

文章编号: 1674-7054(2019)04-0314-05

我国蔗区甘蔗宿根矮化病发生情况的分子检测

沈林波¹, 吴楠楠^{1,2}, 冯小艳¹, 王文治¹, 熊国如¹, 赵婷婷¹, 张树珍¹

(1. 中国热带农业科学院 甘蔗研究中心/热带生物技术研究所/农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海口, 571101; 2. 南京农业大学 生命科学学院, 南京, 210095)

摘要: 为明确我国甘蔗产区(简称蔗区)甘蔗宿根矮化病(Sugarcane Ratoon Stunting Disease, RSD)的发生情况,从我国甘蔗主产区的12个蔗区收集甘蔗叶片样品598份,采用特异性引物通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)方法进行宿根矮化病的分子检测。结果表明,598份甘蔗样品中有99份能检测到RSD,平均检出率为16.56%。12个蔗区的RSD检出率各不相同,临沧蔗区的RSD检出率最高,为27.78%;南宁蔗区的RSD检出率最低,为4.88%。15个主要甘蔗栽培品种均能检测到RSD,阳性检出率为15.38%~44.44%,其中新台糖22号RSD发病最严重,阳性检出率为44.44%,海蔗22号RSD发病最轻,阳性检出率为15.38%。可见,宿根矮化病在我国甘蔗栽培品种中普遍发生。

关键词: 甘蔗; 宿根矮化病; 分子检测; 检出率

中图分类号: S 566.1

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.04.002

甘蔗宿根矮化病(Sugarcane Ratoon Stunting Disease, RSD)是影响甘蔗产量和品质的一种细菌性病害,1944年,在澳大利亚蔗区的甘蔗品种Q28上首次发现该病害^[1],目前,该病害在全球各个蔗区均广泛分布^[2-4]。甘蔗宿根矮化病在发病初期没有典型的外部症状,在发病严重时才表现出明显症状,表现为蔗株矮化、分蘖减少、蔗茎变细、节间缩短、生长不良、田间植株高矮不齐等^[5],这些症状与甘蔗在干旱、养分不足时的表现相似,因此,从外观上很难判断蔗株是否发病。甘蔗宿根矮化病有时会表现出内部症状,感病的幼嫩蔗株的生长点变成淡粉色,成熟蔗株近基部节部维管束变色,出现橘红色或红褐色的小圆点、逗点、短线状病变,但是这些症状有时不会表现出来^[6]。甘蔗宿根矮化病的病原菌是木质部赖氏菌木质部亚种(*Leifsonia xyli subsp. xyli*, Lxx)^[7],一种专性寄生于木质部维管束中的革兰氏阳性菌,菌体呈直或微弯的细长棒状,有的中部或一端膨大,内有间体,菌体大小为0.25~0.5 μm × 1.0~4.0 μm。Lxx主要通过带菌蔗种、收获机具和砍种刀具等媒介进行传播^[8-9]。甘蔗在宿根时,随着宿根年数的增长,宿根矮化病所造成的病蔗的蔗汁稀释至10 000倍仍具有感染力,传染性极强^[10]。此外,动物在咀嚼带病甘蔗后咬食健康的甘蔗也会传播该病菌^[11]。甘蔗宿根矮化病会造成有效茎数、单茎重、蔗糖分量的减少,从而影响甘蔗的产量和品质^[12-13],可使甘蔗产量减产10%~30%^[13-16]。在干旱缺水的条件下,宿根矮化病发病严重时,甘蔗产量减产可高达60%^[7],蔗糖分降低0.5%,经济损失巨大。目前,种植甘蔗脱毒种苗是预防甘蔗宿根矮化病的最有效措施,巴西、印度、古巴等甘蔗生产大国均采用种植甘蔗脱毒种苗的途径来防治甘蔗宿根矮化病^[4]。甘蔗宿根矮化病在发病不严重时没有明显的外部症状,难以从外观上进行诊断,同时病原菌Lxx的分离培养较困难,因此聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测法是目前检测RSD使用最广泛和准确的方法^[17-18]。笔者从我国甘蔗主产区的12个甘蔗产区(简称蔗区)收集甘蔗样品598份,利用PCR方法对RSD的病原菌Lxx进行分子检测,旨在明确我国蔗区甘蔗宿根矮化病的发生

