

云南甘蔗宿根矮化病病原检测*

黄应昆¹,李文凤¹,赵俊¹,饶云²,卢文洁¹,李俊¹,罗志明¹,杨洪昌¹

(1. 云南省农业科学院甘蔗研究所,云南开远 661600; 2. 云南省新平县农业局,云南新平 653400)

摘要: 利用从澳大利亚引进的甘蔗宿根矮化病病原(RSD)的标准抗原抗体,建立了I-ELISA检测甘蔗宿根矮化病的方法。采用电镜负染法和I-ELISA法,对采自云南红河、开远、新平蔗区的42个样本进行RSD检测,结果表明:29个样本为阳性,13个样本为阴性,确认云南蔗区存在RSD。

关键词: 云南; 甘蔗宿根矮化病; 发生; 检测

中图分类号: S 435.661 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2007)05-0762-04

Primary Pathogen Detection of Sugarcane Ratoon Stunting Disease in Yunnan

HUANG Ying-kun¹, LI Wen-feng¹, ZHAO Jun¹, RAO Yun², LU Wen-jie¹,

LI Jun¹, LUO Zhi-ming¹, YANG Hong-chang¹

(1. Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Science, Kaiyuan 661600, China;

2. Agricultural Bureau of Xinning county, Yunnan Province Xinning 653400, China)

Abstract: The mean of I-ELISA of detecting pathogen of RSD is established based on standard antigen and antibody from Australia. 42 samples from Honghe, Kaiyuan and Xinning were detected by means of negative staining of electron microscope and I-ELISA. The results indicated that 29 samples are positive and 13 samples are negative, so as to prove that RSD occur in Yunnan.

Key words: Yunnan; sugarcane ratoon stunting disease; occurrence; detection

甘蔗宿根矮化病(ratoon stunting disease, RSD)是普遍存在于所有植蔗地区的一种世界性的重要病害。自1944~1945年在澳大利亚昆士兰首次发现以来,已有美国、南非、毛里求斯、印度、巴西等47个国家和地区报道了该病的发生,遍布世界各蔗区^[1,2]。我国台湾省于1945年最先报道此病的发生,在大陆1986确诊存在RSD,之后广东、福建、广西曾对全省蔗区进行普查,结果表明均存在RSD^[3-5]。此病由一种棒杆菌属细菌(*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*)寄生于蔗株的维管束中引起,主要通过带病蔗种和收获、砍种刀具等传播蔓延,且传播性极强,病蔗的蔗汁稀释至10 000倍仍具有感染力^[1~3,5]。蔗株染病后变矮,蔗茎变细,生长迟

滞,宿根发株少,在干旱地区和种植感病品种的蔗区所造成的损失尤其重要,病害造成损失的程度随宿根年数的增加而增加,一般减产10%~30%,干旱缺水时可达60%以上,还可导致品种退化^[2]。由于RSD无明显的外部 and 内部症状,病原菌难以分离、培养和检测,传统诊断方法极其困难,导致病害任意传播、扩展蔓延,对甘蔗生产危害极大。为弄清云南蔗区是否存在RSD,笔者于2004~2006年先后对云南红河、开远、新平蔗区进行田间采样,通过实验室利用电镜负染法和I-ELISA法等检测技术进行RSD检测,结果证实云南蔗区存在RSD,现将结果报道如下。

收稿日期:2006-10-17

修回日期:2006-12-19

* 基金项目:国家“948”项目(2003-Q06);云南省重大农业推广项目(2005)。

作者简介:黄应昆(1964-),男,云南建水人,研究员,主要从事甘蔗病虫害研究。E-mail:huangyk64@163.com

1 材料与方 法

1.1 供试试剂

RSD 抗血清和阳性对照由澳大利亚甘蔗试验总局(BSES)提供。

1.2 样品采集

于2004年1月、2005年3月及10月、2006年2月甘蔗成熟期,先后从云南省红河、开远、新平蔗区田间采样,3年4批共42个样本。采样选择具有代表性的主栽品种、旱地蔗,根据品种、植期分类,随机取样。每个样本取5~6条蔗茎,每条蔗茎截取中下部茎节,用砍刀切成15cm左右长(每取一个样品后均用70%的酒精消毒砍刀),再用打气泵吹2mL左右的甘蔗汁于2mL离心管内,置于冰上,带回室内放于4℃和-18℃冰箱保存待用。

