

2种水稻矮缩病毒一步检测方法的建立

杨迎青^{1,2} 周国辉² 蒲玲玲² 兰波¹ 李湘民¹

1. 江西省农业科学院植物保护研究所, 南昌 330200; 2. 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642

摘要 水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)和南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV)是引起水稻矮缩病的2种主要病毒,这2种病毒在田间危害症状较相似,难以准确鉴定。为建立这2种病毒的一步快速检测方法,从混合引物配比、退火温度2个方面优化了反应体系与反应程序,并用这2类病毒的总RNA进行了RT-PCR验证,最终建立了准确、灵敏、快速的一步检测方法。利用建立的方法对从江西省大余县和南昌县采集的水稻矮缩病毒叶片样品进行检测。结果表明:大余县10份样品均为南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV),检出率为100%;南昌县10份样品中有7份样品检出南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV),检出率为70%,另外3份样品检出水稻黑条矮缩病毒(RBSDV),检出率为30%。

关键词 水稻黑条矮缩病毒; 南方水稻黑条矮缩病毒; RT-PCR; 一步检测方法

中图分类号 S 435.111.4⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)03-0337-04

水稻黑条矮缩病毒(rice black-streaked dwarf virus, RBSDV)主要由灰飞虱以持久性方式传播,自然寄主包括玉米、水稻和小麦等禾本科作物^[1-2]。南方水稻黑条矮缩病毒(southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV)主要由白背飞虱带毒传播,是造成越南北部和我国南方等省区水稻矮缩病的主要病毒^[3-5]。近年来,在我国江西、湖南、广东、海南等省,由标准水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)和南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV)引起的水稻矮缩病发生日趋严重^[6]。

关于2种病毒检测方法的报道较多^[7-16]。这2种水稻病毒病在田间的危害症状较相似,难以准确鉴定和区分,目前尚无同时检测这2种病毒的快速鉴定方法。笔者改进了这2种病毒分2次鉴定的传统检测方法,建立一步检测这2种病毒的快速鉴定方法,并利用建立的检测方法对江西省大余县和南昌县的水稻矮缩病毒进行鉴定,旨在快速鉴定水稻黑条矮缩病毒和南方水稻黑条矮缩病毒,为有效防治水稻矮缩病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 标准样品

标准水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)和南方水稻

黑条矮缩病毒(SRBSDV)的Total RNA由笔者所在实验室提供。

1.2 主要试剂

Total RNA提取试剂盒购自美国OMEGA公司; RT-PCR试剂盒购自大连宝生物公司; 其他常用试剂均为国产分析纯。

1.3 RT-PCR检测

水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)检测引物参照章松柏等^[13]的引物S9F/R(S9F: 5'-GGAATTCATGGCAGACCAAGAGCGGGGAG-3'; S9R: 5'-CGCGATCCTCAAACGTCCAATTTCAAGG-3'); 南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV)检测引物参照王强^[14]的引物S10-oF/R(S10-oF: 5'-CGCGT-CATCTCAAACACTACAG-3'; S10-oR: 5'-TTTGT-CAGCATCTAAAGCGC-3'); RT-PCR按照试剂盒说明书的标准程序进行。

1.4 2种病毒一步检测的方法

将S9F/R与S10-oF/R 2对引物按照1:1(5 μmol: 5 μmol)、1:2(5 μmol: 10 μmol)和2:1(10 μmol: 5 μmol)的比例进行系列组合,采用53℃的退火温度,按照试剂盒说明书的标准程序进行One-step RT-PCR,筛选最佳的引物混合配比。同时,根据原引物的退火温度,将混合扩增体系的退

收稿日期: 2011-08-03

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201003031)和江西省科技支撑重点项目(2010BNA03500)

杨迎青, 博士, 助理研究员。研究方向: 植物病理学与分子生物学。E-mail: yyq8295@163.com

通讯作者: 李湘民, 博士, 研究员。研究方向: 植物病理学与分子生物学。E-mail: xml1025@yahoo.com.cn

火温度分别设置为 52、53、54 °C,按照筛选的最佳引物配比配制反应体系,按试剂盒说明书的标准程序进行 One-step RT-PCR,以筛选最佳的退火温度。