收稿日期: 2019-04-18

修回日期: 2019-10-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771865); 海南省科协青年科技英才创新计划(HAST201626); 国家糖料产业技术体系“甘蔗病毒病防控岗位科学家”经费(CARS-470301)

作者简介: 沈林波(1986年-),男,助理研究员,研究方向:甘蔗抗病育种。E-mail: shenlinbo@itbb.org.cn

通信作者: 张树珍(1965年-),女,研究员,研究方向:甘蔗抗病育种。E-mail: zhangshuzhen@itbb.org.cn

情况,为甘蔗脱毒健康种苗的推广应用及有效防控甘蔗宿根矮化病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 2017 年从广西、云南、广东和海南等省份 12 个代表性蔗区采集显症或不显症的甘蔗叶片样品 598 份。以本实验室保存的经过鉴定感染甘蔗宿根矮化病的甘蔗叶片为阳性对照,灭菌双蒸水为空白对照。

1.2 试剂 甘蔗 DNA 提取相关试剂(Sigma),PCR 相关试剂(TaKaRa),AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit (Axygen),琼脂糖(Sigma),引物合成及测序均由生工生物工程(上海) 股份有限公司完成,其他常用的化学试剂均为国产分析纯。

1.3 甘蔗叶片总 DNA 的提取 甘蔗叶片总 DNA 的提取采用 CTAB 法^[19],取 200 mg 甘蔗叶片,剪碎后用液氮研磨成粉末,装入 2.0 mL 的离心管中,加入 1 mL 65 ℃ 预热的 CTAB 裂解缓冲液(0.1 mol · L⁻¹ Tris-Cl pH8.0, 1.4 mol · L⁻¹ NaCl, 0.02 mol · L⁻¹ EDTA pH8.0, 2% CTAB, 2% PVP, 3% β-巯基乙醇),混匀后于 65 ℃ 温浴 1 h。加入 1 mL 的 $V_{\text{氯仿}}: V_{\text{异戊醇}} = 24: 1$,颠倒混匀,常温 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。转移上清液至新的离心管,加入 0.6 倍体积的异丙醇,于 -20 ℃ 放置 10 min,常温 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,弃上清液,用 75% 的乙醇洗涤沉淀 2 次,常温 10 000 r · min⁻¹ 离心 2 min; 弃上清,用 80 μL ddH₂O 溶解沉淀,于 -20 ℃ 保存备用。取 1 μL DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.4 PCR 检测 引物采用 Lxx 的 16S ~ 23S rDNA 基因间隔区特异引物 Lxx1: 5'-CCGAAGTGAGCAGAT-TGACC-3', Lxx2: 5'-ACCCTGTGTTGTTTCAACG-3',目的片段大小为 438 bp,PCR 反应体系为: 10 × buffer 2.0 μL, dNTP 1.6 μL, Lxx1 和 Lxx2(10 μmol · L⁻¹) 各 1 μL, DNA 模板 1 μL, rTaq 酶 0.14 μL, 加 ddH₂O 补足 20 μL。扩增程序为: 95 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35 个循环, 72 ℃ 10 min^[20-21]。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.5 PCR 产物序列分析 对部分 PCR 阳性扩增产物用 AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit (Axygen) 试剂盒进行凝胶回收,回收产物连接 19T 载体上,转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,挑取单克隆,将菌液检测结果呈阳性的样品送到生工生物工程(上海) 股份有限公司测序,测序结果在 NCBI 数据库中进行 Blast 同源性分析。

1.6 分析 12 个蔗区甘蔗宿根矮化病的发病情况 统计分析 12 个蔗区收集的甘蔗样品中 RSD 检测呈阳性的样品数,并计算 12 个蔗区甘蔗宿根矮化病的发病率。

2 结果与分析

2.1 PCR 检测结果 用 Lxx 的特异性引物对 Lxx1 和 Lxx2 进行 RT-PCR 检测,结果显示: 阳性对照及部分样品(图 1) 可以扩增得到大小约为 438 bp 目的条带,空白对照无目的条带。随机挑选部分阳性样品 PCR 的产物进行测序,测序结果经 Blast 同源性分析显示,与已报道的 Lxx 的 16S ~ 23S rDNA 核酸序列(EU723209.1, AF034641.1) 有高达 99% 的同源性,表明它们是 Lxx 基因组的部分序列,这些样品中存在 Lxx 细菌,说明样品已感染了宿根矮化病。



