

甘蔗优良品种材料抗高粱花叶病毒鉴定与评价

李文凤, 王晓燕, 黄应昆, 单红丽, 张荣跃, 罗志明, 尹炯, 申科

(云南省农业科学院甘蔗研究所/云南省甘蔗遗传改良重点实验室, 开远 661699)

摘要: 采用生长期人工切茎接种和 RT-PCR 检测相结合方法, 于 2011—2012 年 2 次对国家甘蔗体系近年选育的 49 份优良新品种(系)和 19 份云蔗系列优良中间材料进行由高粱花叶病毒(SrMV-HH, GenBank 登录号 DQ530434)引起的甘蔗花叶病的抗性鉴定与评价。结果表明, 49 份优良新品种(系)中, 1 级高抗到 3 级中抗的有 29 份, 占 59.18%。其中粤甘 40 号、粤甘 42 号、粤糖 55 号、云蔗 03-194、云蔗 99-596、云瑞 06-189、桂糖 30 号、德蔗 03-83、闽糖 01-77 等 9 份材料表现 1 级高抗, 占 18.37%; 福农 0335、柳城 05-129、粤糖 96-86、云蔗 01-1413、云蔗 03-258、云蔗 06-80、桂糖 02-351 等 7 份材料表现 2 级抗病, 占 14.29%。19 份云蔗系列优良中间材料中, 1 级高抗到 3 级中抗的有 13 份, 占 68.42%。其中云蔗 04-622、云蔗 05-197、云蔗 06-267、云蔗 05-194、云蔗 06-160、云蔗 07-2384、云瑞 05-704 等 7 份材料表现 1 级高抗, 占 36.84%; 云蔗 06-362 表现 2 级抗病, 占 5.26%。研究结果为深入开展甘蔗抗花叶病毒育种, 选育和推广优良抗病品种, 有效防控甘蔗花叶病提供了科学依据和优良抗源材料。

关键词: 甘蔗; 优良品种材料; 高粱花叶病毒; 抗病性鉴定

Identification and Evaluation of Elite Sugarcane Varieties/Materials Resistant to *Sorghum mosaic virus*

LI Wen-feng, WANG Xiao-yan, HUANG Ying-kun, SHAN Hong-li,
ZHANG Rong-yue, LUO Zhi-ming, YIN Jiong, SHEN Ke

(Sugarcane Research Institute, Yunnan Province Academy of Agricultural Science/
Yunnan Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Kaiyuan 661699)

Abstract: In 2011 and 2012, the resistance to sugarcane mosaic disease caused by *Sorghum mosaic virus* (SrMV-HH, GenBank accession number DQ530434) was identified and evaluated in 49 new improved varieties and 19 elite intermediate materials of Yunzhe series by dropping inoculation on stem-section and SrMV RT-PCR detection. The results showed that of the 49 new improved varieties, 29 (59.18%) were highly (Grade 1) to moderately resistant (Grade 3) to SrMV. Nine varieties were highly resistant (Grade 1) to SrMV, which included Yuegan 40, Yuegan 42, Yuetang 55, Yunzhe 03-194, Yunzhe 99-596, Yunrui 06-189, Guitang 30, Dezhe 03-83, and Mintang 01-77 and presented 18.37% of the 49 new improved varieties. Resistance (Grade 2) was found in 14.29% (7 out of 49) of the 49 new improved varieties, which included Funong 0335, Liucheng 05-129, Yuetang 96-86, Yunzhe 01-1413, Yunzhe 03-258, Yunzhe 06-80, and Guitang 02-351. Of the 19 fine intermediate materials of Yunzhe series, 13 (68.42%) were highly (Grade 1) to moderately resistant (Grade 3) to SrMV. In 19 elite intermediate materials of Yunzhe series, seven materials including Yunzhe 04-622, Yunzhe 05-197, Yunzhe 06-267, Yunzhe 05-194, Yunzhe 06-160, Yunzhe 07-2384, and Yunrui 05-704 were scored as highly resistant (Grade 1), counting for 36.84% (7 out of 19). One material (5.26%), Yunzhe 06-362 were resistant (Grade 2) to SrMV. The results in the present study could

收稿日期: 2013-10-08 修回日期: 2013-12-20 网络出版日期: 2014-06-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140609.1430.026.html>

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-20-2-2); 云南省现代农业产业技术体系建设专项资金资助

第一作者主要从事甘蔗病害研究。E-mail: ynlwf@163.com

通信作者: 黄应昆, 从事甘蔗病害防控研究。E-mail: huangyk64@163.com

provide scientific basis and valuable resistance resource for the further breeding of sugarcane cultivars against mosaic disease, and effective control of sugarcane mosaic disease by selecting and extending elite resistant cultivars.

