滇蔗茅杂交 F₁ 双抗 SCSMV 和 SrMV 鉴定与评价

李文凤,单红丽,王晓燕,陆 鑫,张荣跃,仓晓燕, 尹 炯,罗志明,黄应昆

(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:以我国蔗区甘蔗花叶病的 2 种主要病原甘蔗条纹花叶病毒分离物 (SCSMV-JP1, GenBank 登录号 JF488064) 和高粱花叶病毒分离物 (SrMV-HH, GenBank 登录号 DQ530434) 为接种毒源,采用人工切茎接种和 RT-PCR 检测相结合的方法,于 2015 - 2016 年 2 次对由热带种路打士与滇蔗茅云滇 95-19 杂交获得的 41 份滇蔗茅杂交 F_1 及亲本进行了双抗 SCSMV 和 SrMV 鉴定与评价。结果表明,41 份滇蔗茅杂交 F_1 及亲本中,对 SCSMV 表现 1 级高抗到 3 级中抗的有 23 份,占 53.49%,4 级感病到 5 级高感的有 20 份,占 46.51%;对 SrMV 表现 1 级高抗到 3 级中抗的有 31 份,占 72.09%,4 级感病到 5 级高感的有 12 份,占 27.91%。综合分析结果显示,10 份滇蔗茅杂交 F_1 对 SCSMV 和 SrMV 均表现 $1\sim2$ 级抗病,占 23.26%,其中云 09-604、云 09-607、云 09-619、云 09-633、云 09-656、云滇 95-19 等 6 份滇蔗茅杂交 F_1 对 2 种病毒均表现为 1 级高抗,占 13.95%。研究结果明确了 41 份滇蔗茅杂交 F_1 及亲本对甘蔗花叶病 2 种主要致病病原的抗性,筛选出 10 份双抗 SCSMV 和 SrMV 的滇蔗茅杂交 F_1 ,为深入开展抗甘蔗花叶病育种提供了优良抗源种质和参考依据。

关键词:甘蔗;滇蔗茅杂交 F,;甘蔗条纹花叶病毒;高粱花叶病毒;抗病性鉴定

Identification and Evaluation of *Erianthus rockii* F₁ Hybrids Resistant to SCSMV and SrMV

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

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

Abstract; In 2015 and 2016, the two main pathogenic Sugarcane streak mosaic virus (SCSMV-JP1, GenBank accession number JF488064) and Sorghum mosaic virus (SrMV-HH, GenBank accession number DQ530434) were used as inoculums, and the double resistance to SCSMV and SrMV was identified and evaluated in 41 F₁ hybrids of Saccharum officinarum L. "Ludashi" × Erianthus rockii Keng "Yundian95-19" and parents by dropping inoculation on stemsection and RT-PCR detection. The results showed that among the 41 Erianthus rockii Keng F₁ hybrids and parents, 23 (53, 49%) were highly (Grade 1) to moderately resistant (Grade 3), and 20 (46, 51%) were susceptible (Grade 4) to highly susceptible (Grade 5) to SCSMV; 31 (72, 09%) were highly (Grade 1) to moderately resistant (Grade 3), and 12 (27, 91%) were susceptible (Grade 4) to highly susceptible (Grade 5) to SrMV. Ten Erianthus rockii Keng F₁ hybrids (23, 26%) were highly resistant (Grade 1) to resistant (Grade 2) to SCSMV and SrMV, that is, Yun09-603, Yun09-604, Yun09-607, Yun09-608, Yun09-619, Yun09-622, Yun09-633, Yun09-635, Yun09-656 and Yundian95-19) were highly resistant (Grade 1) to SCSMV and SrMV, accounting for 13, 95% of the total germplasm. The results in the

收稿日期:2017-01-09 修回日期:2017-02-05 网络出版日期:2017-08-14

URL; http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170814.1004.014.html

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-20-2-2);云南省现代农业产业技术体系建设专项资金(YNGZTX-4-92)

第一作者主要从事甘蔗病害研究,E-mail:ynlwf@163.com;单红丽为共同第一作者

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

present study have determined the resistance of 41 *Erianthus rockii* Keng F₁ hybrids and parents to the two main pathogens of mosaic disease, screened out 10 *Erianthus rockii* Keng F₁ hybrids resistant to SCSMV and SrMV, which provides scientific basis and valuable resistance resource for breeding of sugarcane cultivars against mosaic disease.

