

# 双重 RT-PCR 法同时快速检测南方水稻 黑条矮缩病毒和水稻黑条矮缩病毒

孙晓棠, 崔汝强, 贺浩华, 欧阳林娟, 胡丽芳, 彭小松, 陈小荣, 朱昌兰\*

(江西农业大学 农学院/作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室 江西 南昌 330045)

**摘要:**南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV)和水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)在病害症状、传播介体及寄主等方面非常相似,田间很难对其进行诊断及鉴定。根据SRBSDV与RBSDV外壳蛋白(CP)基因核苷酸序列差异设计特异性引物,建立一种快速、准确的双重RT-PCR鉴别方法,为SRBSDV和RBSDV的流行监测提供技术支持。

**关键词:**南方水稻黑条矮缩;水稻黑条矮缩病毒;外壳蛋白基因;特异性检测

中图分类号:S435.111.4<sup>+</sup>9 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2012)05-0914-04

## Quick Detection of SRBSDV and RBSDV by Duplex RT-PCR

SUN Xiao-tang, CUI Ru-qiang, HE Hao-hua, OUYANG Lin-juan,  
HU Li-fang, PENG Xiao-song, CHEN Xiao-rong, ZHU Chang-lan\*

(College of Agronomy/Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding, Ministry of Education, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** Southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV) and rice black-streaked dwarf virus (RBSDV) are two important virus diseases in rice. They share many similar characters, such as symptoms, vectors and host range etc., causing difficulty in discrimination of the two viruses. In this study, three primers were designed based on the reported CP gene, and a duplex RT-PCR protocol for the detection of two viruses was developed, which provides a rapid and specific method for simultaneous detection of SRBSDV and RBSDV.

**Key words:** southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV); rice black-streaked dwarf virus (RBSDV); coat protein gene; specific detection

水稻黑条矮缩病毒(rice black-streaked dwarf virus, RBSDV)早在1963年在我国就有报道<sup>[1]</sup>,20世纪90年代曾在东南亚国家及浙江一带稻区流行,造成严重损失<sup>[2]</sup>。近年来,该病在江苏、浙江、山东等地又有发生,且呈明显上升趋势。南方水稻黑条矮缩病毒(southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV)是水稻上新发生的一种病害,周国辉等<sup>[3-4]</sup>于2001年在广东省阳西县首次发现一种症状类似于RBSDV的水稻新病毒病,并于2008年将该病毒鉴定为呼肠孤病毒科(Reoviridae)斐济病毒属(*Fijivirus*)第2组的一个建议新种。该病毒2009年在越南北部19个省和我国南部9个省区流行成灾,超过30万hm<sup>2</sup>

收稿日期:2012-05-04 修回日期:2012-06-21

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD14B1)、高等学校博士学科点专项科研基金(20113603110001)、转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08001-002)和江西省重大科技专项(20114ABF03102)

作者简介:孙晓棠(1980—),女,助理研究员,博士生,主要从事水稻抗病育种研究,E-mail: xts80@yahoo.com.cn;

\* 通讯作者:朱昌兰,教授,博士,E-mail: zhuchanglan@163.com。

单季稻和晚稻受害约 0.6 万  $\text{hm}^2$  水稻失收<sup>[5]</sup>。2010 年暴发成灾,我国南部 13 省,中稻超 33.3 万  $\text{hm}^2$ ,晚稻超 133.3 万  $\text{hm}^2$  受害<sup>[5-7]</sup>。SRBSDV 和 RBSDV 这 2 种病毒为害水稻的症状极其相似,田间很难对其进行诊断及鉴定。目前国内外针对 SRBSDV 和 RBSDV 检测方法的报道较多,但这些报道多局限于单种病毒的检测<sup>[8-11]</sup>。本研究根据 SRBSDV 和 RBSDV 外壳蛋白(CP)基因核苷酸序列差异设计特异性引物,建立了一种双重 RT-PCR 同时快速鉴别这 2 种病毒的方法,旨在为调查明确这两种病毒的发生为害提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

对照样品为华南农业大学周国辉教授惠赠的已经鉴定的南方水稻黑条矮缩病株、齿叶矮缩病株和水稻黑条矮缩病株。8 株水稻矮缩病株待测样品于 2011 年采自江西南昌地区水稻发病田,其中 5 株具有典型的 SRBSDV 或 RBSDV 侵染的症状,表现为植株矮缩且茎秆表面有蜡点状白色瘤状突起,其余 3 株除具有上述症状外,还具有齿叶矮缩病毒(RRSV)侵染的典型症状,表现为植株矮缩、叶尖旋转、叶缘有缺刻。活株剪掉上半部后种植于光照培养箱中,病株地上部分则保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中。

