大学博士学位论文*

[20] W P Talboys. Association of tylosis and hyperpiasia of the xylem with vascular invasion of the hop by*Valboatrum albo-atrum*[J]. Transactions of British Mycological Society, 1958, 41(2): 249-260.

[21] T N Keen, C D Erwin. Endopolygalacturonase: evidence against involvement in *Verticillium wilt* of coton[J]. Phytopathology, 1971, 61: 198-203.

[22] 华南农学院. 植物病理学[M]. 北京: 农业出版社, 1980: 217-218.

[23] 章元寿, 王建新, 方中达, 等. 大丽轮枝菌毒素的分离、提纯及生物测定[J]. 真菌学报, 1989, 8（2）: 140-141.

[24] 陈旭升, 陈永萱, 黄骏麒. 棉花黄萎病菌致病性生理生化研究进展[J]. 棉花学报, 2001, 13（3）: 183-187.

[25] 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, (4）: 228-232.

[26] 石磊岩, 孙文姬. 棉花抗黄萎病苗期鉴定方法[J]. 植物保护, 1987, 13（1）: 427.

[27] 夏正俊, 顾本康, 吴蔼民. 棉花品种黄萎病抗性与生化成分相关分析[J]. 中国农业科学, 1991, 24（1）: 9.

[28] 张淑珍. 植物病原菌毒素研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2001（2）: 42-43.

[29] 简桂良, 孙文姬, 马存. 棉花黄萎病抗性鉴定新方法—无底塑钵菌液浇根法[J]. 棉花学报, 2001, 13(2）: 67-69.

[30] 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.

[31] 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.

[32] H C Beckman, C E Tjamos. Vascular wilt disease of plants. Basic studies and control[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1989: 153-166.

[33] 姚焕章. 棉花抗黄萎病生理与生化机制研究[J]. 华东农业科学通讯, 1956, 3（7）: 354.

[34] A A Bell. *Verticillium wilt*[A]. In: Hillocks R J ed, cotton disease[C]. Wallingford: CBA international, 1992: 87-126.

[35] 裴炎, 张凤鑫, 梅选民. 对黄萎病不同抗性的棉花品种（系）的酯酶同工酶等电聚焦谱带分析[J]. 西南农业大学学报, 1989, 11（1）: 90-92.

[36] 田秀明, 杜立峰. 棉花对枯、黄萎病抗性与过氧化物酶活性的关系[J]. 植物病理学报, 1991, 21（1）: 94.

[37] A A Bell. Formation of gossypol in infected and chemically irritated tissues of *Gossypium* species [J]. Phytopathology, 1967, 57: 759-764.

*[38]* E M Mace, D R Stipanovic, A A Bell. Toxicity and role of terpenoid phytoalexins in *Verticillium wilt*resistance in cotton[J]. Physiologic Plant Patholgy, 1985, 26: 209-218.

[39] A N Garas, M S Wilhem, E J Sagen. Relationship of cultivars resistance to distribution of *Verticillium dahliae* in inoculated cotton plants and to growth of single conidia on excised stem segments [J].

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

Phytopathology, 1986, 76: 1005-1010.

[40] 甘莉, 吕金殿, 汪沛洪. 棉花品种中糖及单宁与抗黄萎病的关系[J]. 陕西农业科学, 1989, 3（6）: 13-14.

[41] V F Bahaev. Role of tannins in the resistance of cultivars of cotton to *cotton wilt*[J]. Chemistry Abstract, 1964, 64: 1021-1028.

[42] Li Xu, Longfu Zhu, Lili Tu, *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 ournal of Experimental Botany, 2011, 62(15): 5607–5621.

[43] 董宏平, 彭建令, 余晓江, 等. 植物抗病性信号传导调控基因的克隆与表达检测方法的研究[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26（4）: 30-35.

[44] 赵小明. 壳寡糖诱导植物抗病性及其诱抗机理的初步研究[D]. 中国科学院研究生院（大连化学物理研究所）博士学位论文, 2006: 54-63.

[45] J L Peng, H S Dong, H P Dong, *et al*. Harpin-elieited hypersensitive cell death and pathogen resistance requires the *NDRI* and *EDSI* genes[J]. Physiology Molecular Plant Pathology, 2003, 62: 317-326.

[46] F Q Liu, H X Liu, Q Jia, *et al*. The internal Glyeine-rich motif and cystein suppress several effects of the HpaGxooc Protein in Plants[J]. Phytopathology Pathology, 2006, 96: 1052-1059.

[47] L. Chen, J. Qian, S. Qu, *et al*. Identification of specific fragments of HpaGXooc, a harpin from Xanthomonas oryzae pv. oryzicola, that induce disease resistance and enhance growth in plants[J]. Phytopathology, 2008, 98(7): 781-791.

[48] 任秀艳. Harpins蛋白诱导植物生长和防卫的信号传导交叉调控及植物互作因子的研究[D]. 南京农业大学博士学位论文, 2006, 16.

[49] 杨树维, 冯娟, 任正隆. 植物防御素的生物学活性及其应用前景[J]. 生命科学仪器, 2010, 8（12）: 35-38.

[50] F R. Terras, H M. Schoofs, M F. De Bolle, *et al*. Analysis of two novel classes of antifungal proteinsfrom radish (*Raphanus sativus* L.) seeds[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(22): 15301-15309.

[51] 苏丽娜, 杨银凤. 多功能的宿主防御肽-防御素[J]. 中国畜禽种业, 2011, 1: 23-26.

[52] 孙红星. 绿色木霉LTR-242KDa几丁质酶基因的克隆及转基因番茄的构建[D]. ft东理工大学硕士学位论文, 2008: 1.

[53] K Hiramatsu. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance[J]. Lancet Infectious Diseases, 2001, 1(3): 147-150.

[54] 单立波, 贾旭. 几丁质酶及其在抗真菌病基因工程中的应用[J]. 生物工程进展, 1998, 18（3）: 37-39.

[55] 王金生. 分子植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 217-230.

