

果蔗脱毒种苗甘蔗花叶病、黄叶病和宿根矮化病分子检测

王凯莉, 邓权清, 窦志敏, 古筱涵, 王明强, 沈万宽*

(华南农业大学农学院, 农业部华南地区作物栽培科学观察实验站, 广州 510642)

摘要 为监测 2016—2017 年种植的果蔗脱毒种苗脱毒效果, 分别采集广州市南沙区和增城区、湛江市麻章区及华南农业大学甘蔗育种基地共 83 份果蔗脱毒种苗样本, 进行甘蔗花叶病毒(SCMV)、高粱花叶病毒(SrMV)和甘蔗黄叶病毒(SCYLV)RT-PCR 检测。结果表明 SCMV 的阳性样本数为 3 个, 阳性检出率 3.61%; SrMV 的阳性样本数为 0; SCYLV 的阳性样本数为 78 个, 阳性检出率 93.98%。采用常规 PCR 和巢式 PCR 技术对采集于广州市增城区和华南农业大学甘蔗育种基地的 30 份果蔗脱毒种苗样本进行宿根矮化病菌(Lxx)检测, 常规 PCR 检测阳性样本数为 0, 巢式 PCR 检测疑似阳性样本数为 8, 疑似阳性检出率 26.67%。本研究采用茎尖组织培养脱毒技术培育的果蔗脱毒种苗能有效脱除果蔗种苗内的 SCMV、SrMV 和 Lxx, 但 SCYLV 的脱除效果有待进一步研究。

关键词 果蔗脱毒种苗; 甘蔗花叶病; 甘蔗黄叶病; 甘蔗宿根矮化病; 分子检测

中图分类号: S 435.661 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2017321

Molecular detection of sugarcane mosaic disease, sugarcane yellow leaf disease and ratoon stunting disease in virus-free seedlings of fruit cane

WANG Kaili, DENG Quanqing, DOU Zhimin, GU Xiaohan, WANG Mingqiang, SHEN Wankuan

(College of Agriculture, South China Agricultural University, Scientific Observing and Experimental Station of Crop Cultivation in South China, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510642, China)

Abstract To survey the virus elimination effect of virus-free fruit cane seedlings, we collected 83 samples of virus-free seedling from Nansha District and Zengcheng District of Guangzhou, Mazhang District of Zhanjiang and sugarcane breeding base of South China Agricultural University (SCAU) to detect *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Sorghum mosaic virus* (SrMV) and *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) by RT-PCR in 2016—2017. The results showed that three positive samples of SCMV was found, with the positive detection rate of 3.61%. The positive sample of SrMV was not found. The number of positive samples of SCYLV was 78, and its positive detection rate was 93.98%. We also collected 30 samples of virus-free seedling from Zengcheng District of Guangzhou and sugarcane breeding base of SCAU to detect the pathogen (Lxx) caused ratoon stunting disease (RSD) based on nested PCR or conventional PCR. The results showed that conventional PCR failed to detect the positive samples, but nested PCR found 8 suspected positive samples, with the suspected positive detection rate of 26.67%. In this study, the virus-free seedlings developed by techniques of shoot apical meristem culture can effectively remove SCMV, SrMV and Lxx in the fruit cane seedlings, but the removal effect of SCYLV needs further study.

Key words virus-free seedling of fruit cane; sugarcane mosaic disease; sugarcane yellow leaf disease; ratoon stunting disease; molecular detection

果蔗是我国南方优势特色经济作物, 广东是我国主要果蔗产区, 生产基地主要分布在广州、湛江、江门、清远、韶关等地区。2012 年广东省果蔗种植

面积达 1.99 万 hm^2 , 总产量 189.91 万 t, 占全省当年甘蔗(含糖蔗)总种植面积的 12.03% 和总蔗茎产量的 12.93%^[1]。果蔗生产投入高于糖蔗, 但平均

收稿日期: 2017-08-25

修订日期: 2017-11-09

基金项目: 广州市科技计划项目(201604020087); 广东省现代农业产业技术推广体系(2017LM4166)

