

甘蔗与斑茅 BC₁ 分子鉴定、抗黑穗病和花叶病初步评价

吴小斌, 王勤南, 凌秋平, 杨湛端, 陈勇生, 黄俊坚, 吴嘉云*, 李奇伟*

[广东省生物工程研究所(广州甘蔗糖业研究所), 广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室, 广州 510316]

摘要: 为了解甘蔗(*Saccharum*)与斑茅(*Erianthus arundinaceus*)杂交后代作为抗病亲本的利用价值, 通过特异引物 PCR 鉴定出 78 份甘蔗与斑茅杂交 BC₁ 真实杂种; 通过人工接种花叶病毒和黑穗病菌, 初步评价了甘蔗和斑茅杂交 BC₁ 的抗病表现。结果表明, 甘蔗和斑茅杂交 BC₁ 的抗花叶病具有普遍性, 而黑穗病抗性则出现分离。初步筛选出 BC₁ 无性系 YCE01-48、YCE01-71、YCE01-105、YCE01-125、YCE02-184 和 YCE01-118 可同时抗花叶病和黑穗病, 有望成为甘蔗杂交利用的高抗病源亲本。

关键词: 甘蔗; 斑茅; 分子鉴定; 抗病

doi: 10.11926/jtsb.3926

Molecular Identification and Resistance Evaluation to Smut and Mosaic Disease with BC₁ of *Saccharum* × *Erianthus arundinaceus*

WU Xiao-bin, WANG Qin-nan, LING Qiu-ping, YANG Zhan-duan, CHEN Yong-sheng, HUANG Jun-jian, WU Jia-yun*, LI Qi-wei*

[Guangdong Key Lab of Sugarcane Improvement & Biorefinery, Guangdong Provincial Bioengineering Institute (Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute), Guangzhou 510316, China]

Abstract: In order to understand the utilization value of hybrids between *Saccharum* and *Erianthus arundinaceus* as resistant parents, the resistance to smut and SCMV of some progenies BC₁ from *Saccharum* × *E. arundinaceus* were evaluated by artificial inoculation of pathogens. The results showed that most of BC₁ had the resistance to SCMV, and the resistance to smut was segregative among progenies. The BC₁ clones YCE01-48, YCE01-71, YCE01-105, YCE01-125, YCE02-184 and YCE01-118 showed co-resistance to smut and SCMV. So, they could be used as parents with high disease resistance for sugarcane breeding.

Key words: *Saccharum*; *Erianthus arundinaceus*; Molecular identification; Disease resistance

甘蔗(*Saccharum*)育种历史与抗病育种密不可分, 利用野生种质资源创制优异新亲本是目前广泛应用的甘蔗育种方法。20 世纪初, 荷兰育种家

Jesweit 首次提出“甘蔗高贵化育种”, 并通过将热带种 *Saccharum officinarum* 与爪哇割手密(*S. spontaneum*)杂交、回交, 实现甘蔗抗花叶病育种^[1]。现代

收稿日期: 2018-04-16 接受日期: 2018-07-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571730, 31701488, 31401440); 广东省科技计划项目(2014A030304027, 2015A030302030, 2017A030303048); 广东省自然科学基金项目(2015A030313696, 2015A030310286); 国家糖料产业技术体系项目(CARS-170107); 广东省科学院专项资金(2017GDASCX-0105)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31571730, 31701488, 31401440), the Project for Science and Technology Planning in Guangdong (Grant No. 2014A030304027, 2015A030302030, 2017A030303048), the Natural Science Foundation in Guangdong (Grant No. 2015A030313696, 2015A030310286), the Project for National Sugar Industry Technical System of China (Grant No. CARS-170107), and the Special Projects of Guangdong Academy of Sciences (Grant No. 2017GDASCX-0105).

作者简介: 吴小斌(1990~), 男, 硕士, 主要从事甘蔗病害、分子设计育种方面研究。E-mail: wuxiaobin@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: jiyunng@163.com, liqiwei66@163.com

甘蔗品种只含有少数种质资源的血缘,狭窄的遗传基础造成后代群体变异不足,成为甘蔗品种遗传改良的瓶颈^[1-3]。因此,充分挖掘利用甘蔗野生种质资源、拓宽甘蔗遗传基础成为提高甘蔗选育种效率的重要途径。

斑茅(*Erianthus arundinaceus*)隶属于禾本科(Graminaceae)蔗茅属,具有抗逆强、分蘖多、宿根性好、生长力旺盛、适应性广等优异性状,具有改良现有甘蔗品种农艺性状的潜力,所以倍受世界各国育种家重视^[2,4-5]。1885年,Soltwedel首次提出甘蔗与斑茅杂交的想法;1941年,Janaki-Ammal利用甘蔗属热带种和斑茅杂交,成功得到杂交后代^[6]。1956年,我国海南甘蔗育种场开展相关研究,于1973年育成第一个真杂种F₁崖城73-07,经染色体Giemsa-C带分带和过氧化物酶同工酶电泳分析鉴定确认含有斑茅血缘^[7-9];至2001年,成功应用甘蔗与斑茅F₁与甘蔗回交获得真实的BC₁,此后陆续获得更高代无性系^[10],为斑茅种质资源利用提供宝贵资源。