[56] 任文彬, 张世清, 黄俊生. 金龟子绿僵菌（*Metarhizium anisopliae* HN1）几丁质酶基因的克隆及高

*新疆农业大学博士学位论文*

效表达[J].中国生物工程杂志, 2006, 26（7）: 31-36.

[57] J. Jayaraj. Z, K. Punja. Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens[J]. Geneti Transfromation and Hybridization, 2007, 26(10): 1539-1564.

[58] Vellicce R. Gabriel, Juan C. Diaz Ricci, La zaro Herna ndez, *et al*. Enhanced resistance to Botrytis cinerea mediated by the transgenic expression of the chitinase gene ch5B in strawberry[J]. Transgenic Research, 2006, 15: 57-68.

[59] 许明辉, 唐祚舜, 谭亚玲, 等. 几丁质-葡聚糖酶双价基因导入滇型杂交稻恢复系提高稻瘟病抗性的研究[J]. 遗传学报, 2003, 30（4）: 330-334.

[60] S Wilhelm, E James, Sagen, *et al.* Resistance to *Verticilliurn wilt* in cotton: sources, techniques of identification, inheritance trends, and the resistance potential of multiline cultivars [J]. Phytopathology, 1974, 64(7): 924-931.

[61] 潘家驹, 张天真, 蒯本科, 等. 棉花黄萎病抗性遗传研究[J]. 南京农业大学学报, 1994, 17（3）: 8-18.

[62] M K Al-Rawi, A A Ahmed. A quantitative genetic analysis of the inherritance of resistance to *Verticillium wilt* of Upland cotton [J]. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 1984, 2(2): 13-23.

[63] 校百才, 景忆莲, 刘耀斌, 等. 陆地棉黄萎病抗性状遗传的初步研究[J]. 西北农业学报, 1998, 7（2）: 55-58.

[64] J. Robb, R. Moukhamedov, X. Hu, *et al*. Putative subgroups of *Verticillium albo-atrum* distinguishable by PCR-based assays[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1993, 43: 423-436.

[65] D D Tzeng, E J De. Physiological reponses of *Gossypium hisutum* L. to infection by defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* Kleb. [J]. Physiologial Plant Pathology, 1985, 12(3): 1123-1127.

[66] S G Johal, P S Briggs. Reductase activity encoded by the *HM1* disease resistance gene in maize[J]. Science, 1992, 258(5084): 985-987.

[67] B G Martin, H S Brommonschenkel, J Chunvuongse, *et al*. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato[J]. Science, 1993, 262(5138): 432-436.

[68] M Dilbirligi, S K Gill. Identification and analysis of expressed resistance gene sequences in Wheat[J]. Plant Molecular Biology, 2003, 53(6): 771-787.

[69] 朱龙付, 涂礼莉, 张献龙. 黄萎病菌诱导的海岛棉抗病反应的SSH文库构建及分析[J]. 遗传学报, 2005, 32(5): 528-532.

[70] 赵其波, 孔庆平, 阿里圃·艾尔西, 等. 新海20 号品种简介及栽培技术[J]. 中国棉花, 2005, （5）: 17.

[71] 吴琼, 顾恒琴, 胡玉枢, 等. 辽棉18号特征特性及栽培技术规程[J]. 辽宁农业科学, 2003, （6）: 48.

[72] Jinfa Zhang, S. Sanogo, R. Flynn, *et al*. Germplasm evaluation and transfer of *Verticillium wilt* resistance

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

From Pima (*Gossypium barbadense*) to Upland cotton (*G. hirsutum*)[J]. Euphytica, 2012, 187: 147–160.

[73] 易图永, 谢丙炎, 张宝玺, 等. 植物抗病基因同源序列及其在抗病基因克隆与定位中的应用[J]. 生物技术通报, 2002, 3（2）: 18-22.

[[74] B G Martin.](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526699800491) Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors[J]. [Current Opinion in Plant Biology](http://www.sciencedirect.com/science/journal/13695266), 1999, 2(4): 273–279.

[75] Ying-Hui Guo, Yue-Ping Yu, Dong Wang, *et al*. GhZFP1, a novel CCCH-type zinc finger protein from cotton, enhances salt stress tolerance and fungal disease resistance in transgenic tobacco by interacting with GZIRD21A and GZIPR5[J]. New Phytologist, 2009, [183(1)](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.2009.183.issue-1/issuetoc): 62–75.

[76] 杨勤忠, 杨佩文, 王群, 等. 水稻抗病基因同源序列的克隆及测序分析[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(4）: 241-247.

[77] M T Donald, Pellerone F, Adam-Blondon A F, *et al*. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104(4): 610-618.

[78] S Hunger, D G Gaspero, S Mohring, *et al*. Isolation and linkage analysis of expressed disease-resistance gene analogues of sugar beet(*Beta vulgaris* L. )[J]. Genome, 2003, 46 (1): 70-72.

[79] D Leister, A Ballvora, F Salamini, *et al*. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants[J]. Nature Genetics, 1996, 14(4): 421-429.

[80] O Radwan, F M Bouzidi, F Vear, *et al*. Identification of non-TIR-NBS-LRR markers linked to the PI5/PI8 locus for resistance to downy mildew in sunflower[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(8): 1438-1446.

[81] V Mohler, A Klahr, G Wenzel, *et al*. A resistance gene analog useful for targeting disease resistance genes against different pathogens on group 1S chromosomes of barley, Wheat and rye[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105(2-3): 364-368.

[82] 高玉龙, 郭旺珍, 王磊, 等. 海岛棉抗病基因类似物与防卫基因类似物的分离及特征分析[J]. 中国科学C 辑（生命科学）, 2006, 36 （2）: 97-108.

[83] Vilas Parkhi, Vinod Kumar, LeAnne M. Campbell, *et al*. Resistance against various fungal pathogens and reniform nematode in transgenic cotton plants expressing Arabidopsis *NPR1*[J]. Transgenic Research, 2010, 19: 959–975.