### 1.2 引物设计

根据 GenBank 已登陆的 SRBSDV 和 RBSDV 的核苷酸序列,使用 Primer Premier 5.0 和 NCBI 的 Primer-BLAST 设计特异性引物 S/RBSDV-F、SRBSDV-R 和 RBSDV-R。

### 1.3 总 RNA 提取

取新鲜幼嫩水稻病叶 0.1 g 于液氮条件下研磨,参照 TRIzol 试剂盒使用说明提取病叶总 RNA。

### 1.4 RT-PCR 扩增

以提取的总 RNA 为模板,在 M-MLV 反转录酶作用下,用随机引物合成 cDNA。再以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,使用常规 PCR 反应体系,引物为 3 条。PCR 反应条件为  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s;  $52\text{ }^{\circ}\text{C}$  45 s;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  45 s,共 35 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,用溴化乙锭染色后在凝胶成像系统下观察记录。

### 1.5 RT-PCR 产物测序及序列分析

将 RT-PCR 产物稀释 50 倍,取  $1\text{ }\mu\text{L}$  为模板,以 S/RBSDV-F 和 SRBSDV-R 为引物,进行  $50\text{ }\mu\text{L}$  体积的 PCR 反应,将产物送生工生物工程(上海)有限公司测序。测序结果与 GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST 比对。利用软件 CLUSTAL X1.83、DNASTAR 进行多序列比对和同源性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 同时检测 SRBSDV 和 RBSDV 的引物设计

根据 GenBank 上已登陆的 SRBSDV 和 RBSDV 分离物 CP 基因核苷酸序列,设计出引物 S/RBSDV-F  $5'\text{-CGTGAAGTTCCTGCTCAAATGG-3'}$ ,SRBSDV-R  $5'\text{-AAGTGCAGACAGTCCAGYTAGTTC-3'}$  和 RBSDV-R  $5'\text{-ARGAAGAAACGTTGGCGGAAAGT-3'}$ 。S/RBSDV-F 根据 CP 基因保守区域设计,为扩增 2 种病毒特异性片段的通用正向引物,SRBSDV-R 和 RBSDV-R 根据变异区域设计,前者用于扩增 SRBSDV 特异性片段的反向引物,后者为扩增 RBSDV 特异性片段的反向引物(图 1)。

### 2.2 双重 RT-PCR 的特异性检测

采用 S/RBSDV-F、SRBSDV-R 和 RBSDV-R 3 条引物同时扩增的双重 RT-PCR 方法对阳性样品进行特异性检测。结果如图 2 所示,3 条引物能有效地从对照阳性病株中扩增出单一的目的片段,在 SRBSDV 的阳性对照中特异性的扩增出一条约 400 bp 大小的条带,在 RBSDV 的阳性对照中特异性的扩增出一条约 1 000 bp 大小的条带,与预期相符。RRSV 阳性对照和水稻健康植株未扩增出任何条带。说明本实验设计的 3 条引物具有很好的特异性,仅能从感病的水稻总 RNA 抽提物中扩增出预期的片段,不能从健康水稻总 RNA 抽提物及非目标 dsRNA 中扩增出任何产物。