甘蔗与斑茅杂交后代优异性状备受瞩目,在斑茅杂交利用育种进程中,有许多已报道的杂交后代被鉴别,且有关杂交后代的抗病性评价鲜有报道,因此对甘蔗与斑茅杂交后代的真实性鉴定与抗性评价尤为重要。本研究利用鉴定斑茅后代的特异引物EF1/ER1^[10]对甘蔗与斑茅杂交BC₁进行分子鉴定,并进行抗黑穗病和抗花叶病初步评价,为斑茅在甘蔗种质创新利用研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 甘蔗与斑茅 BC₁ 真实杂种分子鉴定

试剂和供试材料 DNA提取试剂购自生物工程(上海)股份有限公司,Ex Taq™ Version 2.0 扩增酶、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司,琼脂糖粉末购自 BIOWEST 公司,引物合成由赛默飞世尔科技(中国)有限公司完成。供试无性系为广州甘蔗糖业研究所海南甘蔗育种场创制的甘蔗与斑茅的 BC₁,以斑茅原种、甘蔗热带种 Badila 为对照,采集地点为广东省翁源县蔗区,取植株+1 叶,用无菌水清洗叶片后保存于-80℃。

DNA 提取和 PCR 鉴定 甘蔗叶片总 DNA 提取采用改良 CTAB 法,即取 100~200 mg 甘蔗叶片于液氮中迅速研磨至粉末,加入 900 μL 预热至 65℃的 DNA 提取缓冲液和 100 μL 无水乙醇,混匀

后 65℃水浴 60 min 以充分裂解细胞。10 000 ×g 离心 5 min 后取上清液,依次加入等体积的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿:异戊醇(24:1)分别抽提 1 次,加入等体积-20℃预冷的异丙醇沉淀 DNA,离心后沉淀用 75%的乙醇洗 2 次、无水乙醇洗 1 次,风干后溶于 100 μL 无菌水,加 1 μL RNase A,并于 37℃水浴 45~60 min,后于-20℃保存备用。所提 DNA 均用 Biophotometer 生物分光光度计测定 OD 值和琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 完整性。PCR 反应体系为 25 μL,包含 12.5 μL 2 × Ex Taq premix,上下游引物各 1 μL,0.5 μL 总 DNA 和 10 μL 无菌水。引物 EF1: 5'-GGAAGAAAGAAAACAAGGGT-3', ER1: 5'-GGGACGGMCAAACAAAATT-3'^[11]。PCR 扩增程序为 95℃预变性 5 min; 93℃变性 50 s, 54℃退火 20 s, 72℃延伸 40 s, 共 35 个循环; 72℃延伸 5 min。PCR 扩增产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,目的条带 317 bp。每样品 3 次生物学重复。

1.2 抗黑穗病评价

材料 接种源为广东省翁源县蔗区不同田块不同品种随机采集黑穗鞭子混合,收集后风干并将黑穗孢子过筛后保存于 4℃。供试无性系为广州甘蔗糖业研究所海南甘蔗育种场创制的 37 份甘蔗与斑茅的 BC₁,以 F134、NC6310 和 YC71-374 为对照。

评价方法 抗性鉴定参考《NY/T 1786-2009 农作物品种鉴定规范,甘蔗》^[12]中的抗黑穗病评价方法。具体操作为:甘蔗黑穗病孢子用自来水(加少量吐温-20 作为表面活性剂)调配成孢子浓度约为 5 × 10⁶ cfu mL⁻¹ 的悬浮液,且孢子活力 > 80%。将种茎置于孢子悬浮液 10 min,于 25℃~28℃下保湿 (24 ± 2) h,促进孢子萌发并侵入蔗芽。保湿结束后,种植于田间,常规管理。试验采用随机区组设计,单行区,行长 5.0 m,行距 1.1 m,设 3 个重复,每小区每品种 50 个芽,6 月中旬接种;待第 1 个黑穗病鞭子长出后,每隔 14 d 调查 1 次新长出的鞭子数,直到 12 月中旬为止。本试验于广东省生物工程研究所(广州甘蔗糖业研究所)翁源甘蔗育种基地新陂村试验田进行。

分级标准 依据农业部“九五”攻关项目病害的统一分级标准^[13]划分为 9 级,1 级为高抗(HR),发病率为 0~3.00%; 2 级和 3 级均为抗性(R),发病率分别为 3.01%~6.00%和 6.01%~9.00%; 4 级为中抗性(MR),发病率为 9.01%~12.00%; 5 级均为中感

(MS), 发病率为 12.01%~25.00%; 6 级和 7 级均为感病(S), 发病率分别为 25.01%~35.00% 和 35.01%~50.00%; 8 级和 9 级均为高感(HS), 发病率分别为 50.01%~75.00% 和 75.01%~100.00%。

1.3 抗花叶病评价

材料 接种源为广东省翁源县翁源蔗区不同田块不同品种随机采集带花叶病症状植株+1 叶。供试无性系为广州甘蔗糖业研究所海南甘蔗育种场创制的 62 份甘蔗与斑茅的 BC₁, 以 ROC22 为对照。