[84] Jing Shi, Liang Zhang, Hailong An, *et al*. *GhMPK16*, a novel stress-responsive group D MAPK gene from cotton, is involved in disease resistance and drought sensitivity[J]. BMC Molecular Biology, 2011, 12: 22.

[85] Jing Shi, Hai-Long An, Liang Zhang, *et al*. *GhMPK7*, a novel multiple stress-responsive cotton group

*新疆农业大学博士学位论文*

C MAPK gene, has a role in broad spectrum disease resistance and plant development[J]. Plant Molecular Biology, 2010, 74(1-2): 1–17.

[86] D Bostsein, L R White, M Skolnick, *et al*. Construction of a genetics Linkage map in man using restriction fragment polymorphisms[J]. The American Journal of HumanGenetics, 1980, 32(3): 314-331.

[87] M Zabeau, P Vos. Selective restriction fragment amplification: European, 0534858[P]. 1993-01-22.

[88] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorpgism(SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(2-3): 455-461.

[89] Kliebenstein Dan. Quantitative Genomics: Analyzing intraspeciﬁc variation using global gene expression polymorphisms or eQTLs[J]. Annual Review Plant Biology, 2009, 60: 93–114.

[90] X L Shen, Y J He, Lubbers L. Edward, *et al*. Fine mapping QMi-C11 a major QTL controlling root-knot nematodes resistance in upland cotton[J]. [Theoretical and Applied Genetics](http://www.springerlink.com/content/0040-5752/), 2010, [121(8](http://www.springerlink.com/content/0040-5752/121/8/)): 1623-1631.

[91] Eynck C., Koopmann B., Grunewaldt-Stoecker G., *et al*. Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with Brassica napus detected with molecular and histological techniques[J]. European Journal of Plant Pathology, 2007, 118: 259–274.

[92] Ky L. Mathews, Marcos Malosetti, Scott Chapman, *et al*. Multi-environment QTL mixed models for drought stress adaptation in wheat[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 117: 1077–1091.

[93] Encarnacion Perez-Artes, Maria D. Garcia-Pedrajas, Jose Bejarano-Alcazar, *et al*. Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of Verticillium dahliae by RAPD and specific PCR analyses[J]. European Journal of Plant Pathology, 2000, 106: 507–517.

[94] Abdul Samad Mumtaz, Muhammad Naveed, Zabta Khan Shinwari. Assessment of genetic diversity and germination pattern in selected cotton genotypes of Pakistan[J]. Pakistan Journal of Botany, 2010, 42(6）: 3949-3956.

[95] B H Wang, Y T Wu, N T Huang, *et al*. QTL mapping for plant architecture traits in upland cotton using RILs and SSR markers[J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(2): 161-170.

[96] N. Piyasatian, R. L. Fernando, J. C. M. Dekkers. Models for marker-assisted genetic evaluation with multiple QTL in a crossbred population[J]. Livestock Science, 2009, 125: 141–148.

[97] V Geffroy, M Sevignac, F C Julio, *et al*. Inheritance of partial resistance against colletotrichum in phaseolus vnlqaris and colocalization of quantitative trait loci vuith genes involved in specific resistance[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13(3): 287-296.

[98] C X Jiang, Wright R J, El-Zik K, *et al*. Polyploid formation created unique avenues for response to selection in *Gossypium*(cotton)[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95（8）:

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

1419-1424.

[99] L P Zhang, Khan A, Nino-Liu D, *et al*. A molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations of resistance gene analogs based on a *Lycopersicon esculentnrn*×*Lycopersicon hirsutum* cross[J]. Genome, 2002, 45(1): 133-146.

[100] 高玉千, 聂以春, 张献龙. 棉花抗黄萎病基因的QTL定位[J]. 棉花学报, 2003, 15（2）: 73-78.

[101] 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 等. 棉花SRAP遗传连锁图构建[J]. 科学通报, 2003, 48（15）: 1676-1679.

[102] Z G Han, W Z Guo, X L Song, *et al*. Genetic mapping of EST-derived microsatellites from the diploid*Gossypium arboreum* in allotetraploid cotton[J]. Molecular Genetics Genomics, 2004, 272: 308-327.

[103] 左开井, 孙济中, 张献龙, 等. 利用RFLP, SSR和RAPD标记构建陆地棉分子标记连锁图[J]. 华中农业大学学报, 2000, 19（3）: 190-193.

[104] M J Lacape, B T Nguyen, S Thibivilliers, *et al*. A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum×Gossypium barbadense* backcross population[J]. Genome, 2003, 46: 612-626.

[105] M Mei, H N Syed, W Gao, *et al*. Genetic mapping and QTL analysis of fibre-related traits in cotton(*Gossypium*)[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 108: 280-291.

[106] C Yang, W Z Guo, G Y Li, *et al*. [QTLs mapping for *Verticillium wilt* resistance at seedling and maturity stages in *Gossypium barbadense* L. [J].](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945207003081) Plant Science, 2008, 174(3): 290-298.

[107] B H Wang, W Z Guo, X F Zhu, *et al*. QTL mapping of yield and yield components for elite hybrid derived-RILs in upland cotton. Journal of Genetics and Genomics (Formerly Acta Genetica Sinica), 2007, 34(1): 35-45.

[108] X X Ma, Y Z Ding, B L Zhou, *et al*. QTL mapping in A-genome diploid Asiatic cotton and their congruence analysis with AD-genome tetraploid cotton in genus *Gossypium*. Journal of Genetics and Genomics, 2008, 35: 751-762.

[109] F Jiang, J Zhao, L Zhou, *et al*. Molecular mapping of *Verticillium wilt* resistance QTL clustered on chromosomes D7 and D9 in upland cotton[J]. [Science in China Series C: Life Sciences](http://www.springerlink.com/content/1006-9305/), 2009, [52(9)](http://www.springerlink.com/content/1006-9305/52/9/): 872-884.