图1 部分样品 RSD 的 PCR 检测

M: MarkerDL2000; 1: 阳性对照, 2: 无菌双蒸水; 3 ~ 24: 甘蔗样品

Fig. 1 PCR detection of RSD in partial samples

M: MarkerDL2000; 1: Positive control; 2: Sterile double distilled water; 3 - 24: Sugarcane samples

2.2 我国 12 个蔗区甘蔗宿根矮化病的发病情况 对我国 12 个蔗区的 RSD 检测结果进行统计分析, 结果(表 1) 显示, 来源于 12 个蔗区的 598 个样品中有 99 个样品的检测结果为阳性, 平均检出率为 16.56%。12 个蔗区的 RSD 检出率各不相同, 其中 RSD 在临沧蔗区的检出率最高, 为 27.78%, 其次是德宏蔗区, 检出率为 25.00%, 南宁蔗区的检出率最低, 4.88%, 百色、柳城、崇左、保山、湛江和临高等蔗区的 RSD 检出率均较低, 在 5.45% ~ 9.76% 之间。

2.3 不同甘蔗栽培品种 RSD 发生情况 对 15 个甘蔗栽培品种 RSD 的检测进行统计(表 2), 结果显示, 15 个甘蔗栽培品种均能检测到 RSD, 阳性检出率为 15.38% ~ 44.44%, 其中新台糖 22 号 RSD 发病最严重, 阳性检出率为 44.44%, 新台糖 16 号和粤糖 93-159 RSD 发病较严重, 分别为 42.86% 和 40.00%, 海蔗 22 号 RSD 发病最轻, 阳性检出率为 15.38%, 其余 11 个甘蔗品种的 RSD 阳性检出率为 16.67% ~ 37.75%。

表 1 我国 12 个蔗区甘蔗宿根矮化病的发生情况

Tab. 1 The occurrence of sugarcane ratoon stunting disease (RSD) in sugarcane planting areas in China

蔗区	样品数/个	阳性样品数/个	阳性检出率/%	
Sugarcane area	Number of samples	Number of positive samples	Positive rate	
广西 Guangxi	来宾	59	14	23.73
	百色	62	4	6.45
	北海	38	4	10.53
	南宁	41	2	4.88
	桂林	39	7	17.95
	柳城	39	24	6.15
	崇左	55	3	5.45
云南 Yunnan	保山	41	4	9.76
	临沧	36	10	27.78
	德宏	64	16	25.00
广东 Guangdong	湛江	68	6	8.82
海南 Hainan	临高	56	5	8.93
全国 Whole country	合计	598	99	16.56

表 2 不同甘蔗栽培品种 RSD 发生情况

Tab. 2 The occurrence of RSD infecting different sugarcane cultivars

品种 Variety	样品数/个 Number of samples	阳性样品数/个 Number of positive samples	阳性检出率/% Positive rate
新台糖 22 号	36	16	44.44
新台糖 16 号	14	6	42.86
新台糖 25 号	11	2	18.18
柳城 05-136	22	7	32.82
桂糖 42 号	16	3	18.75
桂糖 43 号	12	4	33.33
桂糖 29 号	12	2	16.67
粤糖 93-159	15	6	40.00
粤糖 00-236	8	3	37.50
粤糖 83-88	10	3	30.00
粤糖 86-368	8	2	25.00
粤糖 94-128	7	2	28.57
云蔗 05-51	10	2	20.00
福农 41 号	8	2	25.00
海蔗 22 号	13	2	15.38

3 讨 论

通常 PCR 检测 RSD 使用的材料多为甘蔗汁,但是由于甘蔗汁取样过程繁琐、易污染,且组培苗和处于苗期的甘蔗无法取汁,因此,使用甘蔗汁作为检测材料具有局限性,而使用甘蔗叶片作为检测材料可避免上述情况^[22]。赵婷婷等^[20, 23]使用甘蔗植株不同位置的叶片及叶片的不同部位作为材料来检测 RSD,发现 PCR 检测效率差异不明显。因此,本研究采用甘蔗叶片作为材料,通过 PCR 法进行 RSD 的检测。