* 通信作者 E-mail: wkshen@scau.edu.cn

单产也明显高于糖蔗,蔗茎产量可达到 120~150 t/hm²,经济效益较好^[2]。我国种植的果蔗品种主要以黑皮果蔗‘Badila’为主,蔗汁味道清甜可口,具有丰富的营养价值和药用价值,深受广大消费者喜爱。但由于果蔗品种单一,多年无性繁殖,易受甘蔗花叶病 sugarcane mosaic disease (SMD)、甘蔗黄叶病 sugarcane yellow leaf disease (SYLD)和宿根矮化病 ratoon stunting disease (RSD)等种苗传播病害的危害^[3-5],造成植株变矮,品质变差,产量降低等严重问题。甘蔗花叶病主要由甘蔗花叶病毒 *Sugarcane mosaic virus* (SCMV)和高粱花叶病毒 *Sorghum mosaic virus* (SrMV)引起^[6]。甘蔗黄叶病病原为甘蔗黄叶病毒 *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV)^[7]。甘蔗宿根矮化病由木质部限制性病原菌 *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*(Lxx)引起,是甘蔗主要的细菌病害之一^[8]。

近年来,甘蔗花叶病在广西、云南等果蔗产区普遍发生,其中主栽品种‘黑皮果蔗’发病率高达 100%,产量下降 12.3%~33.5%,糖分下降 6%~14%^[9-11]。甘蔗黄叶病于 2003 年首次在广西南宁的果蔗上发现^[12],之后李海明等^[13]、周国辉等^[14]调查发现福建、广西、广东和海南等果蔗主产区普遍存在果蔗被 SCYLV 侵染的情况。本实验室于 2016 年对采集于广东蔗区的 106 份果蔗样本进行了 SCMV、SrMV 和 SCYLV 检测,发现 SCMV、SrMV 和 SCYLV 的阳性检出率分别为 98.1%、97.2% 和 95.3%。在我国果蔗生产区,甘蔗宿根矮化病的发生也十分严重。吴夏明等^[15]对 6 个果蔗品种进行了 Lxx 检测,结果表明,‘广东黄皮’感染率为 75%,‘云南红皮’、‘黔蔗 08-688’、‘黔糖 3 号’和‘Badila’检出率均为 100%。杨湛端等^[16]对广州番禺 120 个果蔗样本进行了调查,表明‘黑皮果蔗’的 Lxx 检出率为 93%,‘广东黄皮’的 Lxx 检出率为 95%。

脱毒种苗是防治上述种传病害的主要措施,李松等^[17]报道甘蔗茎尖脱毒苗,甘蔗花叶病病原去除率为 75%,甘蔗宿根矮化病菌去除率为 70%。1991 年我国台湾糖业研究所开始利用组织培养脱毒技术进行果蔗脱毒种苗的研究,但主要集中在脱毒种苗的培养及田间生长试验^[18],而对田间种植的果蔗脱毒种苗目的病害的跟踪检测却鲜有报道,

因此,难以评估脱毒种苗对各种目标病害的脱除效果。近年来,本课题组利用茎尖组织培养技术(经检测原果蔗植株带有甘蔗花叶病、甘蔗黄叶病、宿根矮化病)培育了一批果蔗脱毒种苗,并在广东蔗区建立苗圃扩繁。为了监测这批果蔗脱毒种苗的脱毒效果,我们跟踪取样并对主要目标病害(花叶病、黄叶病、宿根矮化病)进行分子检测,为客观评价该批果蔗脱毒种苗的脱毒效果及脱毒技术提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2017 年 3 月—6 月分别在广东湛江假植苗圃、增城一级苗圃、南沙二级苗圃和广州华南农业大学甘蔗育种基地一级苗圃随机采集果蔗脱毒种苗新叶下第一片叶,共 83 份样本,放于-80℃储存,用于甘蔗花叶病和黄叶病检测。

2017 年 5 月在广东增城一级苗圃和广州华南农业大学甘蔗育种基地一级苗圃随机选取 10 个月株龄果蔗脱毒种苗主茎 30 份样本,参照沈万宽等^[19]的方法提取样品蔗汁放于-80℃储存,用于甘蔗宿根矮化病检测。