1.3 检测方法

1.3.1 电镜负染检测

吸约200μL待测蔗汁点于疏水膜上,把制备好的铜网膜面朝下覆于待测样上吸附5min,用镊子取出,余液用滤纸沿边缘吸去,背面置滤纸上晾1min;将2%钨酸铵(pH 6.4)滴于疏水膜上,把已晾干的铜网样品面朝下覆于染液上,染色3min,用镊子取出,背面置滤纸上晾干10min,用JEM100CX-Ⅱ型透射电子显微镜检测甘蔗宿根矮化病病原。

1.3.2 I-ELISA 检测

(1)样品制备:取待测蔗汁于旋涡混合器震荡混匀后13000r/min离心3min,弃上清;沉淀加1000μL包被缓冲液,旋涡混合器震荡混匀后13000r/min离心3min,弃上清;沉淀再加1000μL包被缓冲液,旋涡混合器震荡混匀后13000r/min离心3min,弃上清;沉淀加300μL包被缓冲液稀释混匀。

(2)检测程序:分别将上述制备好的包被缓冲液稀释混匀的样液加入ELISA酶标板反应孔,每孔100μL,同时设阳性对照(1:50包被缓冲液稀释)、阴性对照(用健康蔗汁制备)和空白对照(用PBST),每个样品2重复(2孔),盖上盖子,37℃恒温培养过夜;用含0.05%吐温的磷酸盐缓冲液(PBST)慢洗2次,每次5min,拍干;每孔加200μL 5%的脱脂奶粉(PBST稀释),室温封闭30min, PBST同上慢洗1次,拍干;每孔加100μL RSD抗血清(用含2.5%脱脂奶粉的PBST以1:1000稀

释),室温孵育1.5h, PBST同上慢洗1次,拍干;每孔加100μL碱性磷酸酶标记的羊抗兔酶标抗体(用含2.5%脱脂奶粉的PBST以1:10000稀释),室温孵育1.5h, PBST同上慢洗5次,拍干;用10%乙二醇胺溶解硝基苯磷酸盐(1mg/mL),加入酶标板,每孔100μL,室温下充分显色。

(3)结果及判别:在BIO-RAD Model 550型酶标仪405nm波长下分别读取每个样品0h和充分显色后的OD值。每个样品充分显色后的OD值减去0h OD值的差大于0.15为阳性,小于0.05为阴性,在0.05~0.15之间为可疑。

2 结果与分析

2.1 电镜负染检测

从电子显微镜检测结果看,H1,H2,H4,H6,H9,H10,K1,K2,K3,K4,K5,K6,K7,K10,K12,K13,K14,K16,K17,X1,X2,X3,X5,X8,X9,X10,X11,X13,X14等共29个样品含有具有典型宿根矮化病病原菌典型形态的杆棒状细菌(图1),其中以K6,K10,K14,X11,X14等5个样品含菌量最多。根据电镜检测的灵敏度及分离物形态,确定H1,H2,H4,H6,H9,H10,K1,K2,K3,K4,K5,K6,K7,K10,K12,K13,K14,K16,K17,X1,X2,X3,X5,X8,X9,X10,X11,X13,X14等共29个样品中含有宿根矮化病病原。



图1 电子显微镜下的RSD病原菌形态, ×20 000
Fig. 1 Transmission electron micrograph of pathogen of RSD, ×20 000

2.2 ELISA 检测

甘蔗宿根矮化病(RSD)的I-ELISA检测结果见表1。根据1.3.2所述结果判别标准,在检测的33个样品中:K6,K10,K14,X11,X14等5个样品充分显色后的OD值减去0小时OD值的差大于0.6,

为强阳性, H1, H2, H4, H6, K7, K12, K13, K16, K17, X1, X2, X3, X5, X8, X9, X10, X13 等 17 个样品充分显色后的 OD 值减去 0 h OD 值的差在 0.15~0.2 之

间, 为阳性, H3, H5, K8, K9, K11, K15, X4, X6, X7, X12, X15 等 11 个样品充分显色后的 OD 值减去 0 h OD 值的差小于 0.05, 为阴性。