Key words: sugarcane; elite varieties/materials; *Sorghum mosaic virus*; resistance identification

甘蔗花叶病是一种重要的世界性甘蔗病毒病害,也是我国蔗区发生最普遍、为害最严重的病害之一。据调查,华南各地尤其是云南、广西甘蔗花叶病的发病株率达 30% 以上;感病品种、严重田块发病株率高达 100%,产量损失 3%~50%,每年造成数以亿计的经济损失^[1-2]。自然条件下,甘蔗花叶病可由马铃薯 Y 病毒科(Potviridae)的甘蔗花叶病毒(SCMV, *Sugarcane mosaic virus*)、高粱花叶病毒(SrMV, *Sorghum mosaic virus*)、甘蔗条纹花叶病毒(SCSMV, *Sugarcane streak mosaic virus*)等病毒引起^[3-5]。目前,我国蔗区已确定的甘蔗花叶病病原主要有 SCMV、SrMV 和 SCSMV 3 种,其中 SrMV 是所有主产蔗区的主要病毒病原^[6-11]。

甘蔗花叶病的发生流行与品种抗病性密切相关,大面积种植感病品种是病害流行的重要原因,选育和种植抗病品种是防治该病最经济有效的措施^[12-13]。关于甘蔗品种材料抗花叶病的鉴定与评价方面, M. P. Grisham 等^[14]采用磨擦接种法对甘蔗近缘植物无性系的抗性进行鉴定;周仲驹等^[12]采用磨擦接种法对部分生产品种的抗性进行评价;李文凤等^[15]用切茎接种法对部分优良种质进行抗性鉴定;W. F. Li 等^[16]用切茎接种法对部分野生核心种质资源进行抗性评价。目前,我国非常重视甘蔗抗病育种,制定并开始实施系统的抗病育种计划。近年来,在国家甘蔗体系支持下,通过全国联合攻关,培育出一批甘蔗优良品种和中间材料,但迄今还未进行过抗花叶病鉴定,适时对其进行抗病性评价,有助于筛选优良抗源材料和抗病品种,可以针对性地选育和利用抗病品种,在甘蔗生产上进行品种合理布局,这对有效防控甘蔗花叶病具有重要意义。

本研究以我国蔗区甘蔗花叶病的主要病原高粱花叶病毒为接种毒源,于 2011-2012 年 2 次对国家甘蔗体系近年选育的 49 份优良新品种(系)和 19 份云蔗系列优良中间材料,采用生长期人工切茎接种和 RT-PCR 检测相结合方法进行抗高粱花叶病毒鉴定与评价,以期选育和利用抗病品种有效防控甘蔗花叶病提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为国家甘蔗体系近年选育的 49 份优

良新品种(系)和 19 份云蔗系列优良中间材料(表 1),感病对照云蔗 89-151,抗病对照闽糖 70-611。

1.2 人工接种鉴定

各材料分别于 2011 年、2012 年 3 月选择经 RT-PCR 检测不带 SCMV、SrMV、SCSMV 3 种病毒的健壮蔗株,分别切成双芽段,在流动冷水中浸泡 48 h 后,用(50±0.5)℃热水处理 2 h,然后分别种植在(直径 35 cm×高 30 cm)塑料桶内,桶内装入 2/3 的消毒土壤和有机质(3:1),每份材料种植 4 桶,4 次重复,每桶 5 株,共 20 株,置于 20~30℃防虫温室中培养。

接种病毒源为高粱花叶病毒分离物(SrMV-HH, GenBank 登录号 DQ530434)^[8],接种于感病甘蔗品种云蔗 89-151 上繁育保存。接种前取毒源植株幼嫩病叶组织,用 3 倍量(V/W)浓度为 0.1 mol/L、pH 7.2 的磷酸缓冲液(含 0.2% Na₂SO₄),研磨成匀浆,滤液即为病毒接种液,4℃冰箱保存备用。

供试材料于 7 月生长期采用切茎接种法进行鉴定^[17]。用锋利切刀或枝剪把供试材料植株地上部分沿土表快速切去,将 50 μL 病毒接种液滴入留下的蔗株切口上,每份材料接种 20 株,之后用纸盖住遮光 24 h 后揭开。