### 2.3 水稻矮缩样品检测

采用本研究建立的双重 RT-PCR 方法对采自江西南昌的 8 株水稻矮缩样品进行检测,其中 5 株具

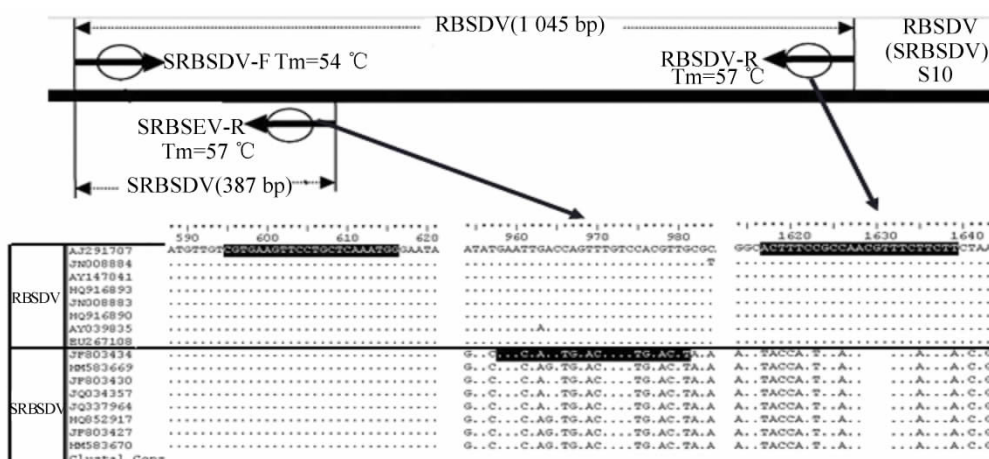


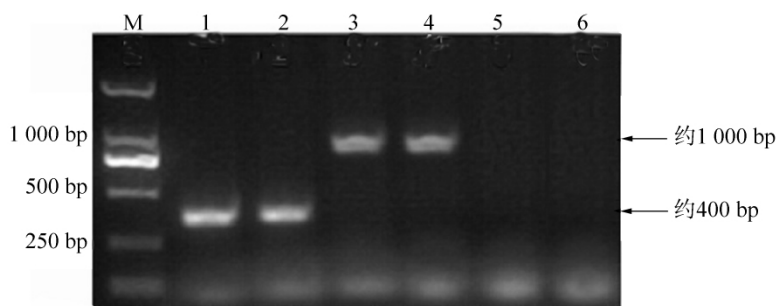
图 1 引物设计策略简图

Fig. 1 The strategy of primer design

有典型的 SRBSDV 或 RBSDV 侵染的症状,其余 3 株还具有 RRSV 侵染的典型症状,表现为复合侵染的水稻矮缩病株样品。检测结果如图 3 所示,8 个待测样品均特异性的扩增出一条约 400 bp 大小的核酸条带,大小与 SRBSDV 阳性对照一致,未扩增到 1 000 bp 大小的核酸条带,说明这 8 个水稻矮缩样品均为 SRBSDV 侵染,未检测到 RBSDV。

### 2.4 RT-PCR 产物序列分析

为进一步验证方法的可靠性,对泳道 2 和泳道 7 的 RT-PCR 产物进行测序。测序结果表明两者具有很高的一致率,只有 1 个碱基差别(A<sup>296</sup>/C), GenBank 登录号为 JQ927008 和 JQ927009。将获得的序列与 GenBank 数据库中已知序列进行 Blast 分析,采用软件计算同源性。结果表明,本研究获得的片段与 SRBSDV 的同源性高达 98.0%~100%,与 RBSDV 的最高同源性为 84.9%。进一步说明本研究建立的双重 PT-PCR 方法可以有效地对田间采集的水稻矮缩样品进行 SRBSDV 和 RBSDV 的快速检测与鉴别。

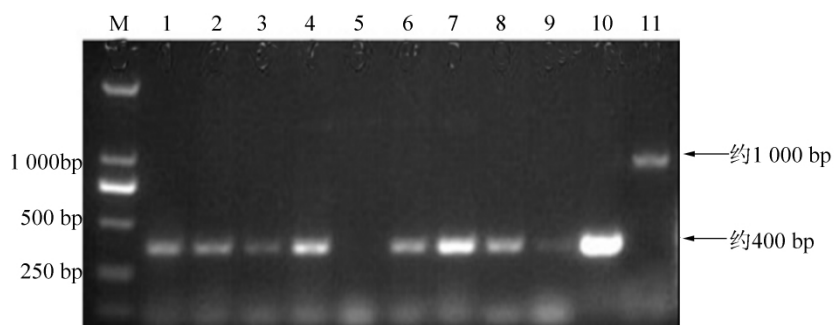


M: DL 2000; 1-2: SRBSDV 阳性对照; 3-4: RBSDV 阳性对照; 5: 健康植株; 6: RRSV 阳性对照。

M: DL 2000; 1-2: SRBSDV positive control; 3-4: RBSDV positive control; 5: Healthy plant; 6: RRSV positive control.

图 2 阳性对照样品的 RT-PCR 扩增

Fig. 2 RT-PCR of SRBSDV and RBSDV positive control samples



M: DL 2000; 1: SRBSDV 阳性对照; 2-4: 除具有 SRBSDV/RBSDV 侵染的典型症状外,还具有 RRSV 侵染的典型症状; 5: 健康植株; 6-10: 具有 SRBSDV/RBSDV 侵染的典型症状; 11: RBSDV 阳性对照。

M: DL 2000; 1: SRBSDV positive control; 2-4: Rice samples collected from fields with SRBSDV/RBSDV and RRSV typical symptoms; 5: Healthy plant; 6-10: Rice samples collected from fields with SRBSDV/RBSDV typical symptoms; 11: RBS-DV positive control.