Key words: sugarcane; *Erianthus rockii* Keng F₁ hybrids; *Sugarcane streak mosaic virus*; *Sorghum mosaic virus*; resistance identification

甘蔗花叶病是由一类病毒侵染引起的世界性甘蔗重要病害^[1-3],目前已是我国蔗区分布最广、危害最严重的病害之一,每年造成数以亿计的经济损失,严重制约了我国蔗糖产业的持续稳定发展^[3-4]。我国蔗区已确定的甘蔗花叶病病原主要有甘蔗花叶病毒(SCMV, Sugarcane mosaic virus)、高粱花叶病毒(SCSMV, Sugarcane streak mosaic virus)3 种,其中SCSMV和SrMV是目前引起我国蔗区甘蔗花叶病的2种最主要的致病病原^[5-12]。而SCSMV自2011年在云南被首次检测报道^[10],其扩展蔓延迅速、致病性强,近年平均检出率远高于SrMV,已成为云南蔗区甘蔗花叶病主要病原^[3]。

引起甘蔗花叶病大面积流行的首要诱因是推广种植感病品种,要从根本上有效防控甘蔗花叶病最经济有效的措施是推广应用抗病品种^[13-14]。然而,目前能同时兼抗几种病毒病原的种质和品种/材料较为缺乏,发掘新抗病种质对选育抗病品种和有效防控甘蔗花叶病具有重要意义。

前期的甘蔗种质资源和品种/材料抗花叶病鉴定与评价,多数是进行单抗 SCMV 或 SrMV 鉴定评价^[13,15-18]。迄今为止,我国甘蔗种质资源和品种/材料多数也是针对 SCMV 或 SrMV 的单抗性鉴定评价^[16-18],而针对抗 SCSMV 或双抗 SCSMV 和 SrMV 的鉴定与评价尚未见相关报道。

本研究以我国蔗区甘蔗花叶病的 2 种主要病原甘蔗条纹花叶病毒分离物 (SCSMV-JP1, GenBank 登录号 JF488064) $^{[10]}$ 和高粱花叶病毒分离物 (SrMV-HH, GenBank 登录号 DQ530434) $^{[8]}$ 为接种毒源,采用人工切茎接种和 RT-PCR 检测相结合的方法,于 2015 – 2016年 2 次对由热带种路打士与滇蔗茅云滇 95-19 杂交获得的 41 份滇蔗茅杂交 F_1 及亲本进行双抗 SCSMV和 SrMV 鉴定与评价,以期发掘多抗新种质,为育成多抗甘蔗新品种提供优良抗源种质和参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为由热带种路打士与滇蔗茅云滇95-

19 杂交获得的 41 份滇蔗茅杂交 F₁及亲本,感病对照品种云蔗 89-151,抗病对照品种闽糖 70-611。

1.2 人工接种鉴定

各材料分别于 2015 年、2016 年 3 月参照文献 [16]中的方法选择健壮蔗株,切成双芽段经冷水和 热水处理,然后分别种植在塑料桶(直径 35 cm、高 30 cm)内,每桶 5 株,每份材料种植共 20 株,置于云南省农业科学院甘蔗研究所(云南开远)的抗病虫鉴定检测温室中培养。

接种病毒源为甘蔗条纹花叶病毒分离物(SC-SMV-JP1, GenBank 登录号 JF488064)^[10] 和高粱花叶病毒分离物(SrMV-HH, GenBank 登录号 DQ530434)^[8],分别接种于感病甘蔗品种云蔗 06-407 和云蔗 89-151 上繁育保存。接种前参照文献 [16]中的方法制备病毒接种液。

供试材料出苗生长至 4~5 月株龄,采用文献 [19]的方法进行切茎接种鉴定。接种 20 d 后,通过 目测植株叶片症状调查发病株率,之后每 15 d 调查 1 次,直至感病对照品种出现中等症状为止。记录接种日期、出苗数、累计发病株数。参照文献 [19] 和文献 [20]中的标准按 1~5 级分级进行抗性水平分类。最后 1 次调查采集蔗株叶片,用 RT-PCR 法检测接种病毒源 SCSMV 和 SrMV。