[110] Anna Blenda, David D. Fang, Jean Franc¸*et al*. A high density consensus genetic map of tetraploid cotton that integrates multiple component maps through molecular marker redundancy check[J]. PLoS ONE 7(9): 45739. doi: 10.1371/journal. pone. 0045739.

[111] 夏兰芹, 郭三堆. 棉花RNA的快速提取方法. 棉花学报[J]. 2000, 12（4）: 205-207.

[112] 任杰, 徐秀红, 张素丽, 等. 一种高效提取植物不同组织RNA的方法[J]. 华北农学报, 2011, 26（增刊）: 35-38.

[113] Kanniah Rajasekaran, Jeffrey W. Cary, Jesse M. Jaynes, *et al*. Disease resistance conferred by the expression of a gene encoding a synthetic peptide in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L. )

*新疆农业大学博士学位论文*

Plants[J]. Plant Biotechnology Journal, 2005, [3(6):](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pbi.2005.3.issue-6/issuetoc) 545–554.

[114] Jan E. Leach, Casiana M. Vera Cruz, Jianfa Bai, *et al*. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes [J]. Annual Review of Phytopathology, 2001, 39: 187-224.

[115] 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: 105-108.

[116] 潘家驹. 棉花育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 443-458.

[117] 沈其益. 棉花病害基础理论与防治[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 128-151.

[118] 马存, 戴晓枫. 棉花病虫害防治彩色图说[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 67.

[119] 张兴华, 李捷. 棉花抗枯、黄萎病研究进展及其抗性鉴定方法[J]. 江西农业学报, 2008, 20（3）: 43-49.

[120] 彭姗, 吕学莲, 高峰, 等. 一种新的棉花黄、枯萎病快速接种方法的研究[J]. 棉花学报, 2008, 20(3）: 174-178.

[121] 简桂良, 孙文姬, 马存. 棉花黄萎病抗性鉴定新方法——无底塑钵菌液浇根法[J]. 棉花学报, 2001, 13(2): 67-69.

[122] 房卫平, 祝水金, 季道藩. 陆地棉和海岛棉的黄萎病抗性遗传研究[J]. 棉花学报, 2003, 15（1）: 3-7.

[123] 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, 20(2): 210-217.

[124] 周凯南, 车先礼. 棉花枯萎病抗病性鉴定方法探讨[J]. ft东农业大学学报, 1986, 17（4）: 59-66.

[125] 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.

[126] 顾本康, 李经仪, 陈春泉, 等. 棉花黄萎病人工病圃设计与种质资源抗性测定[J]. 江苏农业学报, 1985, 1(4): 21-27.

[127] 叶鹏盛, 曾华木, 李琼芳, 等. 棉花品种对枯黄萎病的抗性鉴定研究[J]. 中国棉花, 2005, 32（11）: 16-17.

[128] 李振歧, 商鸿生. 中国农作物抗病性及其利用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005．

[129] 中国农业科学院棉花研究所. 中国棉花遗传育种学[M]. 济南: ft东科学技术出版社, 2003．

[130] A I Dubery, R Meyer. Specific binding of a *Verticillium dahliae* phytototin to protoplasts of cotton, *Gossypiumhirsutum*[J]. Plant Cell Reports, 1996, 5(10): 777-780 .

[131] R Lin Liub. Physiological mechanisms involved in resistance to cotton *Verticillium wilt* incluced by AM fungi[J]. Journal of Zhejiang University(Agriculture & Life Science), 2004, 30(4): 427.

[132] 朱荷琴, 宋晓轩, 孙君灵, 等. 棉花新品种黄萎病抗性鉴定[J]. 中国棉花, 2000, 27（9）: 28-29.

[133] 朱青竹, 赵国忠, 马峙英. 不同来源棉花种质资源材料主要农艺经济性状鉴定与分析[J]． 棉花学报, 2002, 14(4): 237-241．

[134] V E Gary, G M Robert. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture[J]. Crop Science, 2004, 44: 1920-1934.

[135] M Mert, S Kurt, O Gencer, *et al*. Inheritance of resistance to *Verticillium wilt* (*Verticillium dahliae*)

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

In cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Plant Breeding, 2005, 124(1): 102-104.

[136] 顾爱星, 张翠芳, 曲延英, 等. 不同棉花品种（系）的黄萎病抗性及其与经济性状的相关性[J]. 西北农业学报, 2010, 19（11）: 58-63.

[137] 沈其益． 棉花病害－基础研究与方法[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 144-145．

[138] 张名恢. 苏联棉花抗黄萎病棉花品种得系谱及育种技术[J]. 国外农业科技, 1986, （6）: 5-8.

[139] 王忠义, 赵敬霞. 棉花黄萎病的抗性表现及选择[J]. 中国棉花, 1994, 21（7）: 18.

[140] 周庭辉, 戴小枫. 棉花抗黄萎病生理与生化机制研究[J]. 分子植物育种, 2006, 4（4）: 593-600.

[141] 石磊岩. 中国棉花枯、黄萎病病原菌研究[J]. 棉花学报, 1996, 8（6）: 292-294.

[142] J A Bejarano, M V Melero, A M Blanco, *et al*. Influence of inoculum density of defoliating and nondefoliating pathltypes of *Verticillium dahliae* on epidemics of *Verticillium wilt* of cotton in southern Spain[J]. Phytopathology, 1995, 85: 1474-1481.

[143] 顾爱星, 张翠芳, 曲延英, 等. 棉花组织结构与黄萎病抗性的关系[J]. 植物病理学报, 2011, 41（5）: 502-508.

[144] 马远莉, 甘莉, 吕金殿. 棉花各部位黄萎病菌在导管中的分布[J]. 陕西农业科学, 1990, 5: 1-2.

[145] 陈旭升, 陈永萱, 黄骏麒. 黄萎病菌致萎毒素引起棉苗维管系统变化的电镜观察[J]. 棉花学报, 1996, 8(5): 111-112.

[146] 蒋玉蓉, 方卫平, 祝水金, 等. 陆地棉植株, 组织结构和生化代谢与黄萎病抗性的关系[J]. 作物学报, 2005, 3(31): 337-341.