接种 20 d 开始调查发病率,以后每隔 15 d 调查 1 次,直至发病率稳定为止。参照文献[18]的标准按 1~5 级分级进行抗性水平分类,等级 1~5 分别表示对高粱花叶病毒高抗、抗病、中抗、感病和高感,其发病率范围相应为 0、0.01%~10.00%、10.01%~33.00%、33.01%~66.00%和 66.01%~100%。最后 1 次调查采集蔗株叶片,用 RT-PCR 法对接种病毒源高粱花叶病毒进行检测。

1.3 RT-PCR 检测

根据 GenBank 中报道的 SrMV CP 基因序列设计 1 对检测 SrMV-HH 的特异性引物(上游引物 SrMV-F: CATCARGCAGGRGGCGGYAC;下游引物 SrMV-R: TTTCA TCTGCATGTG-GGCCTC),预期扩增片段大小为 828 bp,引物由上海生工生物技术有限公司合成。

各供试材料称取叶片 0.2 g,用 TRIZOL 法提取总 RNA;以提取的叶片总 RNA 为模板,Oligod(T)为反转录起始引物,采用 M-MLV Reverse Transcriptase (Promega)合成 cDNA 的第 1 链,再以 cDNA 第 1 链

为模板, SrMV-F/SrMV-R 为引物进行 PCR 扩增, 并用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 优良新品种(系)对高粱花叶病毒的抗性反应

结果表明, 49 份国家甘蔗体系供试材料中, 1 级高抗到 3 级中抗的有 29 份, 占 59.18%。其中粤甘 40 号、粤甘 42 号、粤糖 55 号、云蔗 03-194、云蔗 99-596、云瑞 06-189、桂糖 30 号、德蔗 03-83、闽糖 01-

77 等 9 份材料表现 1 级高抗, 占 18.37%; 福农 0335、柳城 05-129、粤糖 96-86、云蔗 01-1413、云蔗 03-258、云蔗 06-80、桂糖 02-351 等 7 份材料表现 2 级抗病, 占 14.29%; 13 份材料表现 3 级中抗, 占 26.53% (表 1)。RT-PCR 法对接种材料病毒检测结果与人工接种鉴定结果吻合, 对 SrMV-HH 表现 1 级高抗的 9 份供试材料均未扩增出预期目的片段, 而其余表现 2~5 级抗病至高感的 40 份材料均扩增出预期目的片段 (图 1)。