表 1 甘蔗宿根矮化病(RSD)的 I-ELISA 及 EM 检测结果

Tab. 1 I-ELISA and EM detection of RSD

样品编号 number	品种名称 varieties	采集地点 site of sample	种植年限 plant fixed number of years	I-ELISA	EM
H1	选 3(Triton)	云南红河(Honghe)	2	+	+
H2	闽糖 69-421(MT69-421)	云南红河(Honghe)	3	+	+
H3	新台糖 10 号(Roc10)	云南红河(Honghe)	2	-	-
H4	桂糖 11 号(GT11)	云南红河(Honghe)	3	+	+
H5	选 3(selection3)	云南红河(Honghe)	3	-	-
H6	云蔗 89-151(YZ89-151)	云南红河(Honghe)	3	+	+
H7	桂糖 11 号(GT11)	云南红河(Honghe)	4	×	-
H8	桂糖 11 号(GT11)	云南红河(Honghe)	7	×	-
H9	云蔗 89-151(YZ89-151)	云南红河(Honghe)	4	×	+
H10	闽糖 69-421(MT69-421)	云南红河(Honghe)	4	×	+
K1	云 00-506(Y00-506)	云南开远(Kaiyuan)	1	×	+
K2	云蔗 89-151(YZ89-151)	云南开远(Kaiyuan)	1	×	+
K3	新台糖 25 号(Roc25)	云南开远(Kaiyuan)	1	×	+
K4	云 99-5(Y99-5)	云南开远(Kaiyuan)	1	×	+
K5	CP70-1133	云南开远(Kaiyuan)	1	×	+
K6	粤糖 81-3254(YT81-3254)	云南开远(Kaiyuan)	2	++	+++
K7	粤农 83-511(YN83-511)	云南开远(Kaiyuan)	2	+	+
K8	闽糖 77-208(MT77-208)	云南开远(Kaiyuan)	2	-	-
K9	闽糖 70-611(MT70-611)	云南开远(Kaiyuan)	2	-	-
K10	云蔗 75-644(YZ75-644)	云南开远(Kaiyuan)	2	++	+++
K11	云蔗 81-173(YZ81-173)	云南开远(Kaiyuan)	2	-	-
K12	粤糖 59-264(YT59-264)	云南开远(Kaiyuan)	2	+	+
K13	粤农 81-762(YN81-762)	云南开远(Kaiyuan)	2	+	+
K14	桂糖 69-360(GT69-360)	云南开远(Kaiyuan)	2	++	+++
K15	桂糖 69-156(GT69-156)	云南开远(Kaiyuan)	2	-	-
K16	川糖 66-64(CT66-64)	云南开远(Kaiyuan)	2	+	+
K17	川糖 66-196(CT66-196)	云南开远(Kaiyuan)	2	+	+
X1	闽糖 69-421(MT69-421)	云南新平(Xinping)	2	+	+
X2	新台糖 10 号(Roc10)	云南新平(Xinping)	2	+	+
X3	新台糖 10 号(Roc10)	云南新平(Xinping)	2	+	+
X4	新台糖 25 号(Roc25)	云南新平(Xinping)	3	-	-
X5	粤糖 93-159(YT93-159)	云南新平(Xinping)	1	+	+
X6	闽糖 69-421(MT69-421)	云南新平(Xinping)	2	-	-
X7	新台糖 16 号(Roc16)	云南新平(Xinping)	2	-	-
X8	粤糖 93-159(YT93-159)	云南新平(Xinping)	2	+	+
X9	闽糖 69-421(MT69-421)	云南新平(Xinping)	3	+	+
X10	新台糖 25 号(Roc25)	云南新平(Xinping)	3	+	+
X11	桂糖 17 号(GT17)	云南新平(Xinping)	1	++	+++
X12	新台糖 10 号(Roc10)	云南新平(Xinping)	2	-	-
X13	闽糖 69-421(MT69-421)	云南新平(Xinping)	3	+	+
X14	新台糖 1 号(Roc1)	云南新平(Xinping)	2	++	+++
X15	粤糖 89-113(YT89-113)	云南新平(Xinping)	3	-	-
CK1	阴性对照(Negative CK)			-	-
CK2	阳性对照(Positive CK)			+++	+++

“+”为 RSD 检测结果阳性,“-”为 RSD 阴性,“×”为未作 I-ELISA 检测。

“+”:Positive reaction;“-”:Negative reaction;“×”:No I-ELISA.