评价方法 参考《NY/T 1786-2009 农作物品种鉴定规范, 甘蔗》^[12]抗花叶病评价方法。具体操作为: 在春季气温回升至(20±2)℃, 采集带有甘蔗花叶病的多品种混合病叶, 用剪刀把叶片剪碎于研钵中, 加接种用缓冲液[0.01 mol L⁻¹ PBS (pH=8.0) 1 000 mL, Na₂SO₃ 1.0 g]和石英砂进行研磨, 经过 3~5 min 研磨, 双层纱布过滤榨汁, 滤液即为带有病毒的接种物。采用涂抹接种法, 对带有 2~4 片完全展开叶的甘蔗小苗进行接种, 方法是: 洒少量石英砂于甘蔗植株心叶基部, 以拇指和食指在接种物中沾湿, 在心叶外侧紧捏心叶基部, 加压轻轻搓 2~3 次, 至擦伤叶表皮, 共接种 4 次, 每次间隔 6 d。在潮湿天气或阴天接种为佳, 若是晴天, 则在傍晚进行, 且保持土壤湿润。待接种的甘蔗小苗应是无花叶或嵌纹症状。从发病开始统计感染株数, 每隔 15 d 调查 1 次, 直到发病基本稳定为止。试验于广东省生物工程研究所(广州甘蔗糖业研究所)翁源甘蔗育种基地新陂村试验田进行。

分级标准 依据《NY/T 1786-2009 农作物品种鉴定规范, 甘蔗》^[12]分级标准划分为 5 级, 1 级

为具免疫性, 发病率为 0; 2 级为高抗性, 发病率为 1%~10%; 3 级为中抗性, 发病率为 10.1%~33%; 4 级为具感病性, 发病率为 33.1%~66%; 5 级为高感病性, 发病率大于 66.1%。

2 结果和分析

2.1 甘蔗与斑茅 BC₁ 真实杂种鉴定

经电泳检测(图 1), 78 份供试无性系均为甘蔗与斑茅杂交的真实杂种后代, 其中 YCE01 系列 55 份: YCE01-3、YCE01-11、YCE01-13、YCE01-33、YCE01-34、YCE01-36、YCE01-42、YCE01-43、YCE01-45、YCE01-46、YCE01-48、YCE01-58、YCE01-59、YCE01-60、YCE01-61、YCE01-63、YCE01-64、YCE01-69、YCE01-71、YCE01-75、YCE01-80、YCE01-81、YCE01-85、YCE01-86、YCE01-87、YCE01-88、YCE01-89、YCE01-90、YCE01-92、YCE01-93、YCE01-94、YCE01-96、YCE01-97、YCE01-99、YCE01-101、YCE01-102、YCE01-103、YCE01-105、YCE01-106、YCE01-109、YCE01-112、YCE01-114、YCE01-115、YCE01-116、YCE01-118、YCE01-119、YCE01-120、YCE01-121、YCE01-123、YCE01-125、YCE01-126、YCE01-127、YCE01-129、YCE01-133 和 YCE01-134, YCE02 系列 23 份: YCE02-4、YCE02-9、YCE02-16、YCE02-20、YCE02-32、YCE02-52、YCE02-72、YCE02-82、YCE02-93、YCE02-96、YCE02-101、YCE02-105、YCE02-119、YCE02-122、YCE02-123、YCE02-164、YCE02-167、YCE02-179、YCE02-184、YCE02-185、YCE02-186、YCE02-193 和 YCE02-194。

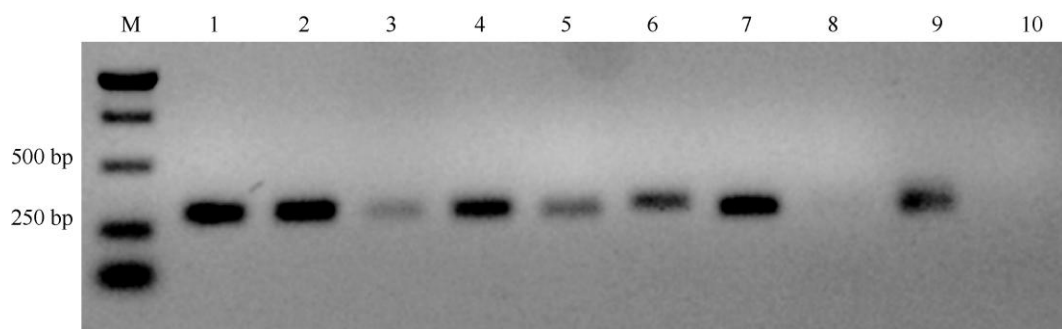


图 1 部分无性系 PCR 产物电泳检测真实杂种。M: 标准标记; 1: YCE01-86; 2: YCE01-71; 3: YCE01-81; 4: YCE01-112; 5: YCE01-58; 6: YCE01-59; 7: YCE01-80; 8: 阴性对照 Badila; 9: 阳性对照 YC92-77; 10: 空白对照。

Fig. 1 Real hybrids identified by agarose gel electrophoresis of PCR products from partial progenies. M: Standard Markers; 1: YCE01-86; 2: YCE01-71; 3: YCE01-81; 4: YCE01-112; 5: YCE01-58; 6: YCE01-59; 7: YCE01-80; 8: Badila (negative control); 9: YC92-77 (positive control); 10: Blank control.