1.2 总 RNA 和 DNA 的提取

参照 Xie 等^[20]的方法,用改进的 CTAB 法提取蔗叶总 RNA。参照沈万宽等^[19]的方法,用 CTAB 法提取蔗汁总 DNA。

1.3 甘蔗花叶病和黄叶病的 RT-PCR 检测

采用 Xu 等^[21]和许东林等^[22]报道的 SCMV、SrMV 和 SCYLV 特异性引物(表 1),委托上海生工生物工程有限公司合成。以提取的蔗叶总 RNA 为模板,使用南京 Vazyme 生物有限公司的 HiScript II One Step RT-PCR Kit 进行 RT-PCR 扩增。扩增体系为 25.0 μL:2×One Step Mix 12.5 μL,上下游引物(5 μmol/L)各 1.0 μL,Enzyme Mix 1.0 μL,模板 1.5 μL,加 RNase-free ultra pure H₂O 至 25.0 μL。扩增程序为:50℃反转录 30 min;94℃预变性 2 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,35 个循环;最后 72℃延伸 5 min。反应程序结束后,扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,在 Tanon-1600 凝胶成像系统中观察结果并拍照保存。

表 1 SCMV、SrMV 和 SCYLV 检测所用引物序列

Table 1 Primer sequences used for detection of SCMV, SrMV and SCYLV in this study

病毒名称 Virus	引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence	扩增片段大小/bp Amplified fragment size
甘蔗花叶病毒 SCMV	SCMV-F	GAAGAWGTYTTCCAYCAAKCWGGAAC	906
	SCMV-R	AGCTGTGTGTCTCTCTGTATTCTC	
高粱花叶病毒 SrMV	SrMV-F	ACAGCAGAWGCAACRGCACAAGC	860
	SrMV-R	CTCWCCGACATTCCCATCCAAGCC	
甘蔗黄叶病毒 SCYLV	SCYLV-F	AATCAGTGCACACATCCGAG	634
	SCYLV-R	GGAGCGTCGCCTACCTATT	

1.4 甘蔗宿根矮化病菌的 PCR 检测

1.4.1 常规 PCR 检测

采用 Pan 等^[23]报道的甘蔗宿根矮化病菌特异性引物 Lxx1: 5'-CCGAAGTGAGCAGATTGACC-3' 和 Lxx2: 5'-ACCCTGTGTTGTTTTCAACG-3' 进行 PCR 扩增。引物委托上海生工生物工程有限公司合成。预期扩增产物长度为 438 bp。以蔗汁总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系 20.0 μL:模板 1.0 μL, 10× Buffer(含 Mg²⁺) 2.0 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.6 μL, 引物 Lxx1/Lxx2(5 μmol/L) 各 1.0 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL, 用超纯 H₂O 补足至 20.0 μL。扩增程序为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 进行 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 反应结束后, 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 在 Tanon-1600 凝胶成像系统中观察结果并拍照保存。

1.4.2 巢式 PCR 检测

参照沈万宽等^[24]的方法。第一轮扩增采用细菌 ITS 通用引物 ITS1: 5'-AGTCGTAACAAGG-TAGCCGT-3' 和 ITS2: 5'-GTGCCAAGGCATC-CACC-3' 进行 PCR 扩增。引物委托上海生工生物工程有限公司合成, 反应体系及扩增程序同 1.4.1,

其中退火温度为 56℃, 循环 30 次。以第一轮扩增产物为模版, 采用宿根矮化病菌特异性引物 Lxx1/Lxx2 进行第二轮 PCR 扩增, 反应体系及扩增程序均同 1.4.1。反应结束后, 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 在 Tanon-1600 凝胶成像系统中观察结果并拍照保存。

1.5 序列测定与分析

RT-PCR 和 PCR 产物核苷酸序列委托上海生工生物工程有限公司测定, 一致性比较在 NCBI 数据库中通过 BLAST 程序进行, 应用 DNASTar V 7.1 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 甘蔗花叶病和甘蔗黄叶病 RT-PCR 检测结果