3 结论与讨论

甘蔗宿根矮化病(ratoon stuning disease, RSD)是普遍存在于所有植蔗地区的一种世界性的重要病害,由一种棒杆菌属细菌(*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*)寄生于蔗株的维管束中引起,由于无明显的外部 and 内部症状,病原菌又难以分离和培养,传统诊断方法极其困难,所以长期以来为人们所忽略,并在没有任何检测和防控措施的有利条件下得以任意传播,扩展蔓延。本研究利用从澳大利亚引进的 RSD 标准抗原抗体,建立了 I-ELISA 检测甘蔗宿根矮化病(RSD)的方法,并通过对田间采集的样本进行检测,同时以电镜负染检测法印证,检测结果一致,表明 I-ELISA 能简便、快速、准确、有效的检测出 RSD。电子显微镜和 I-ELISA 两种方法结合可提高 RSD 的检出率和准确性。

云南红河、开远、新平 3 地甘蔗宿根矮化病的田间检测结果表明,3 地均检测出 RSD,共检测的 42 个样品中,有 29 个样品为阳性占 69.05%,其中红河的 10 个样品中有 6 个样品为阳性占 60%,开远的 17 个样品中有 13 个样品为阳性占 76.47%,新平的 15 个样品中有 10 个样品为阳性占

66.67%,由此可见,RSD 在云南蔗区发生已非常普遍。

RSD 是一种重要的细菌性病害,对甘蔗造成的损失比任何一种甘蔗病害都大,且传播性极强,其对甘蔗生产有潜在的威胁,本研究仅对云南少数蔗区进行了调查,应进一步对 RSD 在云南各蔗区的发生情况、田间流行动态和防治技术(脱毒种苗生产)及 PCR 检测技术进行深入研究,为 RSD 的有效防控提供技术支撑。

[参考文献]

[1] 陈庆龙译. 世界甘蔗病害[M]. 北京:农业出版社, 1982.
 [2] 黄应昆,李文凤. 甘蔗主要病虫害原色图谱[M]. 昆明:云南科技出版社,2002.
 [3] 黄孟群,肖镇杰. 广东甘蔗宿根矮化病调查报告[J]. 甘蔗糖业,1987,(2):39-40.
 [4] 郑加协,甘勇辉. 福建甘蔗宿根矮化病的发生及其诊断[J]. 甘蔗糖业,1998,(5):20-24.
 [5] 邓展云,王伯辉,刘海斌,等. 广西甘蔗宿根矮化病的发生及病原检测[J]. 中国糖料,2004,(3):35-38.



(上接第 755 页)

[8] 李世广,林华峰. 不同条件下几种虫生真菌对棉铃虫的侵染致病效应[J]. 华东昆虫学报,2003,12(1):29-34.
 [9] MOHAMED A K A. Histopathology of *Nomuraea rileyi* in larvae of *Heliothis zea* and in vitro enzymatic activity [J]. J. Invertebr. Pathol,1978,31:345-352.
 [10] 涂增,翟逸,万永继. 环境因子对莱氏野村菌 cq 菌株生长发育的影响[J]. 西南农业大学学报,2006,28(1):49-53.
 [11] 黄桂英,左天兴,任金龙,等. 粉拟青霉菌、莱氏野村菌防治松小蠹虫试验[J]. 林业调查规划,2005,30(4):109-111.
 [12] 王滨,聂英奇,李增智,樊美珍. 白僵菌在土壤中宿存的量、毒力及产孢量变化研究[J]. 安徽农业大

学学报,2003,30(1):40-43.
 [13] 樊美珍. 绿僵菌在土壤中宿存形态和存活时间的测定[J]. 西北林学院学报,1991,6(3):48-54.
 [14] 樊美珍,李增智. 绿僵菌在土壤中的延续及控制桃小食心虫的潜力[J]. 应用生态学报,1996,7(1):49-55.
 [15] 陈斌,邓裕亮,李正跃,等. 绿僵菌对小云斑金龟幼虫的毒力及其在土壤中的宿存[J]. 西南农业大学学报,2004,26(5):580-583.
 [16] LOPRES M I, BARROS N M DE, DE BAEIOS NM. Virulence of stored conidia of *Nomuraea rileyi* against soybean caterpillar, *Anticarsa gemmatilis*[J]. Ciencia Rural,1995,25(2):197-200.