[147] 马存, 简桂良, 孙文姬. 我国棉花抗黄萎病育种现状、问题及展望[J]. 中国农业科学, 1997, 30（2）: 58-64.

[148] 马存, 简桂良, 郑传临. 中国棉花抗枯、黄萎病育种50年[J]. 中国农业科学, 2002, 35（5）: 508-513.

[149] 夏正俊, 顾本康, 吴蔼民, 等. 棉花品种黄萎病抗性与体内生化成分相关分析[J]. 植物保护学报, 1994, 21(4): 305-310.

[150] 陈旭升, 陈永萱, 黄骏麒. 棉花黄萎病菌致病性生理生化研究进展[J]. 棉花学报, 2001, 13（3）: 183-187.

[151] 张翠芳. 棉花抗黄萎病性鉴定体系的优化和抗性机制的研究[D]. 新疆农业大学硕士学位论文, 2010: 20.

[152] 杨玉锋. 不同棉花品种对黄萎病的生理生化抗性机制研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34（16）: 3924-3925.

[153] 章元寿. 植物病理生理学[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1996.

[154] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990.

[155] 欧阳光察, 应初衍, 王昊, 等. 胚乳对幼苗中苯丙氨酸解氨酶（PAL）活性的影响[J]. 植物生理学报, 1987, 13(2): 122-128.

[156] 郭海军, 董志强, 林永增, 等. 黄萎病对棉花叶片SOD、POD酶活性和光合特性的影响[J]. 中国农业科学, 1995, 28（6）: 40-46.

*新疆农业大学博士学位论文*

[157] 欧阳本廉, 许昌明, 汤永军, 等. 特早熟棉硕丰1号特征特性及栽培要点[J]. 农村科技, 2007, 5: 46.

[158] 纪好勤. 棉花黄萎病抗性的生理生化指标探讨[J]. 华北农学报, 1995, 10（3）: 73-75.

[159] 杨玉锋. 不同棉花品种对黄萎病的生理生化抗性机制研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34（16）: 3924-3925.

[160] 尤满仓. 陆地棉-军棉1号[J]. 新疆农垦科技, 1979, 5: 8.

[161] 刘学堂, 宋晓轩, 郭金城. 棉花黄萎病菌的研究及最新进展[J]. 棉花学报, 1998, 10（1）: 6-13.

[162] 马存, 陈其焕. 我国棉花抗枯黄萎病育种研究进展[J]． 中国农业科学, 1992, 25（1）: 30-37.

[163] 谭联望. 北方棉区棉花黄萎病菌发病原因及治理对策[J]. 中国棉花, 1994, 21（7）: 2-4.

[164] 杜威世, 杜雄明, 马峙英. 棉花黄萎病抗性遗传和分子生物学研究进展[J]. 棉花学报, 2002, 14（5）: 311-317.

[165] 陆家云. 江苏棉花黄萎病菌（*Verticillium wilt*）致病力的分化[J]. 南京农业大学学报, 1983, （1）: 36-43.

[166] 喻树迅, 范术丽. 我国棉花遗传育种进展与展望[J]. 棉花学报, 2003, 15（2）: 120-124.

[167] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物DNA标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[168] H A Paterson. Molecular dissection of quantitative traits: progress and prospects[J]. Genome Research, 1995, 5: 321-333.

[169] 中国农业科学院棉花研究所主编. 中国棉花遗传育种学[M]. 济南: ft东科学技术出版社, 2003.

[170] 王省芬, 甄瑞, 马峙英, 等. 海岛棉品种抗黄萎病基因SSR标记的验证及克隆[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(2), 149-152.

[171] 曲延英, 张强. 4种快速提取棉花总DNA方法的比较[J]. 新疆农业大学学报, 1999, 22（4）: 320-322.

[172] 孙鑫, 崔洪志, 胡宝忠, 等. SDS-CTAB结合法提取棉花总DNA[J]. 生物技术通报, 2004, （5）: 45-47.

[173] 曹承忠, 李洪连, 简桂良. 陆地棉杭黄萎病AFLP和RGA分子标记研究[D]. 河南农业大学硕士学位论文, 2005.

[174] 段红英, 丁笑生. 棉花抗黄萎病基因工程研究综述[J]. 作物杂志, 2007, 1: 12-14.

[175] 闵留芳, 张天真, 潘家驹. 有关棉花黄萎病（*Verticillium* dahlia Kleb. ）抗性遗传研究的几个问题[J]. 棉花学报, 1995, 7（4）: 197-201．

[176] 赵建军. 北疆棉花黄萎病发生现状及防治对策[J]. 植物医生, 2011, 24（4）: 49.

[177] J Kuc. Development and future direction of induced systemic resistance in plants[J]. Crop Protection. 2000, 19: 859-861.

[178] 吴洵耻, 刘波. 棉花黄萎病菌菌株间交互保护作用的研究（1）两菌株有效间隔天数的试验[J]. 植物病理学报, 1987, 17（4）: 215-218.

[179] 吕素莲. 转*betA*和*TsVP*基因提高棉花耐盐、抗旱性的研究[D]. ft东大学博士学位论文, 2007: 67.

[180] 刘海洋, 努尔孜亚, 毕海燕, 等. 新疆棉花黄萎病抗性鉴定与评价[J]. 新疆农业科学, 2012, 49（5）:

873-878.

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

[181] 翟庆哲. 茉莉酸信号途径的化学遗传学解析[D]. ft东农业大学硕士学位论文, 2006: 6.

[182] 朱有勇, 王云月, Lyon B R. 棉花黄萎病PCR检测[J]. 云南农业大学学报, 1998, 13（3）: 161-163.

[183] G Wu, B J Shortt, E B Lawrence, *et al*. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H2O2-generating glucose oxidase in transgenic potato plant[J]. The Plant Cell, 1995, 7(9): 1357-1368.