2.2 抗黑穗病初步评价

从表 1 可见, 对照种 F134 (感小种 2, 抗小种 1) 的发病率为 64.29%, NCo310 (抗小种 2, 感小种 1) 的发病率为 36.04%, YC71-374 (高感小种 1 和 2) 的发病率为 80.00%, 在 37 份鉴定无性系中, 表现出高抗(1 级)的有 6 份无性系, 占总数的 16.21%, 分

别为 YCE01-48、YCE01-71、YCE01-105、YCE01-125、YCE02-119 和 YCE02-184, 1~3 级抗性的共 8 份(21.62%), 高感无性系有 12 份(32.43%)。表现 1 级、3 级、8 级和 9 级抗性的无性系数数量占总数的 54.05%, 表明参试的甘蔗与斑茅的 BC₁ 抗黑穗病表现出性状分离。

表 1 参试甘蔗与斑茅 BC₁ 抗黑穗病表现

Table 1 Smut resistance of BC₁ from *Saccharum* × *Erianthus arundinaceus*

编号 No.	无性系 Clone	发病率 Morbidity /%	抗性级别 Resistance class	抗性 Resistance	编号 No.	无性系 Clone	发病率 Morbidity /%	抗性级别 Resistance class	抗性 Resistance
1	YCE01-45	33.09	6	S	21	YCE01-127	7.18	3	R
2	YCE01-46	15.58	5	MS	22	YCE02-4	56.80	8	HS
3	YCE01-48	0.00	1	HR	23	YCE02-20	75.00	8	HS
4	YCE01-58	30.77	6	S	24	YCE02-72	21.05	5	MS
5	YCE01-71	0.00	1	HR	25	YCE02-82	50.00	7	S
6	YCE01-80	15.38	5	MS	26	YCE02-93	58.67	8	HS
7	YCE01-82	36.36	7	S	27	YCE02-96	15.38	5	MS
8	YCE01-85	65.99	8	HS	28	YCE02-101	25.00	5	MS
9	YCE01-86	62.50	8	HS	29	YCE02-119	0.00	1	HR
10	YCE01-97	41.18	7	S	30	YCE02-122	83.33	9	HS
11	YCE01-101	49.03	7	S	31	YCE02-123	13.81	5	MS
12	YCE01-102	57.71	8	HS	32	YCE02-167	73.02	8	HS
13	YCE01-103	22.92	5	MS	33	YCE02-179	50.00	7	S
14	YCE01-105	0.00	1	HR	34	YCE02-184	1.23	1	HR
15	YCE01-106	55.00	8	HS	35	YCE02-193	63.16	8	HS
16	YCE01-114	30.43	6	S	36	YCE02-194	54.05	8	HS
17	YCE01-118	8.50	3	R	37	YCE02-197	25.00	5	MS
18	YCE01-120	76.32	9	HS	38	F134	64.29	8	HS
19	YCE01-125	0.00	1	HR	39	NCo310	36.04	7	S
20	YCE01-126	14.56	5	MS	40	YC71-374	80.00	9	HS

HR: 高抗; R: 抗病; MR: 中抗; MS: 中感; S: 感病; HS: 高感。下表同。

HR: High resistance; R: Resistance; MR: Middle resistance; MS: Middle sensitivity; S: Sensitivity; HS: High sensitivity. The same is following Table.

2.3 抗花叶病初步评价

从表 2 可见, 对照种 ROC22 的发病率为 49.64%, 62 份鉴定无性系中, 有 20 份表现出具免疫(1 级, 占总数的 32.26%), 15 份表现出高抗(2 级, 24.19%), 15 份表现出中抗(3 级, 24.19%), 1~3 级抗病的无性系共有 50 份(80.65%), 这表明甘蔗与斑茅的 BC₁ 对花叶病害具有普遍的抗性, 是甘蔗抗花叶病遗传改良的优异抗源种质资源。

3 结论和讨论

3.1 甘蔗与斑茅杂交后代分子鉴定

甘蔗杂交常受授粉方式影响, 从而产生假杂种, 因此真假杂种鉴别极其关键。甘蔗属间杂交后代鉴定曾采用同工酶方法, 但邓海华等认为该方法

可用于辨别真杂种而无法排除假杂种^[14], 染色体鉴定方法, 如 Giemsa-C 带分带^[15]和荧光原位杂交^[16]能有效鉴别杂交后代的真实性, 但试验流程复杂, 成本高。而基于 PCR 检测的杂交后代分子鉴定具有特异性高、重复性好、操作简便等优点, 更适合大规模群体鉴定。本试验采用斑茅特异性引物 EF1/ER1^[11,17-18], 对甘蔗与斑茅 BC₁ 杂交后代进行检测, 3 次生物学重复检测结果一致, 鉴定出的 78 份真实杂种后代为甘蔗斑茅杂交的利用提供了可靠的种质资源。

本研究参试无性系的斑茅原始亲本都为 6 倍体 ($2n=60$, $x=10$), 基于斑茅基因组 rDNA 区域设计的 PCR 检测位点分布在 6 条染色体上^[19-20], 特异性高, 检测结果可靠。但随着甘蔗与斑茅的回交代数增加, 斑茅染色体会逐渐丢失, 至 BC₃ 无性系普遍只有 5~8 条斑茅染色体^[5], 对 BC₄ 以后的无性系进行

表 2 甘蔗与斑茅 BC₁ 抗花叶病表现Table 2 Mosaic disease resistance of BC₁ from *Saccharum* × *Erianthus arundinaceus*