图 3 田间水稻矮缩样品 SRBSDV 和 RBSDV 的 RT-PCR 检测

Fig. 3 Detection of RBSDV and SRBSDV in diseased rice collected from fields

### 3 结论与讨论

近年来由南方水稻黑条矮缩病毒和水稻黑条矮缩病毒引起的水稻矮缩病在华南、华东等地区暴发流行,给水稻生产带来严重损失<sup>[7]</sup>。开展对这2种病毒的调查,明确其发生、分布及危害,是抗病育种及病害防治的前提。SRBSDV和RBSDV这2种病毒在病害症状、传播介体及寄主方面极其相似<sup>[4]</sup>,田间很难对其进行诊断及鉴定。且由于SRBSDV是新发现病毒,与RBSDV在粒子形态、基因组电泳图谱、基因组结构及已知片段功能等方面也极其接近<sup>[4]</sup>,之前只根据RBSDV特征建立的RBSDV检测鉴定方法由于未考虑SRBSDV,多不能对SRBSDV和RBSDV进行鉴别区分。目前国内外针对SRBSDV和RBSDV检测方法的报道较多,但这些报道多局限于单种病毒的检测,对2种病毒的检测需通过2次试验分别进行<sup>[8-11]</sup>。2011年季英华等<sup>[12]</sup>首次报道根据已知2个SRBSDV和11个RBSDV分离物S9序列设计引物建立了对这2种病毒同时进行检测的RT-PCR方法。但是,病毒变异快,只根据个别分离物序列设计引物,很可能会发生漏检甚至错检。

外壳蛋白(CP)是斐济病毒属的结构蛋白之一,主要功能是保护病毒基因组免遭各种理化因子及环境中各种不利因素的破坏,是斐济病毒属基因组中最为保守的基因之一<sup>[13]</sup>。本研究根据目前GenBank上已登陆的约100条SRBSDV和70条RBSDV分离物CP基因核苷酸高度保守区和变异区设计引物,能完全匹配90个SRBSDV分离物和52个RBSDV分离物,不能完全匹配的分离物与引物之间发生错配的位点也多在引物的5'端,不影响目的片段的扩增,建立了一种快速、准确的鉴别方法,改进了以往通过2次试验分别检测这2种病毒的方法,只需1次RT-PCR即可实现2种病毒的检测与鉴别,可以减小实际检测的工作量,提高检测效率,节省检测成本,为SRBSDV和RBSDV这2种病毒的流行监测提供了技术支持。

#### 参考文献:

- [1]陈声祥,张巧艳.我国水稻黑条矮缩病和玉米粗缩病研究进展[J].植物保护学报,2005,32(1):97-103.
- [2]Bai F,Yan J,Qu Z,et al. Phylogenetic analysis reveals that a dwarfing disease on different cereal crops in China is due to rice black-streaked dwarf virus (RBSDV) [J]. Virus Genes 2002 25(2):201-206.
- [3]Zhang H M, Yang J, Chen J P. A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel *Fijivirus* [J]. Archives of Virology, 2008, 153(10):1893-1898.
- [4]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.
- [5]郭荣,周国辉,张曙光.水稻南方黑条矮缩病发生规律及防控对策初探[J].中国植保导刊,2010,30(8):17-20.
- [6]钟天润,刘宇,刘万才.2010年我国南方水稻黑条矮缩病发生原因及趋势初析[J].中国植保导刊,2011,31(4):32-34.
- [7]周国辉,张曙光.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(1):144-146.
- [8]Wang Z, Yu D, Li X, et al. The development and application of a Dot-ELISA assay for diagnosis of southern rice black-streaked dwarf disease in the field [J]. Viruses, 2012, 4(1):167-183.
- [9]Zhou T, Du L, Fan Y, et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of RNA for sensitive and rapid detection of southern rice black-streaked dwarf virus [J]. Journal of Virological Methods, 2012, 180(1/2):91-95.
- [10]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.
- [11]王强,周国辉,张曙光.南方水稻黑条矮缩病毒一步双重RT-PCR检测技术及其应用[J].植物病理学报,2012,42(1):84-87.
- [12]季英华,高瑞珍,张野,等.一种快速同步检测水稻黑条矮缩病毒和南方水稻黑条矮缩病毒的方法[J].中国水稻科学,2011,25(1):91-94.
- [13]高芳奎,范国成,谢荔岩,等.呼肠孤病毒科的系统发育分析[J].激光生物学报,2008,17(4):486-490.