采用 SCMV、SrMV 和 SCYLV 的特异引物对 83 份果蔗脱毒种苗样本进行 SCMV、SrMV 和 SCYLV 的 RT-PCR 检测。结果表明, SCMV 的阳性样本数为 3 个, 阳性检出率为 3.61%, 且 3 个阳性样本均来自广州市南沙区的二级苗圃, 其他苗圃均未检出阳性样本。SCYLV 的阳性样本数为 78 个, 阳性检出率为 93.98%。本批样本中未检测出 SrMV 阳性样本(表 2, 图 1)。

表 2 83 份果蔗脱毒种苗 SCMV、SrMV 和 SCYLV 的 RT-PCR 检测结果

Table 2 Detection results of SCMV, SrMV and SCYLV from 83 samples of virus-free fruit cane seedlings by RT-PCR

来源 Source	种苗类型 Seedling type	阳性检出率/% Positive rate		
		甘蔗花叶病毒 SCMV	高粱花叶病毒 SrMV	甘蔗黄叶病毒 SCYLV
广州市南沙区 Nansha, Guangzhou	二级苗圃	18.75(3/16)	0(0/16)	93.75(15/16)
广州市增城区 Zengcheng, Guangzhou	一级苗圃	0(0/32)	0(0/32)	96.88(31/32)
广州市华南农业大学 SCAU, Guangzhou	一级苗圃	0(0/15)	0(0/15)	80.0(12/15)
广东湛江 Zhanjiang, Guangdong	假植苗圃	0(0/20)	0(0/20)	100(20/20)
合计 Total	—	3.61(3/83)	0(0/83)	93.98(78/83)

选取的代表性阳性样本经测序及比对, 采自广州市南沙区的‘黑皮果蔗’2 号样本的 SCMV 扩增产物核苷酸序列(MF957202)与 GenBank 中已报道的

中国广东(EF419174)、云南(FM997890)和阿根廷(EU196448)的 SCMV 株系或分离物相应区域核苷酸序列一致性高达 97%~99%, 确认该产物为 SC-

MV 核苷酸片段。广州市南沙区的‘黑皮果蔗’1 号样本扩增出的 SCYLV 核苷酸序列(MF957203)与 GenBank 中已报道的来自印度(KF680098)、哥伦比