编号 No.	无性系 Clone	发病率 Morbidity /%	抗性级别 Resistance class	抗性 Resistance	编号 No.	无性系 Clone	发病率 Morbidity /%	抗性级别 Resistance class	抗性 Resistance
1	YCE01-11	0.00	1	I	33	YCE01-112	0.00	1	I
2	YCE01-33	30.75	3	MR	34	YCE01-114	75.00	5	HS
3	YCE01-34	11.76	3	MR	35	YCE01-115	0.00	1	I
4	YCE01-42	66.67	5	HS	36	YCE01-118	0.00	1	I
5	YCE01-43	0.00	1	I	37	YCE01-119	2.08	2	HR
6	YCE01-45	5.96	2	HR	38	YCE01-120	3.57	2	HR
7	YCE01-46	8.73	2	HR	39	YCE01-121	0.00	1	I
8	YCE01-48	8.65	2	HR	40	YCE01-125	0.00	1	I
9	YCE01-58	15.39	3	MR	41	YCE01-126	10.00	2	HR
10	YCE01-59	0.00	1	I	42	YCE01-127	40.00	4	S
11	YCE01-61	44.23	4	S	43	YCE02-4	32.45	3	MR
12	YCE01-63	0.00	1	I	44	YCE02-9	87.86	5	HS
13	YCE01-64	0.00	1	I	45	YCE02-16	17.44	3	MR
14	YCE01-71	0.00	1	I	46	YCE02-20	58.13	4	S
15	YCE01-81	7.89	2	HR	47	YCE02-32	0.00	1	I
16	YCE01-85	11.73	3	MR	48	YCE02-72	3.85	2	HR
17	YCE01-86	11.86	3	MR	49	YCE02-82	3.70	2	HR
18	YCE01-87	0.00	1	I	50	YCE02-93	0.00	1	I
19	YCE01-88	0.00	1	I	51	YCE02-96	8.33	2	HR
20	YCE01-89	27.78	3	MR	52	YCE02-101	18.52	3	MR
21	YCE01-92	0.00	1	I	53	YCE02-105	13.60	3	MR
22	YCE01-94	0.00	1	I	54	YCE02-122	78.97	5	HS
23	YCE01-96	48.59	4	S	55	YCE02-123	8.77	2	HR
24	YCE01-97	28.47	3	MR	56	YCE02-164	0.00	1	I
25	YCE01-99	15.48	3	MR	57	YCE02-167	2.86	2	HR
26	YCE01-101	24.14	3	MR	58	YCE02-168	33.56	4	S
27	YCE01-102	8.33	2	HR	59	YCE02-179	2.70	2	HR
28	YCE01-103	52.94	4	S	60	YCE02-184	7.14	2	HR
29	YCE01-105	15.22	3	MR	61	YCE02-193	47.78	4	S
30	YCE01-106	0.00	1	I	62	YCE02-194	0.00	1	I
31	YCE01-109	42.86	4	S	63	ROC22	49.64	4	S
32	YCE01-116	29.26	3	MR					

I: 免疫。

I: Immunity.

鉴定, 该检测方法灵敏度降低, 甚至失效。因此, 开发斑茅染色体全覆盖的特异性引物分子鉴定体系, 对于甘蔗斑茅种质资源高代无性系的创制和开发利用具有重要意义。

3.2 甘蔗与斑茅杂交后代抗病性利用

甘蔗鞭黑粉菌(*Sporisorium scitaminea*)引起的甘蔗黑穗病是中国蔗区最严重的甘蔗病害之一, 黑穗病抗性也成为品种选育的重要指标之一。沈万宽等对国内现有部分甘蔗品种(品系)进行抗性评价, 仅个别品种表现抗病^[24-25]。本文从37份甘蔗与斑茅杂交BC₁无性系中筛选出具1~3级抗性的8份品种(品系)(占21.62%), 与现有栽培种^[24-25]相比, 甘蔗

与斑茅杂交BC₁黑穗病抗性表现较好。本研究采用蔗区田间直接收集黑穗病混合孢子进行接种, 使用感染不同生理小种的品种作为对照, F134 (感小种2, 抗小种1)的发病率为64.29%, NCo310 (抗小种2, 感小种1)为36.04%, YC71-374 (高感小种1和2)为80.00%, 说明该试验蔗区优势病原菌为生理小种2。本试验对侵染源未进行生理小种的准确鉴定, 不排除不同品种对不同病原小种存在感病差异, 另有报道中国蔗区可能存在第3个黑穗病菌生理小种^[26-27](目前未见其柯赫氏法则鉴定报道), 因此有关更加快速准确的抗性鉴定方法有待完善更新; 其次, 不同蔗区的黑穗病抗性鉴定结果^[13,28]存在差异, 不排除环境对甘蔗抗病性和病原侵染能力的影响, 准确评价