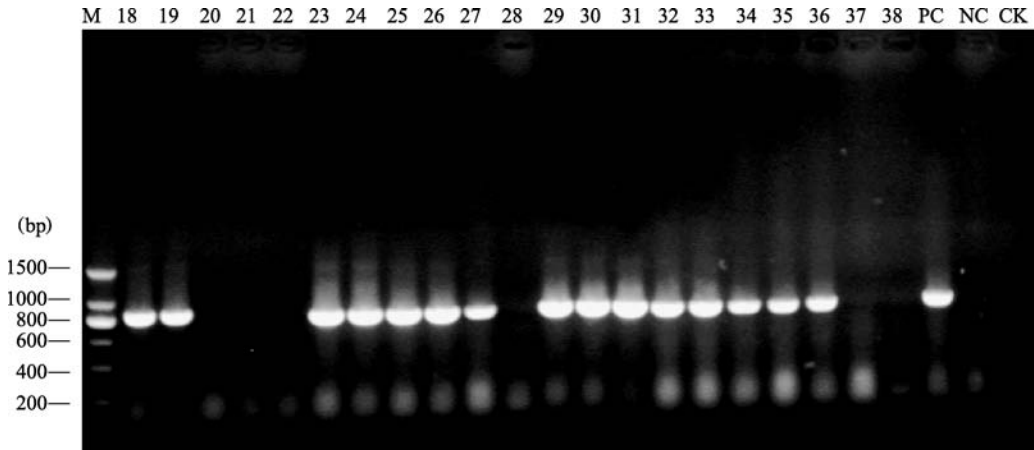
表 1 甘蔗优良品种材料对高粱花叶病毒的抗性反应

Table 1 Resistance response of fine sugarcane varieties and materials to SrMV

类型 Type	编号 No.	名称 Name	发病率 (%) Incidence	等级 Grade	RT-PCR		类型 Type	编号 No.	名称 Name	发病率 (%) Incidence	等级 Grade	RT-PCR		
					检测 Detection by RT-PCR	抗性反应 Resistance response						检测 Detection by RT-PCR	抗性反应 Resistance response	
国家体系 优良品种 (系)	1	福农 15 号	100.00	5	+	高感(HS)		35	云蔗 06-80	5.88	2	+	抗病(R)	
	2	福农 28 号	57.14	4	+	感病(S)		36	云蔗 99-91	25.00	3	+	中抗(MR)	
	3	福农 30 号	23.10	3	+	中抗(MR)		37	云蔗 99-596	0	1	-	高抗(HR)	
	4	福农 36 号	25.00	3	+	中抗(MR)		38	云瑞 06-189	0	1	-	高抗(HR)	
	5	福农 38 号	28.60	3	+	中抗(MR)		39	桂糖 29 号	43.10	4	+	感病(S)	
	6	福农 39 号	27.30	3	+	中抗(MR)		40	桂糖 30 号	0	1	-	高抗(HR)	
	7	福农 40 号	60.00	4	+	感病(S)		41	桂糖 31 号	83.33	5	+	高感(HS)	
	8	福农 1110	91.67	5	+	高感(HS)		42	桂糖 32 号	21.43	3	+	中抗(MR)	
	9	福农 02-5707	20.00	3	+	中抗(MR)		43	桂糖 97-69	33.33	4	+	感病(S)	
	10	福农 0335	5.88	2	+	抗病(R)		44	桂糖 02-351	2.00	2	+	抗病(R)	
	11	柳城 03-1137	57.14	4	+	感病(S)		45	桂糖 02-467	69.20	5	+	高感(HS)	
	12	柳城 03-182	100.00	5	+	高感(HS)		46	桂糖 02-901	50.00	4	+	感病(S)	
	13	柳城 05-129	4.00	2	+	抗病(R)		47	赣蔗 02-70	43.75	4	+	感病(S)	
	14	柳城 05-136	20.00	3	+	中抗(MR)		48	德蔗 03-83	0	1	-	高抗(HR)	
	15	粤甘 24 号	45.60	4	+	感病(S)		49	闽糖 01-77	0	1	-	高抗(HR)	
	16	粤甘 26 号	20.00	3	+	中抗(MR)		云蔗系列	50	云蔗 04-621	73.33	5	+	高感(HS)
	17	粤甘 34 号	11.76	3	+	中抗(MR)		优良中间	51	云蔗 04-724	100.00	5	+	高感(HS)
	18	粤甘 35 号	70.00	5	+	高感(HS)		材料	52	云蔗 04-622	0	1	-	高抗(HR)
	19	粤甘 39 号	15.38	3	+	中抗(MR)		53	云蔗 04-6	15.38	3	+	中抗(MR)	
	20	粤甘 40 号	0	1	-	高抗(HR)		54	云蔗 05-197	0	1	-	高抗(HR)	
	21	粤甘 42 号	0	1	-	高抗(HR)		55	云蔗 05-39	100.00	5	+	高感(HS)	
	22	粤糖 55 号	0	1	-	高抗(HR)		56	云蔗 05-66	14.29	3	+	中抗(MR)	
	23	粤糖 96-86	9.10	2	+	抗病(R)		57	云蔗 06-267	0	1	-	高抗(HR)	
	24	粤糖 00-318	54.50	4	+	感病(S)		58	云蔗 06-102	22.22	3	+	中抗(MR)	
	25	粤糖 00-236	20.00	3	+	中抗(MR)		59	云蔗 05-194	0	1	-	高抗(HR)	
	26	云蔗 01-1413	9.10	2	+	抗病(R)		60	云蔗 05-181	15.40	3	+	中抗(MR)	
	27	云蔗 03-103	76.90	5	+	高感(HS)		61	云蔗 05-211	57.10	4	+	感病(S)	
	28	云蔗 03-194	0	1	-	高抗(HR)		62	云蔗 05-226	14.30	3	+	中抗(MR)	
	29	云蔗 03-258	8.33	2	+	抗病(R)		63	云蔗 06-160	0	1	-	高抗(HR)	
	30	云蔗 03-422	23.08	3	+	中抗(MR)		64	云蔗 06-362	8.30	2	+	抗病(R)	
	31	云蔗 04-241	66.67	5	+	高感(HS)		65	云蔗 07-2384	0	1	-	高抗(HR)	
	32	云蔗 05-49	66.67	5	+	高感(HS)		66	云瑞 05-596	53.33	4	+	感病(S)	
	33	云蔗 05-51	33.33	4	+	感病(S)		67	云瑞 05-704	0	1	-	高抗(HR)	
	34	云蔗 06-407	60.00	4	+	感病(S)		68	云农 01-104	100.00	5	+	高感(HS)	
							感病对照	PC	云蔗 89-151	100.00	5	+	高感(HS)	
							抗病对照	NC	闽糖 70-611	0	1	-	高抗(HR)	