1.5 检测方法的验证

用建立的方法对笔者所在实验室保存的 RBS-DV 和 SRBSDV 标准样品的 Total RNA 进行 RT-PCR 扩增,验证一步检测方法的准确性与灵敏性。

1.6 样品的采集与鉴定

选择江西省大余县和南昌县水稻矮缩病发病较重的 10 块稻田,每块田采集 10 份样品,用建立的一步检测方法对样品进行病毒检测与鉴定。

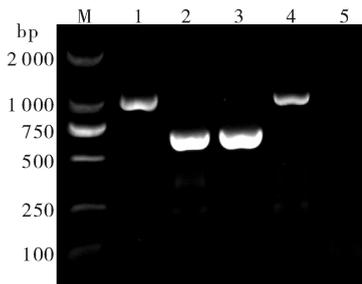
2 结果与分析

2.1 一步检测方法的建立

检测结果表明:将 S9F/R 与 S0-oF/R 2 对引物按 1:1(5 μmol:5 μmol)的比例配制反应体系比较适合 2 对引物的双重 RT-PCR 扩增;采用 53 °C 的退火温度进行 2 对引物的双重 RT-PCR,可以取得较佳的扩增效果。因此,试验采用 S9F/R 与 S10-oF/R 2 对引物按 1:1(5 μmol:5 μmol)的比例配比,采用 53 °C 的退火温度进行 2 对引物的双重 RT-PCR 扩增。反应体系和扩增条件的详细操作按照试剂盒说明书的标准方法进行。

2.2 检测方法验证的效果

标准病毒样品的检测结果如图 1 所示。由图 1 可知,2 个水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)标准样品均能扩增出 1.1 kb 左右的条带,2 个南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV)标准样品均能扩增出 600 bp 左右的条带。



M:DL 2 000 DNA marker; 1,4:标准水稻黑条矮缩病毒样品; 2,3:标准南方水稻黑条矮缩病毒样品; 5:双蒸水。1,4: Standard RBSDV samples; 2,3: Standard SRBSDV samples; 5: ddH₂O.

图 1 标准病毒 RNA 样品的 RT-PCR 扩增

Fig.1 RT-PCR of standard virus RNA samples

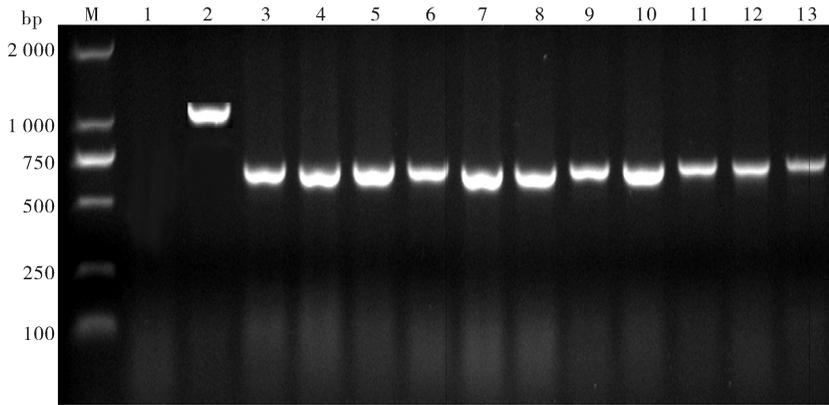
2.3 江西省水稻病毒样品的初步鉴定

江西省大余县 10 份水稻病毒样品的 RT-PCR 鉴定结果如图 2 所示,检测结果表明,大余县 10 份样品均为南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV),检出率为 100%;南昌县 10 份样品中的 RT-PCR 鉴定结果如图 3 所示,检测结果表明:10 份样品中有 7 份样品检出南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV),检出率为 70%,另外 3 份样品检出水稻黑条矮缩病毒(RBSDV),检出率为 30%。

3 讨论

近年来,水稻矮缩病在我国南方很多省份都有发生,而且有逐渐加重、不断蔓延的趋势。水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)和南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV)是引起水稻矮缩病的 2 种主要病毒。这 2 种病毒病在田间危害症状较相似,难以准确鉴定和区分,因此,分子检测在这 2 种病毒的鉴定中具有重要意义。