甘蔗抗病性还需要多年多点试验。

甘蔗花叶病毒(sugarcane mosaic virus, SCMV)、高粱花叶病毒(sorghum mosaic virus, SrMV)和甘蔗条纹花叶病毒(sugarcane streak mosaic virus, SCSMV)为甘蔗花叶病病原物^[29], 严重危害甘蔗产量和品质^[30-31]。李文凤等在电镜下对云南省21份栽培种进行观测, 结果表明样品均感染甘蔗花叶病, 并存在病原复合感染^[32]。Li等对我国33份斑茅野生种质资源进行SrMV抗性鉴定, 33份斑茅无性系中有22份(66.7%)呈中抗至高抗^[33]。本研究共有50份(占80.65%)呈1~3级抗性, 表明甘蔗与斑茅的BC₁可能成为甘蔗抗花叶病遗传改良的优良抗源亲本, 这与吴嘉云等^[34]的研究结果相似。

目前, 国内外对于甘蔗与斑茅杂交后代的病害抗性鉴定报道较少。本研究对甘蔗与斑茅杂交BC₁采用人工接种花叶病毒和黑穗病菌, 结果表明, 甘蔗与斑茅杂交BC₁对花叶病表现普遍抗性, 对黑穗病抗性表现分离, 其中YCE01-48、YCE01-71、YCE01-105、YCE01-125、YCE02-184和YCE01-118无性系对两种病源均呈现抗性, 可进一步鉴定和挖掘其作为抗性亲本的利用价值。

3.3 甘蔗与斑茅杂交 BC₁ 染色体遗传与抗病性

甘蔗染色体遗传构成复杂, 甚至同一植株不同体细胞的染色体数目也可能存在差异^[35], 且其配子存在单价体、二价体、三价体等^[36], Piperidis 等通过 GISH 对甘蔗与斑茅杂交后代 BC₁ 无性系进行检测, 结果表明 BC₁ 含斑茅染色体数为 21~30, 其染色体构成为 $2n+n$ ^[37], $2n$ 来自 F₁。吴嘉云的研究表明, 12 份 BC₁ 无性系的染色体数目为 116~130 条, 其中含有斑茅的数目为 22~35 条, 而其母本, 即甘蔗与斑茅杂交 F₁ 代含有斑茅染色体数目在 28~30 条, 验证了 BC₁ 染色体构成为 $2n+n$, 且 BC₁ 染色体存在超 $2n$ 现象^[5]。同时还观察到甘蔗与斑茅染色体发生易位, 这进一步加剧甘蔗与斑茅杂交后代染色体组成复杂程度。本研究结果表明 BC₁ 黑穗病抗病性表现分离, 这可能与 BC₁ 斑茅染色体的 $2n$ 及超 $2n$ 构成有关。

参考文献

[1] CHEN R K. Modern Sugarcane Genetic Breeding [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 1-17.
陈如凯. 现代甘蔗遗传育种 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011:

1-17.
[2] HUANG Y J, WU J Y, LIU S M, et al. Chromosome genetic and karyotype analysis of F₁ hybrids between *Saccharum officinarum* and *Erianthus arundinaceus* based on GISH [J]. J Plant Genet Resour, 2014, 15(2): 394-398. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.2014.02.025.
黄永吉, 吴嘉云, 刘少谋, 等. 基于 GISH 的甘蔗与斑茅 F₁ 染色体遗传与核型分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(2): 394-398. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.2014.02.025.
[3] LI Q W. Modern Technology for Sugarcane Improvement [M]. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2000: 2-9.
李奇伟. 现代甘蔗改良技术 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2000: 2-9.
[4] HUANG Y X, LUO T, LIU X H, et al. Genetic analysis of chromosomes for the progeny between sugarcane (*Saccharum* spp.) and intergeneric hybrid complex (*Erianthus arundinaceus* × *Saccharum spontaneum*) [J]. Chin J Trop Crops, 2016, 37(2): 220-225. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2016.02.002.
黄玉新, 罗霆, 刘昔辉, 等. 甘蔗与斑茅割手密复合体(GXAS07-6-1)杂交后代的染色体遗传分析 [J]. 热带作物学报, 2016, 37(2): 220-225. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2016.02.002.
[5] WU J Y. The chromosome inheritance for the hybrid progeny of *S. officinarum* L. and *E. arundinaceum* and germplasm resistance preliminary evaluation [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013: 122.
吴嘉云. 甘蔗与斑茅后代染色体遗传分析及抗性初步评价 [D]. 福州: 福建农林大学, 2013: 122.
[6] JANAKI-AMMAL E K. Intergeneric hybrids of *Saccharum* [J]. J Genet, 1941, 41(2/3): 217-253. doi: 10.1007/BF02983021.
[7] FU C, DENG H H, CHEN X W. Research and utilization of *Erianthus arundinaceus* at Hainan Sugarcane Breeding Station [J]. Sugar Canes, 2003(6): 1-5,14. doi: 10.3969/j.issn.1005-9695.2003.06.001.
符成, 邓海华, 陈西文. 海南甘蔗育种场斑茅研究利用 [J]. 甘蔗糖业, 2003(6): 1-5,14. doi: 10.3969/j.issn.1005-9695.2003.06.001.
[8] LIU S M, FU C, WU Q W, et al. Breeding and selection of BC₁ of *Erianthus arundinaceus* at Hainan sugarcane breeding station [J]. Chin J Trop Agric, 2007, 27(3): 9-12. doi: 10.3969/j.issn.1009-2196.2007.03.003.
刘少谋, 符成, 吴其卫, 等. 斑茅杂种甘蔗 BC₁ 选育研究 [J]. 热带农业科学, 2007, 27(3): 9-12. doi: 10.3969/j.issn.1009-2196.2007.03.003.
[9] WU N Y, QI J W. Identification of the hybrids between *Saccharum arundinaceum* Retz. and sugarcane varieties [J]. J S China Agric Univ, 1987, 8(2): 28-34.