1.3 RT-PCR 检测

- 1.3.1 引物设计与合成 参照文献[11]和文献 [12]报道的扩增 SCSMV 和 SrMV 特异性引物(表 1),委托上海生物工程公司合成。
- 1.3.2 总 RNA 的提取 各供试样品称取叶片 0.2 g,采用北京全式金生物技术公司的 *TransZol* Plant 试剂盒提取总 RNA,具体步骤按照说明书操作。
- **1.3.3 cDNA** 合成 以提取的叶片总 RNA 为模板,用 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA synthesis SuperMix 试剂盒(北京全式金生物技术公司)并按其说明合成 cDNA 第 1 链。
- 1.3.4 PCR 扩增 分别以 cDNA 第 1 链为模板,用 SCSMV 和 SrMV 特异性引物对反转录产物进行PCR 扩增。SCSMV 的 20 μL PCR 反应体系中含ddH₂O 9.6 μL、2 × Easy Taq PCR SuperMix 8.0 μL,

cDNA 模板 2 μL,上下游引物各 0.2 μL(20 μg/μL); PCR 扩增程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环; 72 ℃延伸 10 min。SrMV 的 20 μL PCR 反应体系中 含 ddH₂ O 7.2 μL、2 × Easy Taq PCR SuperMix 10 μL,cDNA 模板 2 μL,上下游引物各 0.4 μL (20 μg/μL);PCR 扩增程序为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环;72 ℃延伸 10 min。PCR 结束后,用1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

表 1 SCSMV 和 SrMV 检测引物

Table 1 Detection primers for SCSMV and SrMV

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度(℃) Tm	目的片段大小(bp) Aim fragment size	参考文献 Reference	
SCSMV	SCSMV-F: ACAAGGAACGCAGCCACCT	55	939	[11]	
	SCSMV-R; ACTAAGCGGTCAGGCAAC				
SrMV	SrMV-F:CATCARGCAGGRGGCGGYAC	60	828	[12]	
	${\bf SrMV-R:TTTCATCTGCATGTGGGCCTC}$				

R 指代 (A 或 G), Y 指代 (C 或 T)

R refers to(A or G), Y refers to(C or T)

2 结果与分析

41 份滇蔗茅杂交 F_1 及亲本中,对 SCSMV 表现 1 级高抗到 3 级中抗的有 23 份,占 53.49%,4 级感病到 5 级高感的有 20 份,占 46.51%;对 SrMV 表现 1 级高抗到 3 级中抗的有 31 份,占 72.09%,4 级感病到 5 级高感的有 12 份,占 27.91%。综合分析结果显示,云 09-603、云 09-604、云 09-607、云 09-608、云 09-619、云 09-622、云 09-633、云 09-635、云 09-656、云滇 95-19 等 10 份滇蔗茅杂交 F_1 对 SCSMV 和 SrMV 均表现 $1 \sim 2$ 级抗病,占 23.26%,其中云 09-

604、云 09-607、云 09-619、云 09-633、云 09-656、云 滇 95-19 等 6 份滇蔗茅杂交 F₁对 2 种病毒均表现为 1 级高抗,占 13.95% (表 2)。

41 份滇蔗茅杂交 F_1 及亲本的 RT-PCR 检测结果与人工接种鉴定结果吻合,对 SCSMV-JP1 表现1级高抗的 13 份供试滇蔗茅杂交 F_1 均未扩增出939 bp的预期目的片段,对 SrMV-HH 表现1级高抗的 30 份供试滇蔗茅杂交 F_1 均未扩增出828 bp的预期目的片段,而其余表现2~5级抗病至高感的供试滇蔗茅杂交 F_1 均分别扩增出预期目的片段(表2)。

表 2 滇蔗茅杂交 F₁双抗 SCSMV and SrMV 鉴定结果

Table 2 Resistance identification of elite sugarcane innovative germplasm to SCSMV and SrMV

编号 No.		甘蔗条纹花叶病毒 SCSMV				高粱花叶病毒 SrMV				
	种质名称 Germplasm	发病株率 (%) Disease incidence	等级 Grade	RT-PCR 检测 Detection by RT-PCR	抗性反应 Resistance response	发病株率 (%) Disease incidence	等级 Grade	RT-PCR 检测 Detection by RT-PCR	抗性反应 Resistance response	
N1	云 09-601	52. 94	4	+	感病 S	75. 00	5	+	高感 HS	
N2	云 09-602	30.00	3	+	中抗 MR	0	1	-	高抗 HR	
N3	云 09-603	10.00	2	+	抗病 R	0	1	-	高抗 HR	
N4		0	1	-	高抗 HR	0	1	_	高抗 HR	
N5	云 09-607	0	1	-	高抗 HR	0	1	-	高抗 HR	
N6	云 09-608	10.00	2	+	抗病 R	0	1	_	高抗 HR	
N7	云 09-610	50.00	4	+	感病 S	0	1	-	高抗 HR	
N8	云 09-611	41. 67	4	+	感病 S	0	1	_	高抗 HR	
N9		14. 29	3	+	中抗 MR	0	1	_	高抗 HR	
N10	云 09-613	100	5	+	高感 HS	0	1	_	高抗 HR	