亚(AF369928)的 SCYLV 分离物相应区域核苷酸序列有 99% 的一致性,由此证实该产物为 SCYLV 核苷酸片段。

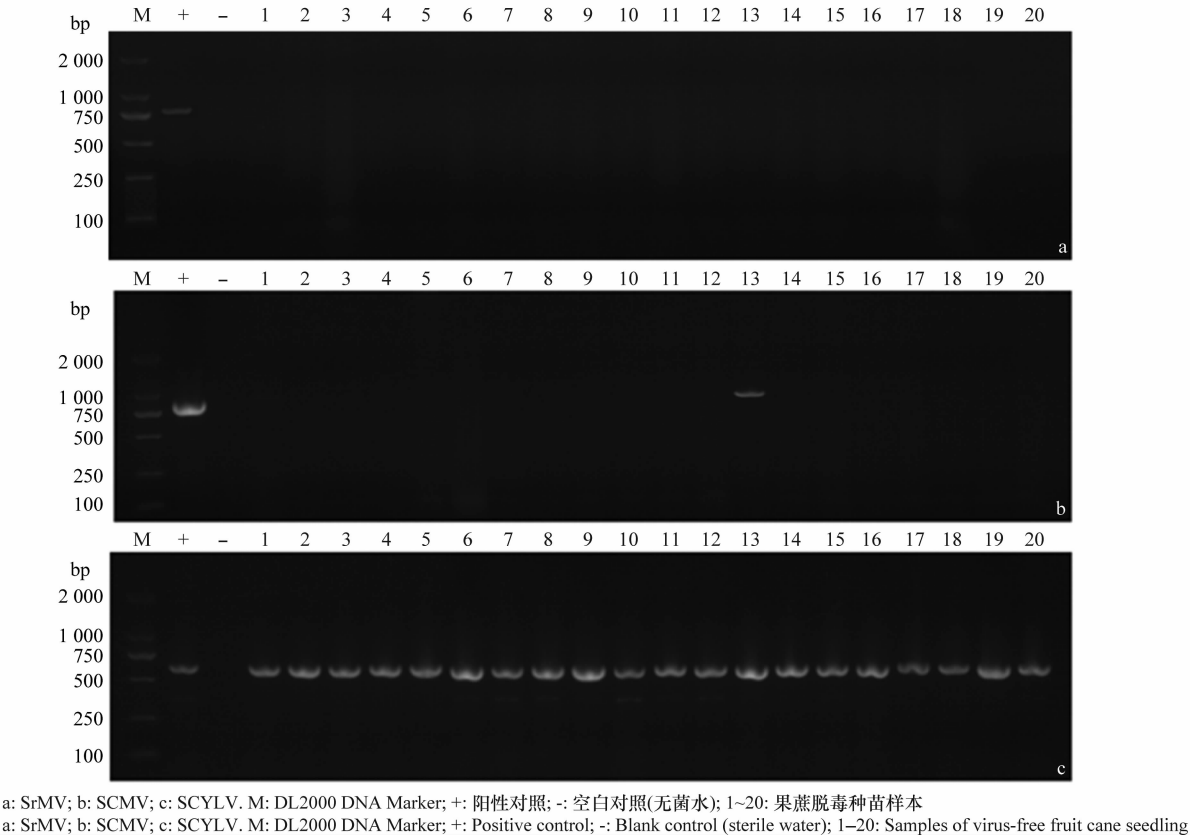


图 1 部分果蔗脱毒种苗病毒检测结果

Fig. 1 Detection results of virus from some virus-free seedlings of fruit cane

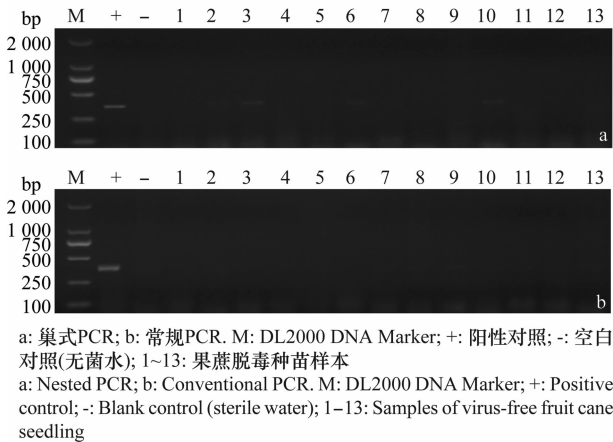


图 2 部分果蔗脱毒种苗样本宿根矮化病菌巢式 PCR 与常规 PCR 检测结果

Fig. 2 Detection results of Lxx from some virus-free seedlings of fruit cane by nested PCR or conventional PCR

2.2 甘蔗宿根矮化病 PCR 检测结果

采用引物 Lxx1/Lxx2 对 30 份果蔗脱毒种苗样

本进行常规 PCR 检测,产物电泳未检测到目的条带。采用引物 ITS1/ITS2 和 Lxx1/Lxx2 对 30 份果蔗脱毒种苗进行巢式 PCR 检测,除了阳性对照外,有 8 个样本出现与预期目的片段大小一致的条带(条带极弱,约 438 bp),且空白对照(无菌水)未出现条带(图 2)。由于目的条带极弱,测序未成功,故将检测出的 8 个样本定为疑似宿根矮化病阳性样本,RSD 疑似样本阳性检出率为 26.67% (表 3)。

表 3 30 份果蔗脱毒种苗甘蔗宿根矮化病菌 PCR 检测结果

Table 3 Detection results of Lxx from 30 samples of virus-free fruit cane seedlings by PCR and nested PCR

来源 Source	种苗类型 Seedling type	阳性检出率/% Positive rate	
		常规 PCR Conventional PCR	巢式 PCR Nested PCR
广州市华南农业大学 SCAU, Guangzhou	一级 苗圃	0(0/15)	20(3/15)
广州市增城区 Zengcheng, Guangzhou	一级 苗圃	0(0/15)	33.33(5/15)
合计 Total	—	0(0/30)	26.67(8/30)