[184] F Murray, D Llewellyn, H McFadden, *et al*. Expression of the talaromyces flavus glucose oxidase gene in

Cotton and tobacco reduces fungal infection, but is also phytotoxic[J]. Molecular Breeding, 1999, 5(3)：219-232.

*新疆农业大学博士学位论文*

附录：

附表1 RGA引物序列

Table 1 Sequences of RGA primers

| 引物名称 | 正向引物（F）（ 5’-3' ） | 反向引物（R）（ 5’-3' ） |
| --- | --- | --- |
| Gbrga3 | TTCACCACATACCTCCAAAGC | AGCACCACGCCAGACAAG |
| Gbrga8 | CTCAGAGCCTCGTTTATTTG | AGAGTTCCTTCCCACAGTTT |
| Gbrga12 | ATCCCAGACAATCAGCCC | CGAACTTCCCAAGGAGACA |
| Gbrga18 | CGAGGCTCACTGAACTACTG | TCATCATACAACGCATCCC |
| Gbrga23 | CTACCTCAGAGCCTCGTTTA | ATGGACACCTATCCCAGTTT |
| Gbrga28 | CTACCTCAGAGCCTCGTTTA | ATCCCACCATAGCCTTTTG |
| Gbrga42 | TACTGCTGTTGCCTTGCTT | CTCATCGTCGTCCCTAAAA |
| Gbrga44 | CTGCTGTTGCCTTGCTTCT | CTCATCGTCGTCCCTAAAA |
| Gbrga55 | AGTGAAGCCAGTGTCTATCTCG | TGCCCAGTCAACTCGGTAT |
| Gbrga70 | AACGACCCTCCTTAGCCA | GGGGAACGGGAGTTTCAA |

附表2 SRAP引物序列

Table 2 sequences of SRAP primers

| 正向引物（F）（ 5’-3’ ） | 反向引物（R）（ 5’-3’ ） |
| --- | --- |
| me1:TGAGTCCAAACCGGATA | em1:GACTGCGTACGAATTAAT |
| me2:TGAGTCCAAACCGGAGC | em2:GACTGCGTACGAATTTGC |
| me3:TGAGTCCAAACCGGAAT | em3:GACTGCGTACGAATTGAC |
| me4:TGAGTCCAAACCGGACC | em4:GACTGCGTACGAATTTGA |
| me5:TGAGTCCAAACCGGAAG | em5:GACTGCGTACGAATTAAC |
| me6:TGAGTCCAAACCGGTAA | em6:GACTGCGTACGAATTGCA |
| me7:TGAGTCCAAACCGGTCC | em7:GACTGCGTACGAATTCAA |
| me8:TGAGTCCAAACCGGTGC | em8:GACTGCGTACGAATTCTG |
| me9:TGAGTCCAAACCGGTCA | em9:GACTGCGTACGAATTCGA |
| me10:TGAGTCCAAACCGGGAC | em10:GACTGCGTACGAATTCAG |
| me11:TGAGTCCAAACCGGGTA | em11:GACTGCGTACGAATTCCA |
| me12:TGAGTCCAAACCGGGGT | em12:GACTGCGTACGAATTGTC |
| me13:TGAGTCCAAACCGGCAG | em13:GACTGCGTACGAATTGGT |
| me14:TGAGTCCAAACCGGCTA | em14:GACTGCGTACGAATTCAG |
| em15:GACTGCGTACGAATTCTG |  |
| em16:GACTGCGTACGAATTCGG |  |
| em17:GACTGCGTACGAATTCCA |  |

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

附表3 SSR引物序列

Table 3 Sequences of SSR primers

| 引物名称 | 正向引物（F）（ 5’-3' ） | 反向引物（R）（ 5’-3' ） |
| --- | --- | --- |
| BNL1151 | AAAGTAGCAGCGGTTCCAAA | GAGCCGCTTCTGTAGCTTCA |
| BNL1414 | AAAAACCCCTTTCCATCCAT | GGGTGTCCTTCCCAAAAATT |
| BNL1681 | GTGTGTGGGTGTGCATGTTT | TGGGGAGACTTTATCACGCT |
| BNL1721 | TGTCGGAATCTTAAGACCGG | GCGCAGATCCTCTTACCAAA |
| BNL2440 | TGTTAAGCATACATTAGTTTCACTCG | CCGGCACCACAAAAGTAAAT |
| BNL2632 | CGTGTCTCCAGACCAACAAA | GGGAGTTGAAGCCGACATAA |
| BNL2895 | CGATTTTACTGCTTCAGACTTG | TACCATCTCACGGATCCACA |
| BNL3255 | GACAGTCAAACAGAACAGATATGC | TTACACGACTTGTTCCCACG |
| BNL3279 | CATGTCCAATGGATGTGTCA | GGGCCACTTAAAGGCATTCT |
| BNL3383 | GTGTTGTCATCGGCACTGAC | TGCAATGGTTCAGTGGTGAT |
| BNL3411 | TTTTACACTCTCTCTCCTGTCTCC | GTTTCCATTTGCGATGAGCT |
| BNL3431 | TCAACCAAGCAACCAATTCA | ATGTATAGAGATAGATTGAAAAGGGG |
| BNL3452 | TGTAACTGAGCAGCCGTACG | GCCAAAGCAGAGTGAGATCC |
| BNL3556 | CCTTTCATGACCCTGCAAAT | AGATGGGGAATGGATCTGTG |
| BNL3558 | AAGCAAATCATGATGAACATACG | TGCGAAGAGTAGCTCTGCTG |
| BNL4094 | ATGCTGCGGAGTCGATATCT | AAATTGATTTCATGCCGGAG |
| CIR069 | GTCACTGCTATACACTTTCC | TATTGGGCTTTGATTTG |
| JESPR114 | GATTTAAGGTCTTTGATCCG | CAAGGGTTAGTAGGTGTGTATAC |
| JESPR305 | CGATCCATCAAAGGCGAC | CCGCCTCAGCACCATTTAC |
| NAU462 | CGATTTCCATTCCACACCTC | GCATTGCAATCGAAACACAT |