表 2(续)

				表 2(续)					
	_	甘蔗条纹花叶病毒 SCSMV				高粱花叶病毒 SrMV			
编号 No.	种质名称 Germplasm	发病株率 (%) Disease incidence	等级 Grade	RT-PCR 检测 Detection by RT-PCR	抗性反应 Resistance response	发病株率 (%) Disease incidence	等级 Grade	RT-PCR 检测 Detection by RT-PCR	抗性反应 Resistance response
N11	云 09-614	20. 00	3	+	中抗 MR	0	1	-	高抗 HR
N12	云 09-615	100	5	+	高感 HS	0	1	-	高抗 HR
N13	云 09-616	100	5	+	高感 HS	100	5	+	高感 HS
N14	云 09-618	50.00	4	+	感病 S	80.00	5	+	高感 HS
N15	云 09-619	0	1	=	高抗 HR	0	1	-	高抗 HR
N16	云 09-621	25.00	3	+	中抗 MR	0	1	-	高抗 HR
N17	云 09-622	10.00	2	+	抗病 R	0	1	-	高抗 HR
N18	云 09-624	44. 44	4	+	感病 S	100	5	+	高感 HS
N19	云 09-625	29. 41	3	+	中抗 MR	0	1	-	高抗 HR
N20	云 09-629	57. 14	4	+	感病 S	0	1	-	高抗 HR
N21	云 09-630	100	5	+	高感 HS	80.00	5	+	高感 HS
N22	云 09-631	53. 33	4	+	感病 S	0	1	-	高抗 HR
N23	云 09-633	0	1	=	高抗 HR	0	1	-	高抗 HR
N24	云 09-634	0	1	=	高抗 HR	44. 44	4	+	感病 S
N25	云 09-635	0	1	=	高抗 HR	10.00	2	+	抗病 R
N26	云 09-636	31. 58	3	+	中抗 MR	0	1	-	高抗 HR
N27	云 09-639	36. 36	4	+	感病 S	0	1	-	高抗 HR
N28	云 09-643	58. 33	4	+	感病 S	0	1	-	高抗 HR
N29	云 09-644	42. 31	4	+	感病 S	0	1	-	高抗 HR
N30	云 09-648	78. 57	5	+	高感 HS	0	1	-	高抗 HR
N31	云 09-651	33. 33	4	+	感病 S	0	1	-	高抗 HR
N32		81. 82	5	+	高感 HS	0	1	_	高抗 HR
N33	云 09-654	0	1	-	高抗 HR	57. 14	4	+	感病 S
N34	云 09-655	50.00	4	+	感病 S	0	1	_	高抗 HR
N35	云 09-656	0	1	_	高抗 HR	0	1	_	高抗 HR
N636	云 09-657	100	5	+	高感 HS	0	1	_	高抗 HR
N37	云 09-658	0	1	-	高抗 HR	36. 36	4	+	感病 S
N38	云 09-659	18. 18	3	+	中抗 MR	81. 82	5	+	高感 HS
N39	云 09-660	0	1	_	高抗 HR	50.00	4	+	感病 S
N40	云 09-661	0	1	_	高抗 HR	58. 33	4	+	感病 S
N41	云 09-662	0	1	_	高抗 HR	42. 31	4	+	感病 S
N42(母本 Female parent)	路打士	100	5	+	高感 HS	0	1	_	高抗 HR
N43(父本 Male parent)	云滇 95-19	0	1	_	高抗 HR	0	1	_	高抗 HR
感病对照	云蔗 89-151	100	5	+	高感 HS	100	5	+	高感 HS
Susceptibility control									
抗病对照	闽糖 70-611	0	1	=	高抗 HR	0	1	-	高抗 HR
Resistant control									

^{+:}SCSMV 或 SrMV 检测结果阳性; -:SCSMV 或 SrMV 检测结果阴性

⁺ ; Positive reaction to SCSMV or SrMV, - ; Negative reaction to SCSMV or SrMV

3 讨论

选育和种植抗病品种是防治甘蔗花叶病最经济有效的措施,然而,目前能同时兼抗几种病毒病原的品种较为缺乏,而抗病种质资源的发掘利用是选育抗病品种的基础和关键^[16-18]。本研究以中国蔗区 2种甘蔗花叶病主要致病病原 SCSMV 和 SrMV 为接种毒源,采用人工切茎接种和 RT-PCR 检测相结合的方法,于 2015 - 2016 年 2 次对由热带种与滇蔗茅杂交获得的 41 份滇蔗茅杂交 F₁及亲本进行了双抗 SCSMV 和 SrMV 鉴定与评价。明确了 41 份滇蔗茅杂交 F₁及亲本对甘蔗花叶病 2 种主要致病病原的抗性,综合评价筛选出双抗 SCSMV 和 SrMV 的 10 份滇蔗茅杂交 F₁,为深入开展甘蔗抗花叶病育种提供了优良抗源种质和参考依据。