3 讨论

世界上已报道的甘蔗花叶病病原有 SCMV、SrMV、SCSMV(甘蔗线条花叶病毒)、MDMV(玉米矮花叶病毒)、JGMV(约翰逊草花叶病毒)和 ZeMV(玉米花叶病毒)^[25],但引起我国蔗区甘蔗花叶病的病原主要为 SCMV、SrMV 和 SCSMV,且引起糖蔗和果蔗的花叶病优势病原有所差异,糖蔗上花叶病的优势病毒为 SrMV 和 SCSMV^[6, 26-28],而果蔗上花叶病的优势病毒为 SCMV^[29-30],即糖蔗和果蔗进行花叶病病原脱除时目的病原不同。本研究对 83 份果蔗脱毒种苗进行 SCMV、SrMV 检测,SCMV 阳性检出率为 3.61%(3/83),SrMV 未检出阳性样品,且 3 个 SCMV 阳性样本均采自广州市南沙区的二级苗圃,其他采样点均未检测出阳性样品。这 3 个阳性样本所携带的 SCMV 极有可能是外源病毒通过蔗刀或蚜虫传播至脱毒种苗,种苗自身携带 SCMV 的可能性较小。由此说明本批采用茎尖组织培养脱毒技术培育的果蔗脱毒种苗对果蔗种苗内的 SCMV、SrMV 的脱除是有效的。

本研究中,SCYLV 阳性样本检出率高达 93.98%(78/83),且假植苗圃、一级苗圃、二级苗圃阳性检出率均较高。相关研究表明,植物病毒基因能够整合入寄主植物基因组中,如 Bennetzen^[31]指出反转录功能蛋白可以把 RNA 反转录为 DNA,从而使 PRVs(植物拟逆转录病毒)整合入寄主植物基因组中。且当 PRVs 基因片段侵入含有反式激活蛋白转基因的植物,此病毒可以利用基因产物来完成侵染循环^[32]。由于 SCYLV 与甘蔗杆状病毒 *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV)的寄主均为甘蔗,因此怀疑 SCYLV 是否同 SCBV 一样,能将 SCYLV 全部或部分基因组整合入甘蔗基因组内,和甘蔗基因组同步进行复制表达,并且利用这种方式进行侵染。如果推断成立,则 SCYLV 是无法应用植物组织培养技术脱除的。另外,Mishra 等^[33]研究表明,当以 1.5 mm 以下甘蔗茎尖分生组织作为外植体进行组织培养时,能有效脱除 SCYLV,而当以超过 1.5 mm 茎尖分生组织作外植体时,所获得的甘蔗组培苗不能有效脱除 SCYLV。本研究也有可能在甘蔗组织培养时,所取外植体茎尖分生组织过大,造成不能有效脱除 SCYLV。建议今后进行果蔗组培脱毒时,所取外植体不超过 1.5 mm。

甘蔗宿根矮化病菌 Lxx 寄生于甘蔗木质部维管束中,成熟蔗茎的木质部维管束发达,Lxx 含量较高,而幼嫩的茎尖分生组织木质部尚未分化形成或极不发达,因此,Lxx 不存在或含量极低^[34]。选取较小的甘蔗茎尖分生组织作为外植体较易脱除甘蔗宿根矮化病菌(Lxx)。本研究采用常规 PCP 方法未检测出 Lxx 阳性样本,而应用较常规 PCR 检测灵敏度大幅度提高的巢式 PCR 技术^[35-36],也仅检测出 8 个样本有疑似目的条带(测序未成功),假如这 8 个均为 Lxx 阳性样品,其携带的 Lxx 的含量也是极低的。可见本批采用茎尖组织培养脱毒技术培育的果蔗脱毒苗对种苗内的 Lxx 的脱除是有效的。