王晓燕等^[13]在 2012—2014 年,对云南省 18 个蔗区宿根矮化病的发生情况进行了检测,发现 18 个蔗区都检测到 RSD,检出率为 75.62%,28 个主栽品种均感染 RSD,检出率 51.2%~100%,粤糖 93-159、粤糖 00-236 等 10 个甘蔗品种感病严重,RSD 在云南省各蔗区普遍发生且危害严重。韦金菊等^[12]在 2013—2014 年,对广西蔗区 9 个主产区的宿根矮化病的发生情况进行检测,发现 9 个主产区均检测出 RSD,阳性检出率为 71.22%;27 个甘蔗品种均能检测到 RSD,其中主栽品种新台糖 22 号发病严重,检出率达 80.8%;新植蔗的 RSD 检出率为 36.0%,宿根蔗的 RSD 检出率为 75.7%,宿根时间越长,RSD 检出率越高,宿根矮化病在广西蔗区发生严重。本研究共收集了 598 份甘蔗样品,其中 99 份能检测到宿根矮化病,全国蔗区平均检出率为 16.56%,全国 12 个蔗区均能检测到 RSD,云南蔗区的 RSD 检出率为 21.28%,广西蔗区的 RSD 检出率为 17.42%。收集到的 15 个主要甘蔗栽培品种均能检测到 RSD,阳性检出率为 15.38%~44.44%,其中新台糖 22 号 RSD 发病最严重,阳性检出率为 44.44%,海蔗 22 号 RSD 发病最轻,阳性检出率为 15.38%。对比前人的报道,发现云南蔗区和广西蔗区甘蔗宿根矮化病的检出率均大幅度下降,云南蔗区的 RSD 检出率降低了 54.34%,广西蔗区的 RSD 检出率降低了 53.80%。结果表明,虽然宿根矮化病在我国蔗区仍然普遍存在,但是由于我国近年采取推广种植甘蔗脱毒健康种苗等防治措施,宿根矮化病的发生已得到了很大程度的控制。目前,预防宿根矮化病发生的最有效措施就是种植甘蔗脱毒健康种苗。虽然我国蔗区现在宿根矮化病的发生比 2012—2014 年有所降低,但是其在我国蔗区仍然普遍存在,而且在 15 个甘蔗主要栽培品种上均有检测到了 RSD,说明目前对宿根矮化病的预防还需重视,在今后的甘蔗生产中应加大力度推广种植甘蔗脱毒健康种苗。

参考文献:

- [1] 陈明辉,谢晓娜,王盛,等.宿根矮化病菌对甘蔗品质及茎、叶超微结构的影响[J].植物病理学报,2014(4):379-386.
- [2] DUTTAMAJUMDER-SK. Surreptitious spread of sugarcane ratoon stunting disease pathogen *Leifsonia xyli subsp. xyli* in subtropical India [J]. India-Phytopathology,2001,54(4):481-483.
- [3] RAGO A M, ACRICHE M M, SOPENA R A. A survey of ratoon stunting disease (*Leifsonia xyli subsp. xyli*) in commercial sugarcane fields at Tucuman (Argentina) [J]. Sugarcane International,2004,22(6):12-14.
- [4] 李文凤,王晓燕,黄应昆,等.云南耿马蔗区甘蔗宿根矮化病的调查及病原检测[J].甘蔗糖业,2011(6):22-25.
- [5] 李文凤,罗志明,黄应昆,等.云南双江蔗区甘蔗宿根矮化病的调查及病原检测[J].西南农业学报,2012,25(4):1309-1312.
- [6] 李增平,张树珍.海南甘蔗病虫害诊断图谱[M].北京:中国农业出版社,2014.
- [7] 沈万宽,邓海华,陈仲华,等.粤北翁源蔗区甘蔗宿根矮化病调查[J].广东农业科学,2009(1):60-62.
- [8] 徐景升,许莉萍,阙友雄,等.甘蔗宿根矮化病研究进展[J].热带亚热带植物学报,2008,16(2):184-188.
- [9] 薛晶,何文志,张会华,等.弥勒蔗区甘蔗宿根矮化病发生分布及病原检测[J].中国糖料,2014(2):28-29.
- [10] 刘婧.甘蔗宿根矮化病菌(*Leifsonia xyli subsp. xyli*)检测技术研究[D].福州:福建农林大学,2011.
- [11] 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.
- [12] 韦金菊,宋修鹏,黄伟华,等.广西主要蔗区甘蔗宿根矮化病调查[J].南方农业学报,2017,48(7):1216-1219.
- [13] 王晓燕,李文凤,黄应昆,等.云南甘蔗宿根矮化病发生危害调查与病原检测[J].中国农学通报,2015,31(31):208-212.
- [14] 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.
- [15] 沈万宽,郑学文,邓海华,等.湛江农垦蔗区甘蔗宿根矮化病调查研究[J].中国农学通报,2007,23(4):387-391.
- [16] 黄应昆,李文凤,赵俊,等.云南甘蔗宿根矮化病病原检测[J].云南农业大学学报,2007,22(5):25-28.