目前,中国蔗区甘蔗花叶病病原主要有 SCMV 和 SrMV、SCSMV 3 种,3 种病毒侵染甘蔗后产生的花叶症状目测难以区别,采用 RT-PCR 对人工接种材料病毒检测,可提高人工接种鉴定结果的科学性和可靠性。

云南是中国甘蔗野生资源重要的分布中心和世界野生甘蔗起源中心之一^[21],滇蔗茅(Erianthus rockii Keng)是重要的甘蔗近缘属野生资源,具有丰富的遗传多样性、耐旱、耐瘠、宿根性强、抗锈病等优良特性^[22-23],在甘蔗种质创新和抗病新品种的创制中具有利用价值。本研究结果显示了由野生资源滇蔗茅杂交获得的滇蔗茅杂交 F₁中蕴藏着双抗 SC-SMV 和 SrMV 基因,是选育抗花叶病甘蔗新品种很有利用前景的抗原种质,可进一步杂交拓宽甘蔗抗花叶病遗传基础,提高多抗甘蔗新品种选育效率。鉴于 SCSMV 已成为我国滇西南蔗区甘蔗花叶病主要病原,今后我们应调整甘蔗抗花叶病育种策略,加强双抗 SCSMV 和 SrMV 甘蔗种质资源的评价筛选和利用,以期为有效防控甘蔗花叶病提供高产高糖多抗甘蔗新品种。

参考文献

[1] Alegria O M, Royer M, Bousalem M, et al. Genetic diversity in the coat protein coding region of eighty-six *Sugarcane mosaic virus* isolates from eight countries, particularly from cameroon and con-

- go[J]. Arc Virol, 2003, 148(2)):357-372
- [2] Yang Z N, Mirkov T E. Sequence and relationships of sugarcane mosaic and Sorghum mosaic virus strains and development of RT-PCR-based RFLPs for strain discrimination [J]. Phytopathology, 1997,87(9):932-939
- [3] 黄应昆,李文凤. 现代甘蔗病虫草害防治彩色图说[M]. 北京:中国农业出版社,2016;118-121
- [4] 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
- [5] 陈炯,陈剑平. 由高粱花叶病毒和甘蔗花叶病毒引发的浙江 甘蔗花叶病害[J]. 病毒学报,2002,18(4):362-365
- [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] 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
- [10] Li W F, He Z, Li S F, et al. Molecular characterization of a new strain of Sugarcane streak mosaic virus (SCSMV) [J]. Arc Virol, 2011, 156;2101-2104
- [11] He Z, Li W F, Yasaka R. et al. Molecular variability of Sugarcane streak mosaic virus in China based on an analysis of the P1 and CP protein coding regions [J]. Arc Virol, 2014, 159: 1149-1154
- [12] 蒋军喜,谢艳,阙海勇. 江西甘蔗花叶病病原的分子鉴定 [J]. 植物病理学报,2009,39(2);203-206
- [13] 周仲驹, 黄茹娟, 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
- [14] Matsuoka S, Masuda Y, Arizono H. Breeding procedures for resistance to Sugarcane mosaic virus in Brazil [J]. Sugar Cane, 1990,3:12-16
- [15] 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
- [16] 李文凤,王晓燕,黄应昆,等. 甘蔗优良品种材料抗高粱花叶 病毒鉴定与评价[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(4): 901-905
- [17] 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
- [18] Li W F, Wang X Y, Huang Y K, et al. Screening sugarcane germplasm resistant to Sorghum mosaic virus [J]. Crop Protec, 2013, 43.27-30
- [19] 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
- [20] 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
- [21] 范源洪,陈辉,史宪伟,等. 甘蔗细茎野生种云南不同生态类型的 RAPD 分析[J]. 云南植物研究,2001,23(3);298-308
- [22] 徐超华,陆鑫,刘洪博,等. 甘蔗近缘种滇蔗茅(Erianthus rockii)表型性状遗传多样性研究[J]. 植物遗传资源学报, 2014,15(6):1369-1373
- [23] 李文凤,蔡青,黄应昆,等. 甘蔗野生资源对蔗茅柄锈菌的抗性鉴定[J]. 植物保护,2005,31(2):51-53