参考文献

- [1] 广东省统计局. 广东农村统计年鉴[M]. 北京:中国统计出版社,2014.
- [2] 王继华,曹干,张剑亮,等. 我国果蔗产业的现状与可持续发展[J]. 甘蔗糖业,2013(5):56-61.
- [3] SEIFERS D L, SALOMON R, MARIE-JEANNE V, et al. Characterization of a novel potyvirus isolated from maize in Israel [J]. Phytopathology, 2000, 90(5):505-513.
- [4] HEMA M, JOSEPH J, GOPINATH K, et al. Molecular characterization and interval relationships of a flexuous filamentous virus causing mosaic disease of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) in India [J]. Archives of Virology, 1999, 144(3):479-490.
- [5] MAYO M A. Changes to virus taxonomy 2004 [J]. Archives of Virology, 2005, 150(1):189-198.
- [6] 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.
- [7] 许东林,李俊光,周国辉. 广东甘蔗黄叶病田间调查及病原病毒的分子检测[J]. 植物病理学报,2006,36(5):404-406.
- [8] KAO J, DAMANN K E J. In situ localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane [J]. Canadian Journal of Botany, 1980, 58(3):310-315.
- [9] 徐金龙. 果蔗病害及其防治[J]. 中国果业信息,2001(11):34.
- [10] 王伦旺,谭裕模,贤武,等. 健康种苗技术在果蔗优质高产栽培中的应用[J]. 广西农业科学,2005,36(6):572-574.
- [11] 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.
- [12] 许东林,周国辉,任小平,等. 广东甘蔗引种基地甘蔗黄叶病毒分子鉴定[J]. 植物病理学报,2005,35(5):466-468.
- [13] 李海明,张树河,吴松海,等. 侵染果蔗的甘蔗黄叶病毒 RT-PCR 检测鉴定[J]. 福建农业学报,2012(8):831-834.
- [14] 周国辉,许东林,蔡艳清,等. 我国南方甘蔗病毒种类初步鉴定[J]. 广西农业生物科学,2006,25(3):226-228.