*新疆农业大学博士学位论文*

附表4 抗病影响因子引物序列

Table 4 sequences of resistant factor primers

| 引物名称 | 正向引物（F）（ 5’-3' ） | 反向引物（R）（3’-5' ） |
| --- | --- | --- |
| VM1 | 5`-TTGATGGCGACGAAACGG-3` | 3`-CGTTATGGGCACCACTTCG-5` |
| VM3 | 5`-AACATAAGGGTGAGAAGC-3` | 3`-ATAGGGACAACCAACATA-5` |
| VM4 | 5`-AGCAATGGCGGCAACAAC-3` | 3`-CTCCTACACTCGCTCCTACG-5` |
| VM5 | 5`- GAAACATAAGGGTGAGAAG-3` | 3`-CAACGACAATCCGCCAGA-5` |
| VM6 | 5`- TCAACCAATGGAAGCACCTC-3` | 3`-TCAAACGCCGCCTCTAAG-5` |
| VM7 | 5`- TGCCTTTCAAATGGGTCT-3` | 3`-CCGATAATGCGAATAATGTG-5` |
| VM8 | 5`- CTCTTGTGCGACGGCTAT-3` | 3`-CCTCCTCCCTGACATTATG-5` |
| VM9 | 5`-ATAGTGGAGGAGAAACCG-3` | 3`-CCCAACACTTCACTGTCG-5` |
| VM10 | 5`-AACAAAGACAAGGCAACC-3` | 3`-TTCACAACACGGTTCACG-5` |
| VM11 | 5`-AGACGATTTCTGCGGAGTG-3` | 3`-GGTTCGTTTCCAATGATGCCAG-5` |
| VM12 | 5`-ACCTCCAGTGACCATAAT-3` | 3`-CCTAAACAACACCCTAAA-5` |
| VM13 | 5`-GTTTGAACTCCGTGGTCT-3` | 3`-CTCCTGGGTCGTTGCTAA-5` |
| VM14 | 5`-TCCTCGGTCGTCCGTTAT-3` | 3`-CTCTACCGTCTCCACCTC-5` |
| VM15 | 5`-GGGATGCCACCCTTGATG-3` | 3`-CACCGACCACCAGTAAAG-5` |
| VM16 | 5`-GTCTTCGTTCCTGCTTTC-3` | 3`-CTTCGGCTATGGTTGTCG-5` |
| VM17 | 5`-TCGGTATGAAGAAGAGGC-3` | 3`-CTGGTAGTGCGTTTCATC-5` |
| VM18 | 5`-TATGAGAATGAGGTGGGT-3` | 3`-GGTGGTCAGTAGGTATCT-5` |
| VM19 | 5`-TCCTCCGCAACAGCATCT-3` | 3`-CTTCTTCCTGTTACGACCGA-5` |
| VM20 | 5`-GGTGACAGTGACGCAGTT-3` | 3`-GGAGGTAAGGGTTATTGT-5` |
| VM21 | 5`-GCAAGCATGTCGCATTAG-3` | 3`-ATCGCCCTCTTTCTACTA-5` |
| VM22 | 5`-CAATCCCACGGCTTTAGG-3` | 3`-GATTTGACGGCTTTCGGG-5` |
| VM23 | 5`-CGGACATACCCTGAAACT-3` | 3`-GGCATCAACCCTAAACAA-5` |
| VM24 | 5`-AATCCCATCATCTTTCGG-3` | 3`-CTCGTTTCGTCTCGGTTT-5` |
| VM25 | 5`-CCACTGATAAATGGGTTGA-3` | 3`-CAGGGCTAAGAAAGGCTT-5` |
| VM31 | 5`-GCAGGCTATTCCCTTCTT-3` | 3`-TATTTCGGTGTTATCGGC-5` |
| VM32 | 5`-CTGCTGCTGTTACTATTGG-3` | 3`-CTTGGGTGGCGTTGTTCG-5` |
| VM33 | 5`-TTGGAGCGTTTGTCTGTC-3` | 3`-AGGGATGGGTTCTTAGGT-5` |

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

谢辞

本论文是在恩师麻浩教授和曲延英教授的悉心指导下完成的，在此谨向尊敬的恩师致以衷心的感谢！从论文的选题、试验的设计、试剂的订购、数据的分析到论文的撰写，无不凝聚着他们的心血和智慧！感谢他们所给予的精心教导和帮助。麻老师和曲老师渊博的知识、乐观开朗的和平易近人的性格也无形中减轻了我的压力，并且将使我受益终生。

特别感谢罗明、周刚、郭庆元、陈全家、高文伟等各位老师的教导和帮助。

感谢美国Dr. Magill, Dr. Jinggao Liu, Dr. Stipanovic, Dr. Bell无偿提供的试验场地、仪器、试剂和试验指导，他们严谨的教学态度，正直的人品和平易近人的生活态度也使我受益匪浅。

感谢我的研究生张翠芳、麦吾兰江・麦麦提、李丹，感谢师妹刘艳；感谢实习生米热古力、吐尼沙古里、刘大陆、马冰，是你们构成了农学院亮丽的风景线。

最后，感谢我的父母、婆婆和丈夫给予的支持和鼓励，是你们辛勤的劳动为我开辟了一片蓝天。

*新疆农业大学博士学位论文*

# 作者简历

**顾爱星**，女，江苏人，硕士，副教授，硕士生导师。

**1）大学开始受教育经历**

1991年-1995年，新疆农业大学农学院，农学专业本科毕业，获学士学位；

1996年-1999年，新疆农业大学农学院，作物遗传育种专业研究生毕业，获农学硕士学位，导师。

姚源松

**2）研究工作经历**

1999.7～2002.3年，新疆农业科学院核技术生物技术研究所工作。

2002.4至今，新疆农业大学农学院植物病理系微生物教研室工作，曾获国家级民族团结进步奖1次，校级先进个人4次。2008年到美国德州A＆M U做访问学者1年。一直从事“微生物学”、“农业微生物学”教学，及作物转基因、抗病虫性分子克隆和微生物资源方面的研究工作。在转基因小麦的分子检测，转基因Bt药效、土壤残留、安全性评价，抗虫微生物分子克隆，微生物生态，棉花新材料创制、抗病基因遗传研究等方面取得显著进展。先后主持或参与承担国家自然科学基金、农业部项目、省级重点实验室项目、校级科研项目等科研项目10项；校级教研项目2项；在国内外期刊上发表科研论文10余篇；参与育成品系1个；克隆Bt基因1个（已在