- 吴能奕, 戚经文. 甘蔗 × 斑茅远缘杂种的鉴别 [J]. 华南农业大学学报, 1987, 8(2): 28–34.
- [10] LIU S M, FU C, CHEN Y S. Utilization of *Erianthus arundinaceus* progeny through backcross over the last decade at Hainan sugarcane breeding station [J]. Sugar Canes, 2007(2): 1–6, 17. doi: 10.3969/j.issn.1005-9695.2007.02.001.
- 刘少谋, 符成, 陈勇生. 近十年海南甘蔗育种场斑茅后代回交利用研究 [J]. 甘蔗糖业, 2007(2): 1–6, 17. doi: 10.3969/j.issn.1005-9695.2007.02.001.
- [11] ZHENG X F, ZHANG M Q, LI Q W, et al. Utilization and characterisation of the genuine intergeneric hybrids from the cross of *Saccharum* and *E. arundinaceum* (2): Molecular identification of genuine hybrids from the cross of *Saccharum* and *E. arundinaceum* [J]. Mol Plant Breed, 2004, 2(1): 35–42. doi: 10.3969/j.issn.1672-416X.2004.01.006.
- 郑雪芳, 张木清, 李奇伟, 等. 甘蔗斑茅的杂交利用及其杂种后代鉴定系列研究(二): 甘蔗斑茅远缘真实杂种的分子鉴定 [J]. 分子植物育种, 2004, 2(1): 35–42. doi: 10.3969/j.issn.1672-416X.2004.01.006.
- [12] The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. NY/T 1786–2009 Criterion for appraisal of sugarcane variety [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2010.
- 中华人民共和国农业部. NY/T 1786–2009 农作物品种鉴定规范 甘蔗 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [13] WANG W Z, HE H, ZHU Q Z, et al. Evaluation of some new introduced sugarcane varieties for smut resistance [J]. Chin Agric Sci Bull, 2010, 26(15): 285–288.
- 王维赞, 何红, 朱秋珍, 等. 引进甘蔗新品种对黑穗病抗性的鉴定 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(15): 285–288.
- [14] DENG H H, LIAO Z Z, LI Q W, et al. Breeding and isozyme marker assisted selection of F₂ hybrids from *Saccharum* spp. × *Erianthus arundinaceus* [J]. Sugar Canes, 2002(1): 1–5. doi: 10.3969/j.issn.1005-9695.2002.01.001.
- 邓海华, 廖兆周, 李奇伟, 等. 斑茅 F₂ 杂种选育与同工酶标记辅助选择 [J]. 甘蔗糖业, 2002(1): 1–5. doi: 10.3969/j.issn.1005-9695.2002.01.001.
- [15] GILL B S, KIMBER G. Giemsa C-banding and the evolution of wheat [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1974, 71(10): 4086–4090. doi: 10.1073/pnas.71.10.4086.
- [16] RAYBURN A L, GILL B S. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes [J]. J Hered, 1985, 76(2): 78–81. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a110049.
- [17] ZHANG M Q, CHEN R K, ZHENG X F, et al. DNA identification method for hybrid of sugarcane and *Saccharum arundinaceum*: CN, CN1566362A [P]. 2005–01–19.
- 张木清, 陈如凯, 郑雪芳, 等. 甘蔗斑茅杂种的 DNA 鉴定方法: 中国, CN1566362A [P]. 2005–01–19.
- [18] ZHENG X F. Utilization of *Saccharum* related genera *Erianthus* and identification the genuine hybrids from the cross of *Saccharum* and *Erianthus* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2004: 68.
- 郑雪芳. 甘蔗近缘属植物斑茅的利用与真实杂种鉴定研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2004: 68.
- [19] D'HONT A, RAO P S, FELDMANN P, et al. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* × *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA *in situ* hybridisation [J]. Theor Appl Genet, 1995, 91(2): 320–326. doi: 10.1007/BF00220894.
- [20] SUN K Y. Ploidy level and DNA content of *Erianthus arundinaceus* as determined by flow cytometry and the association with biological characteristics [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015: 84.
- 孙凯燕. 基于流式细胞术的斑茅倍性和 DNA 含量分析及其与生物学特征的关联研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015: 84.
- [21] McMARTIN A. Sugar-cane smut: Reappearance in Natal [J]. S Afr Sugar J, 1945, 29: 55–57.
- [22] TOM L, BRAITHWAITE K, KUNIATA L S. Incursion of sugarcane smut in commercial cane crops at Ramu, Papua New Guinea, Vol. 39 [C]. Cairns: Australian Society of Sugarcane Technologist, 2017: 377–384.
- [23] SINGH N, SOMAI B M, PILLAY D. Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivars [J]. Plant Sci, 2004, 167(5): 987–994. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.05.006.
- [24] SHEN W K, JIANG Z D, YANG Z D, et al. New resistance identification method and resistance evaluation of sugarcane varieties to smut disease [J]. J Huazhong Agric Univ, 2014, 33(2): 51–56. doi: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2014.02.005.
- 沈万宽, 姜子德, 杨湛端, 等. 甘蔗抗黑穗病的鉴定新方法及其品种抗性评价 [J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(2): 51–56. doi: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2014.02.005.
- [25] SHEN W K, YANG Z D, LIU F Y. Identification and evaluation of some sugarcane varieties or clones for smut resistance [J]. J Huazhong Agric Univ, 2014, 33(5): 40–44. doi: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2014.05.032.
- 沈万宽, 杨湛端, 刘福业. 甘蔗品种(品系)对黑穗病的抗性鉴定与评价 [J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(5): 40–44. doi: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2014.05.032.
- [26] HUO X J, LI C S, LU R S. Evaluation of several sugarcane varieties for smut resistance in Guangxi [J]. Sugar Crops China, 2013(4): 29–31. doi: 10.3969/j.issn.1007-2624.2013.04.011.