- Dichrocrocis punctiferalis* Guenée [J]. Bioinfolet, 2015, 12 (1c):244–246.
- [6] 姜海平,张勤. 桃蛀螟严重为害杂交油菜[J]. 植保技术与推广, 1998,18(6):41.
- [7] 周洪旭,陈荃,乔晓明,等. 桃蛀螟越冬幼虫重量、死亡和羽化的调查研究[J]. 莱阳农学院学报,2004,21(4):275–277.
- [8] 王振营,何康来,石洁,等. 桃蛀螟在玉米上危害加重原因与控制对策[J]. 植物保护,2006,32(2):67–69.
- [9] 吴立民,陆化森. 桃蛀螟为害玉米部位的观察[J]. 昆虫知识, 1992,29(1):13.
- [10] 杨硕,石洁,张海剑,等. 桃蛀螟为害夏玉米果穗对产量的影响[J]. 植物保护学报,2015,42(6):991–996.
- [11] 陈浩,赵文路,门兴元,等. 玉米灌浆期3种鳞翅目害虫的空间分布[J]. 玉米科学,2016,24(1):160–165.
- [12] 刘玥,李荣荣,何康来,等. 桃蛀螟为害对春玉米镰孢穗腐病发生及产量损失的影响[J]. 昆虫学报,2017,60(5):576–581.
- [13] 陈立玲,张庆贺,薛争,等. 吉林省玉米螟生物防治现状与展望[J]. 中国生物防治学报,2015,31(4):561–567.
- [14] 艾鹏鹏,杨瑞,张民照,等. 桃蛀螟各虫态形态学特征观察[J]. (上接167页)
- [15] 吴夏明,沈万宽,罗明珠,等. 新引进果蔗品种宿根矮化病菌检测[J]. 西南农业学报,2016,29(5):1046–1051.
- [16] 杨湛端,刘睿,沈万宽,等. 番禺果蔗宿根矮化病调查及分析[J]. 广东农业科学,2012,39(9):75–76.
- [17] 李松,余坤兴,刘丽敏,等. 甘蔗茎尖胚状体脱毒苗快繁技术研究[J]. 江苏农业科学,2011,39(2):83–87.
- [18] 韦文科. 台湾“红甘蔗健康种苗”简介[J]. 中国果菜,2000(3):33.
- [19] 沈万宽,周国辉,邓海华,等. 甘蔗宿根矮化病菌PCR检测及目的片段核苷酸序列分析[J]. 中国农学通报,2006,22(12):413–416.
- [20] XIE Yujia, WANG Mingqiang, XU Donglin, et al. Simultaneous detection and identification of four sugarcane viruses by one-step RT-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2009, 162 (1):64–68.
- [21] XU D L, PARK J W, MIRKOV T E, et al. Viruses causing mosaic disease in sugarcane and their genetic diversity in southern China [J]. Archives of Virology, 2008, 153(6):1031–1039.
- [22] 许东林,周国辉,任小平,等. 广东甘蔗引种基地甘蔗黄叶病毒分子鉴定[J]. 植物病理学报,2005,35(5):466–468.
- [23] PAN Y B, GRISHAM M P, BURNER D M, et al. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease [J]. Plant Disease, 1998, 82(3):285–290.
- [24] 沈万宽,刘睿,邓海华. 甘蔗宿根矮化病菌巢式PCR检测[J]. 植物保护学报,2012,39(6):508–512.
- [25] 王文治,马滋蔓,张树珍,等. 甘蔗花叶病的基因工程研究[J]. 生物技术通报,2009(1):22–26.
- [26] 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):362–366.
- 北京农学院学报,2014,29(3):53–55.
- [15] DUY L, ZHANG J X, YAN Z G, et al. Host preference and performance of the yellow peach moth (*Conogethes punctiferalis*) on chestnut cultivars [J]. PLoS ONE,2016,11(6):e0157609.
- [16] 陈丽丽,顾桂香,何玲玲,等. 扬州地区棉蚜卵的发育动态及早春棉蚜的扩散[J]. 植物保护,2015,41(4):184–185.
- [17] 羌烨,朱明华. 绿盲蝽卵发育分级标准及其在测报中的应用[J]. 植物保护,2014,41(1):125–127.
- [18] 金银利,封洪强,陈培育,等. 河南葡萄绿盲蝽越冬种群发生为害规律[J]. 植物保护,2015,41(5):179–182.
- [19] 李文静,苑鹤,陆宴辉,等. 中黑盲蝽对四季豆豆荚和棉铃虫卵的取食选择性[J]. 植物保护,2015,41(4):29–34.
- [20] 林兆里,徐金汉,许莉萍. 甘蔗条螟卵空间分布型及其抽样技术[J]. 植物保护,2012,38(3):59–62.
- [21] 王振营,王晓鸣,石洁. 桃蛀螟玉米病虫害[M]//郭予元. 中国农作物病虫害(第三版)上册,北京:中国农业出版社,2015:708.
- [22] 吴立民,陆化森. 玉米田桃蛀螟发生规律的研究[J]. 昆虫知识, 1995,32(4):207–210.
- (责任编辑:杨明丽)
- [27] 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.
- [28] HE Zhen, LI Wenfeng, 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]. Archives of Virology, 2014, 159(5):1149–1154.
- [29] 秦碧霞,蔡健和,莫磊兴,等. 黑皮果蔗花叶病原鉴定[J]. 广西农业科学,2010,41(3):223–225.
- [30] 周国辉,许东林,蔡艳清,等. 我国南方甘蔗病毒种类初步鉴定[J]. 广西农业生物科学,2006,25(3):226–228.
- [31] BENNETZEN J L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution [J]. Plant Molecular Biology, 2000, 42(1):251.
- [32] KIRALY L, BOURQUE J E, SCHOELZ J E. Temporal and spatial appearance of recombinant viruses formed between *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) and CaMV sequences present in transgenic *Nicotiana bigelovii* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 11(4):309–316.
- [33] MISHRA S, RAO G P. 采用分生组织培养生脱甘蔗黄叶病毒苗(英文)[J]. 南方农业学报,2011,42(1):1–5.
- [34] 沈万宽,周国辉,邓海华. 甘蔗宿根矮化病研究综述[J]. 中国糖料,2007(1):50–53.
- [35] LIU Jun'ang, HE Li, ZHOU Guoying. Specific and rapid detection of *Camellia oleifera* anthracnose pathogen by nested-PCR [J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 8(6):1056–1061.
- [36] 李本金,刘裴清,刘小丽,等. 荔枝霜疫霉巢式PCR和LAMP检测方法的建立[J]. 农业生物技术学报,2016,24(6):919–927.
- (责任编辑:杨明丽)