NCBI中登录）；获省级科研奖励2项，省级教研奖励1项。

**3）科研成果**

**近期主持课题：**

[1] 新疆农业大学校前期课题“B（t

苏云金芽孢杆菌）的筛选和鉴定“，2006-2008年，

经费2万元，已结题。负责苏云金芽孢杆菌的鉴定。

[2] 国家自然科学基金“鹰嘴豆α-淀粉酶抑制剂酶学特性及合成的分子调控机制”，

（项目编号：30960206），2010-2012 年，经费27 万元，已结题。负责整个项目组织和实施，承担基因克隆、分子调控研究工作。

[3]新疆维吾尔自治区科学技术厅高技术项目“棉花对黄萎病抗性常规及分子标记技术评价体系研究”，（项目编号：201111117），2011-2014年，经费40万元，在研。负责整个项目组织和实施，承担优化分子标记技术、棉花杂交及后代种植工作。

*棉花黄萎病抗病性分析和分子标记筛选*

**参加课题：**

[1] 新疆维吾尔自治区科技厅高新技术“棉花枯、黄萎病抗病分子品种（系）创制”

（项目编号：200810101），2008年-2011年，在研。负责与抗病性相关分子标记的筛选。

[2] 新疆维吾尔自治区教育厅“棉花抗黄萎病育种方法的研究”（项目编号：

XJEDU2007I15），2009年-2010年，已结题。负责抗病性评价和分子标记的筛选。

[3]新疆维吾尔自治区科技厅重大专项“高产优质抗逆类型棉花新品种选育”（项目编号：2007331-4）。2007年-2009年，已结题。负责抗病性鉴定和分子标记的筛选。

[4]国家转基因重大专项“转基因长绒棉新品种培育”（项目编号: 2008ZX08005-005-4），2008年-2011年，在研。负责抗病性鉴定和分子标记的筛选。**获得的奖励**：

2011年5月论文“天ft北坡退化草地土壤环境与微生物数量的关系”获得新疆维吾尔自治区科技厅第十一届自然科学论文三等奖，作者：**顾爱星**，范燕敏，武红旗，朱 进忠，靳瑰丽，热孜万古丽.

**攻读博士期间发表的论文：**

[1]**顾爱星**, 曲延英, 鲁狄君, 麦吾兰江·麦麦提, 李丹.不同品种（系）棉花的黄萎病抗性及其与产量性状的关系[J].新疆农业大学学报, 2013, 36（1）: 56-60.

[2]麦吾兰江·麦麦提, **顾爱星（*通讯作者*）**, 曲延英, 孜拉吉古丽, 李丹.不同棉花品种黄萎病抗性与其组织结构的关系[J].新疆农业科学, 2013, 50（12）[已录用]

[3]陈磊, 李吉琴, 刘艳, 陈全家, **顾爱星**, 马顺尧, 柴颜军, 郑炜佳, 曲延英, 等. 枯萎病对海岛棉产量因素及相关指标的遗传分析[J].新疆农业大学学报, 2012, 35

（3）：184-188.

[4]**顾爱星**，张翠芳，曲延英，郭庆元.棉花组织结构与黄萎病抗性的关系[J].植物病理学报，2011，41（5）：502-508.

[5]**顾爱星**，张桦，张翠芳，张璐，高微，颜君，艾ft江∙艾则孜.苏云金芽孢杆菌cry 3

基因的克隆和筛选[J].新疆农业大学学报，2011，34（2）：156-160.

[6]**顾爱星**，张翠芳，曲延英.不同棉花品种（系）的黄萎病抗性及其与经济性状的相关

*新疆农业大学博士学位论文*

性[J].西北农业学报，2010，19(11)：58-63.

[7]张翠芳，**顾爱星（*通讯作者*）**，曲延英，张华，张飞，宋鹏阳，王都飞.温室检测棉花黄萎病抗性的4种接种方法比较[J].新疆农业大学学报，2010，33（3）：197-201.

[8]**顾爱星**，范燕敏，武红旗，朱进忠，靳瑰丽，热孜万古丽.天ft北坡退化草地土壤环境与微生物数量的关系[J].草业学报，2010，19（2）：116-123.

[9]张新玲，王哲，石书兵，王芳，**顾爱星**.甘草栽培种乌拉尔红皮的核型分析[J].新疆农业大学学报，2008，31（2）：39-42.

[10] Guangjun Wang, Jie Zhang, Fuping Song, ***Aixing Gu***, Ahtam Uwais, Dafang Huang. Recombinant Bacillus thuringiensis strain shows high insecticidal activity against Plutella xylostella and Leptinotarsa decemlineata without affecting non-target species in

The field [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105: 1536-1543.

[11]**顾爱星**，李贤超，王登元，白龙英，田明昭.转基因苏云金杆菌在环境中的残留和扩散测定[J].新疆农业大学学报，2008，30（2）：60-63.

[12]**顾爱星**，潘映红，王子霞，杨克锐，海热古力.冬性面包小麦品系88-137种子蛋白抗虫性的研究[J].新疆农业科学，2006，43（5）：410-412.

[13] ***Aixing Gu***, Yanying Qu, Yanrong Sang, Quanjia Chen, Lili Wang, Jinggao Liu. Relationships of Agronomic Traits in different growth Periods and Cotton Resistance to *Verticillium wilt*[J]. Plant Disease. [已投稿]