+ :SrMV 检测结果阳性; - :SrMV 检测结果阴性

+ :Positive reaction to SrMV, - :Negative reaction to SrMV



M: Marker;泳道 18-38:接种材料;PC:阳性对照;NC:阴性对照;CK:空白对照

M: Marker, Lane 18-38: Inoculated materials, PC: Positive control, NC: Negative control, CK: Blank control

图1 RT-PCR 对接种材料(部分国家体系优良品种)高粱花叶病毒的扩增结果

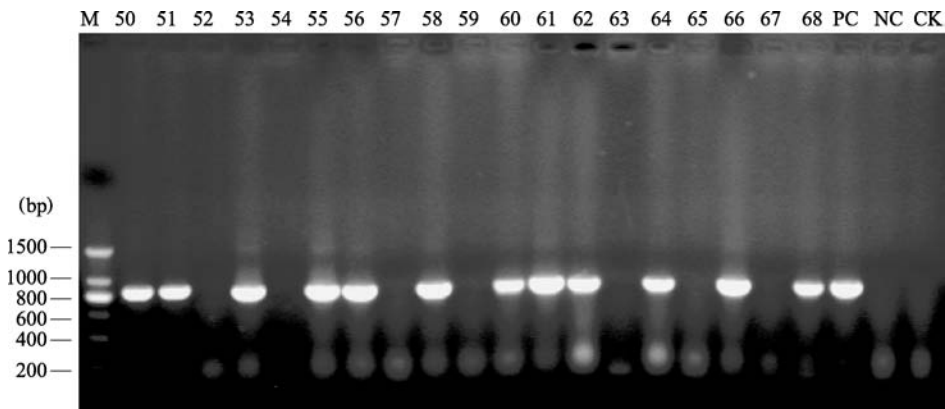
Fig. 1 RT-PCR results of some materials (elite varieties in the State System) inoculated with SrMV

2.2 优良中间材料对高粱花叶病毒的抗性反应

从表1可见,19份云蔗体系供试材料中,1级高抗到3级中抗的有13份,占68.42%。其中云蔗04-622、云蔗05-197、云蔗06-267、云蔗05-194、云蔗06-160、云蔗07-2384、云瑞05-704等7份材料表现1级高抗,占36.84%;云蔗06-362表现2级抗病,占5.26%;云蔗04-6、云蔗05-66、云蔗06-102、云蔗05-181、云蔗05-226等5份材料表现3级中抗,占26.32%(表1)。用RT-PCR法对接种材料病毒检测结果与人工接种鉴定结果吻合,对SrMV-HH表现1级高抗的7份供试材料均未扩增出预期目的片段,而其余表现2~5级抗病至高感的12份材料均扩增出预期目的片段(图2)。

3 结论与讨论

甘蔗花叶病是一种系统性种传病害,不同的甘蔗品种对甘蔗花叶病的抗性不一。及时了解和掌握新育成的优良品种(系)和中间材料的抗病性,对于合理布局抗病品种,有效利用抗病基因科学防控甘蔗花叶病具有重要意义。本研究以引起中国蔗区甘蔗花叶病的主要病毒SrMV为接种毒源,采用生长期人工切茎接种和RT-PCR检测相结合方法,于2011-2012年2次对国家甘蔗体系近年选育的49份优良新品种(系)和19份云蔗系列优良中间材料进行抗SrMV鉴定与评价。根据各供试材料抗性反应和RT-PCR检测结果定性分析,明确了各新品种



M: Marker;泳道 50-68:接种材料;PC:阳性对照;NC:阴性对照;CK:空白对照

M: Marker, Lane 50-68: Inoculated materials, PC: Positive control, NC: Negative control, CK: Blank control

图2 RT-PCR 对接种材料(云蔗系列优良中间材料)高粱花叶病毒的扩增结果

Fig. 2 RT-PCR results of materials (elite intermediate materials of Yunzhe series) inoculated with SrMV

(系)和中间材料对 SrMV 的抗性特点,评价筛选出 1 级高抗优良新品种(系)9 份,2 级抗病优良新品种(系)7 份;1 级高抗到 2 级抗病中间材料 8 份,为选育和利用抗病品种有效防控甘蔗花叶病提供了科学依据和优良抗源材料。