- 霍秀娟, 李朝生, 陆荣生. 广西部分甘蔗品种对黑穗病的抗性测定 [J]. 中国糖料, 2013(4): 29–31. doi: 10.3969/j.issn.1007-2624.2013.04.011.
- [27] SHEN W K, DENG H H. Analysis of results from smut resistant identification in sugarcane varieties introduced [J]. Chin Agric Sic Bull, 2011, 27(19): 234–238.
- 沈万宽, 邓海华. 引进甘蔗品种黑穗病抗性鉴定及结果分析 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(19): 234–238.
- [28] CHEN S, ZENG Z J, SHEN W K, et al. Identification and evaluation on sugarcane parents against smut [J]. Acta Agric Boreali-Sin, 2016, 31(S1): 432–437. doi: 10.7668/hbxb.2016.S1.073.
- 陈双, 曾泽鉴, 沈万宽, 等. 甘蔗亲本黑穗病抗性鉴定与评价 [J]. 华北农学报, 2016, 31(S1): 432–437. doi: 10.7668/hbxb.2016.S1.073.
- [29] LIANG S S, LUO Q, CHEN R K, et al. Advances in researches on molecular biology of viruses causing sugarcane mosaic [J]. J Plant Prot, 2017, 44(3): 363–370. doi: 10.13802/j.cnki.zwbhxb.2017.2015212.
- 梁姗姗, 罗群, 陈如凯, 等. 引起甘蔗花叶病的病原分子生物学进展 [J]. 植物保护学报, 2017, 44(3): 363–370. doi: 10.13802/j.cnki.zwbhxb.2017.2015212.
- [30] SINGH M, SINGH A, UPADHYAYA P P, et al. Transmission studies on an Indian isolate of sugarcane mosaic potyvirus [J]. Sugar Technol, 2005, 7(2/3): 32–38. doi: 10.1007/BF02942526.
- [31] VISWANATHAN R, BALAMURALIKRISHNAN M. Impact of mosaic infection on growth and yield of sugarcane [J]. Sugar Technol, 2005, 7(1): 61–65. doi: 10.1007/BF02942419.
- [32] LI W F, DING M, FANG Q, et al. Preliminary identification of sugarcane mosaic pathogen in Yunnan [J]. Sugar Crops China, 2006(2): 4–7. doi: 10.3969/j.issn.1007-2624.2006.02.002.
- 李文凤, 丁铭, 方琦, 等. 云南甘蔗花叶病原的初步鉴定 [J]. 中国糖料, 2006(2): 4–7. doi: 10.3969/j.issn.1007-2624.2006.02.002.
- [33] LI W F, WANG X Y, HUANG Y K, et al. Screening sugarcane germplasm resistant to sorghum mosaic virus [J]. Crop Prot, 2013, 43: 27–30. doi: 10.1016/j.cropro.2012.09.005.
- [34] WU J Y, LIU S M, DENG Z H, et al. Preliminary evaluation for resistance of some progenies from *Saccharum* and *Erianthus arundinaceus* [J]. J Fujian Agric For Univ (Nat Sci), 2013, 42(6): 565–569. doi: 10.13323/j.cnki.j.fafu(nat.sci.).2013.06.013.
- 吴嘉云, 刘少谋, 邓祖湖, 等. 甘蔗与斑茅若干杂交后代抗性初步评价 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2013, 42(6): 565–569. doi: 10.13323/j.cnki.j.fafu(nat.sci.).2013.06.013.
- [35] LI F S, LIN W F, HE S C. Identification of intergeneric F_1 hybrids between *S. officinarum* and *E. fulvus* [J]. Chin J Trop Crop, 2004, 25(4): 102–105. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2004.04.020.
- 李富生, 林位夫, 何顺长. 甘蔗与蔗茅属间杂交 F_1 代真实性的鉴定 [J]. 热带作物学报, 2004, 25(4): 102–105. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2004.04.020.
- [36] JANNOO N, GRIVET L, DAVID J, et al. Differential chromosome pairing affinities at meiosis in polyploid sugarcane revealed by molecular markers [J]. Heredity, 2004, 93(5): 460–467. doi: 10.1038/sj.hdy.6800524.
- [37] PIPERIDIS G, CHRISTOPHER M J, CARROLL B J, et al. Molecular contribution to selection of intergeneric hybrids between sugarcane and the wild species *Erianthus arundinaceus* [J]. Genome, 2000, 43(6): 1033–1037. doi: 10.1139/g00-059.