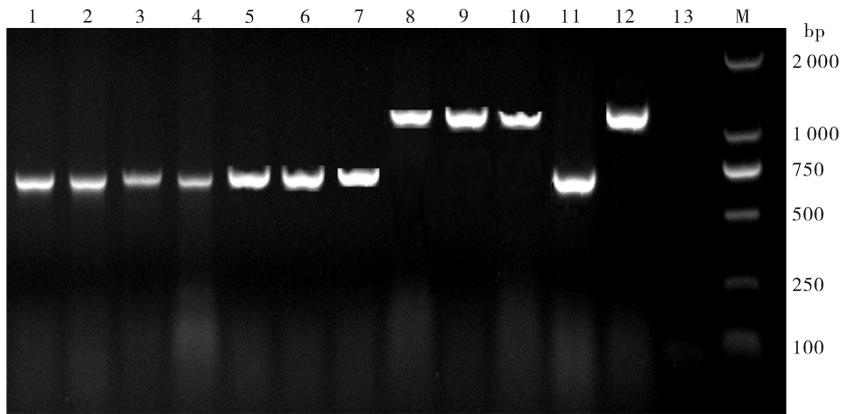
许多学者已将 RT-PCR、SDS-PAGE、斑点杂交、ID-ELISA、Western 杂交、免疫学检测和序列比对等技术应用于水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)和南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV)的检测^[8-16]。Isogai 等^[7]用 Western 杂交技术检测了 RBDSV 的结构蛋白,用免疫学技术检测了 RBDSV 的非结构性蛋白。王朝辉等^[9]报道了 RT-PCR、斑点杂交法和 SDS-PAGE 3 种检测 RBSDV 的方法,并发展了直接捕获 RT-PCR(direct binding RT-PCR)和印迹杂交(squash blot)法从单头灰飞虱体内检测 RBSDV 的方法。吕永平等^[10]和周倩等^[15]分别报道了用 RT-PCR 检测 RBSDV 和 SRBSDV 的方法。Wang 等^[11]建立了一种用 ID-ELISA 对 RBSDV 进行鉴定的方法。杨杰等^[12]通过 RT-PCR 产物序列测定与比对,将供测样品鉴定为 RBSDV。章松柏等^[13]用 RT-PCR 和 SDS-PAGE 2 种方法检测了 RBSDV。这些报道多局限于单种病毒的检测性。在 RBSDV 检测方面,SDS-PAGE 方法检测病毒需要大量的病叶,工作量较大,对于少量的病叶和单头介体及大批量的样品并不适用^[8,13,16];印迹杂交、ID-ELISA 和 Western 杂交等技术,操作较为繁琐,费用也较高^[8-9,11];RT-PCR 需要的样品少,适合飞虱带毒和大批量样品的检测,具有灵敏、快速的优势。在 SRBSDV 检测方面,周倩等^[15]建立了该病毒的 RT-PCR 快速鉴定方法。



M:DL 2 000 DNA marker; 1:双蒸水; 2:标准水稻黑条矮缩病毒样品; 3:标准南方水稻黑条矮缩病毒样品; 4~13:大余县水稻病毒样品。1:ddH₂O; 2:Standard RBSDV sample; 3:Standard SRBSDV sample; 4-13:Rice virus samples from Dayu County.

图 2 大余县水稻病毒样品的鉴定

Fig. 2 Identification of rice virus samples from Dayu County



M:DL 2 000 DNA marker; 1~10:南昌县水稻病毒样品; 11:标准南方水稻黑条矮缩病毒样品; 12:标准水稻黑条矮缩病毒样品; 13:双蒸水。1-10:Rice virus samples from Nanchang County; 11:Standard SRBSDV sample; 12:Standard RBSDV sample; 13:ddH₂O.

图 3 南昌县水稻病毒样品的鉴定

Fig. 3 Identification of rice virus samples from Nanchang County

笔者建立的水稻黑条矮缩病毒 (RBSDV) 和南方水稻黑条矮缩病毒 (SRBSDV) 一步快速检测的方法, 可以减小实际检测的工作量, 提高检测效率, 节省检测成本, 改进了以往通过 2 次试验分别检测这 2 种病毒的方法, 在检测方法的改良方面具有应用价值。

为进一步明确水稻矮缩病在江西省的发生和分布情况, 本试验还对采自大余县和南昌县的水稻矮缩病样品进行了初步鉴定。结果表明: 大余县水稻矮缩病主要是由南方水稻黑条矮缩病毒 (SRBSDV) 引起的; 南昌县水稻矮缩病是由南方水稻黑条矮缩病毒 (SRBSDV) 与水稻黑条矮缩病毒 (RBSDV) 共同引起的, 但以南方水稻黑条矮缩病毒 (SRBSDV) 为主。

参 考 文 献

[1] WANG Z H, FANG S G, XU J L, et al. Sequence analysis of the complete genome of rice black-streaked dwarf virus isolated from maize with rough dwarf disease[J]. *Virus Genes*, 2003, 27(2):163-168.