- [17] 周丹, 谢晓娜, 陈明辉, 等. 甘蔗宿根矮化病 PCR 检测技术优化分析 [J]. 南方农业学报, 2012, 43(5): 616–620.
- [18] 张荣跃, 李文凤, 黄应昆, 等. PCR 检测甘蔗宿根矮化病研究简述 [J]. 中国糖料, 2014(3): 69–70.
- [19] 沈林波. 紫花苜蓿防御基因 *MsDefl* 转化甘蔗及抗病转基因植株的筛选 [D]. 海口: 海南大学, 2012.
- [20] 赵婷婷, 王俊刚, 杨本鹏, 等. 甘蔗叶片宿根矮化病的 PCR 检测 [J]. 热带作物学报, 2011, 32(5): 870–873.
- [21] GAO S J, PAN Y B, CHEN R K, et al. Quick detection of *Leifsonia xyli subsp. xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli subsp. xyli* isolates [J]. Sugar Tech, 2008, 10(4): 334–340.
- [22] 张荣跃, 单红丽, 王晓燕, 等. 甘蔗不同部位宿根矮化病分子检测研究 [J]. 中国糖料, 2013(4): 27–28.
- [23] 刘 睿, 杨湛端, 陈健文, 等. 应用 PCR 技术检测甘蔗各部位宿根矮化病病菌 [J]. 中国植保导刊, 2012, 32(12): 8–10.

Molecular Detection of Sugarcane Ratoon Stunting Disease in Sugarcane Producing Areas of China

SHEN Linbo¹, WU Nannan^{1,2}, FENG Xiaoyan¹, WANG Wenzhi¹,
QIONG Guoru¹, ZHAO Tingting¹, ZHANG Shuzhen¹

(1. Sugarcane Research Center, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/ Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/ Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Tropical Crop Biology and Genetic Resources, Haikou, Hainan 571101, China; 2. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to clarify the occurrence of sugarcane ratoon stunting disease (RSD) in sugarcane plantations in China, 598 sugarcane leaf samples were collected from 12 sugarcane plantations in the main sugarcane producing areas like Guangxi, Yunnan, Guangdong and Hainan in China, and the pathogen of RSD was identified by using specific primers through polymerase chain reaction (PCR). The results showed that 99 out of 598 sugarcane samples were detected to contain bacteria of RSD, with an average detection rate of 16.56%. RSD detection rates varied in 12 sugarcane plantations, the highest in Lincang sugarcane plantations (27.78%) and the lowest in Nanning sugarcane plantations (4.88%). RSD was detected in 15 main sugarcane cultivars, with positive detection rates ranging from 15.38% to 44.44%. Among the sugarcane cultivars, sugarcane cultivar ROC 22 was most seriously infected with RSD, and its RSD positive detection rate was 44.44%, while sugarcane cultivar Haitang 22 was less infected with RSD and its RSD positive detection rate was 15.38%. It can be seen that sugarcane ratoon stunting disease is common in sugarcane cultivars in China.

Keywords: sugarcane; ratoon stunting disease; molecular detection; detection rate

(责任编辑: 叶 静)