甘蔗野生资源是现代甘蔗育种中抗病基因的重要来源,黄忠兴等^[19]对国内外割手密资源农艺性状表型遗传多样性分析表明割手密对花叶病高抗,割手密中蕴藏着优良的抗花叶病毒基因,是选育抗花叶病甘蔗品种很有利用前景的抗源种质。本研究结果显示粤甘 40 号、粤甘 42 号、粤糖 55 号、云蔗 03-194、云蔗 99-596、云瑞 06-189、桂糖 30 号、德蔗 03-83、闽糖 01-77 等 9 份优良新品种(系)和云蔗 04-622、云蔗 05-197、云蔗 06-267、云蔗 05-194、云蔗 06-160、云蔗 07-2384、云瑞 05-704 等 7 份优良中间材料表现 1 级高抗,是选育抗花叶病甘蔗品种很有利用潜力的育种材料,在大力推广应用的同时,可作为抗病亲本与野生资源割手密杂交,分析评价其抗病遗传力,并建立抗病种质基因库,进一步选育抗花叶病甘蔗新品种,供生产上推广应用。

参考文献

- [1] 黄应昆,李文凤,卢文洁,等. 云南蔗区甘蔗花叶病流行原因及控制对策[J]. 云南农业大学学报,2007,22(6):935-938
- [2] 黄应昆,李文凤. 现代甘蔗病虫草害原色图谱[M]. 北京:中国农业出版社,2011:110-115
- [3] Shukla D D, Frenkel M J, McKern N M, et al. Present status of the sugarcane mosaic subgroup of potyviruses[J]. Arch Virol, 1992,15:363-373
- [4] Seifers D L, Salomon R, Marie-Jeanne V, et al. Characterization

- of a novel potyvirus isolated from maize in Israel[J]. Phytopathology, 2000, 90:505-513
- [5] Chatenet M, Mazarin C, Girard J C, et al. Detection of *Sugarcane streak mosaic virus* in sugarcane from several Asian countries[J]. Sugar Cane Internet, 2005, 23(4):12-15
- [6] 周国辉,许东林. 甘蔗病毒病及其防治研究进展[J]. 植物保护学报, 2005, 32(3):324-327
- [7] 李文凤,丁铭,方琦,等. 云南甘蔗花叶病病原的初步鉴定[J]. 中国糖料, 2006(2):4-7
- [8] 李文凤,董家红,丁铭,等. 云南甘蔗花叶病病原检测及一个分离物的分子鉴定[J]. 植物病理学报, 2007, 37(3):242-247
- [9] Guo Y. Molecular identification and protein gene analysis of the viruses causing sugarcane mosaic disease from four sugarcane areas in China[D]. Fujian: Fujian Agriculture and Forestry University, 2008:10-15
- [10] 熊国如,张雨良,赵婷婷,等. 海南蔗区甘蔗黄叶病与花叶病发生情况的分子鉴定[J]. 热带作物学报, 2011, 32(12):2307-2311
- [11] Li W F, He Z, Li S F, et al. Molecular characterization of a new strain of *sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV)[J]. Arch Virol, 2011, 156:2101-2104
- [12] 周仲驹,黄娟娟,林奇英. 甘蔗花叶病的发生及甘蔗品种的抗性[J]. 福建农学院学报, 1989, 18(4):520-525
- [13] Matsuoka S, Masuda Y, Arizono H. 巴西甘蔗花叶病的抗病育种程序[J]. 国外农学——甘蔗, 1991(1):6-11
- [14] Grisham M P, Burner D M, Legenade B L. Resistance to the H strain of *sugarcane mosaic virus* among wild forms of sugarcane and relative[J]. Plant Dis, 1991, 76:360-362
- [15] 李文凤,黄应昆,卢文洁,等. 甘蔗优良种质资源抗花叶病评价[J]. 云南农业大学学报, 2009, 24(3):361-363
- [16] Li W F, Wang X Y, Huang Y K, et al. Screening sugarcane germplasm resistant to *Sorghum mosaic virus*[J]. Crop Protect, 2013, 43:27-30
- [17] 李文凤,黄应昆,卢文洁,等. 甘蔗花叶病抗病性鉴定接种新技术研究[J]. 植物保护, 2008, 34(1):127-129
- [18] 李奇伟,陈子云,梁洪. 现代甘蔗改良技术[M]. 广州:华南理工大学出版社, 2000:46-47
- [19] 黄忠兴,周峰,王勤南,等. 国内外割手密资源农艺性状表型遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(5):825-829