[2] 杨本荣, 马巧月. 玉米粗缩病的病毒寄主范围研究[J]. *植物病理学报*, 1983, 13(3):1-8.

[3] ZHOU G H, WEN J J, CAI D J, et al. Southern rice black-streaked dwarf virus: a new proposed *Fijivirus* species in the family Reoviridae [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2008, 53(23): 3677-3685.

[4] ZHANG H M, YANG J, CHEN J P, et al. A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel *Fijivirus* [J]. *Archives of Virology*, 2008, 153(10):1893-1898.

[5] WANG Q, YANG J, ZHOU G H, et al. The complete genome sequence of two isolates of southern rice black-streaked dwarf

- virus, a new member of the genus *Fijivirus* [J]. *Journal of Phytopathology*, 2010, 158(11/12): 733-737.
- [6] 周国辉, 张曙光, 邹寿发, 等. 水稻新病害南方水稻黑条矮缩病发生特点及危害趋势分析[J]. *植物保护*, 2010, 36(2): 144-146.
- [7] ISOGAI M, UYEDA I, LEE B. Detection and assignment of proteins encoded by rice black streaked dwarf fijivirus S7, S8, S9, and S10[J]. *Journal of General Virology*, 1998, 79: 1487-1494.
- [8] 王朝辉, 周益军, 范永坚, 等. 应用 RT-PCR、斑点杂交法和 SDS-PAGE 检测水稻黑条矮缩病毒[J]. *南京农业大学学报*, 2001, 24(4): 24-28.
- [9] 王朝辉, 周益军, 范永坚, 等. 从单头灰飞虱中检测水稻黑条矮缩病毒简单快速的方法[J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2002, 20(4): 340-343.
- [10] 吕永平, 雷娟利, 金登迪, 等. 水稻黑条矮缩病毒的 RT-PCR [J]. *浙江农业学报*, 2002, 14(2): 117-119.
- [11] WANG Z H, FANG S G, ZHANG Z Y, et al. Development of an ID-ELISA for the detection of rice black-streaked dwarf virus in plants [J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 134: 61-65.
- [12] 杨杰, 王军, 周彤, 等. 江苏水稻黑条矮缩病病毒的 RT-PCR 分析和快速检测[J]. *华北农学报*, 2008, 23(6): 87-92.
- [13] 章松柏, 李大勇, 肖冬来, 等. 水稻黑条矮缩病的发生和病毒检测[J]. *湖北农业科学*, 2010, 49(3): 592-594.
- [14] 王强. 南方水稻黑条矮缩病毒基因组 S1-S8 序列分析及 RT-PCR 检测[D]. 广州: 华南农业大学图书馆, 2010: 1-50.
- [15] 周倩, 朱俊子, 梁晋刚, 等. 南方水稻黑条矮缩病毒快速检测[J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(5): 1009-1012.
- [16] 章松柏, 吴祖建, 段永平, 等. 水稻矮缩病毒的检测和介体传毒能力初步分析[J]. *安徽农业科学*, 2005, 33(12): 2263-2264, 2287.

Construction of one-step detection method on two rice dwarf viruses

YANG Ying-qing^{1,2} ZHOU Guo-hui² PU Ling-ling² LAN Bo¹ LI Xiang-min¹

1. *Institute of Plant Protection, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China;*

2. *College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*

Abstract Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV) and southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV) are the main viruses which bring rice dwarf. However, the symptoms of these two viruses are highly similar and it is difficult to distinguish them only by field observation. To construct a fast detection method of these two viruses, the PCR reaction system and program were optimized from two aspects, ie. the mixing ratios of mixed primers and the annealing temperature. Finally, an exact, sensitive and fast one-step detection method was found. At the same time, the rice dwarf virus samples from Dayu County and Nanchang County in Jiangxi Province were detected with this method, and the results revealed that all of the 10 samples from Dayu County were identified as southern rice black-streaked dwarf virus with a detection ratio of 100%, 7 out of 10 samples from Nanchang County were identified as southern rice black-streaked dwarf virus with a detection ratio of 70%, and 3 out of 10 samples from Nanchang County were identified as rice black-streaked dwarf virus with a detection ratio of 30%.

Key words rice black-streaked dwarf virus; southern rice black-streaked dwarf virus; RT-PCR; one-step detection method

(责任编辑: 陈红叶)