

水稻黑条矮缩病毒与南方水稻黑条矮缩病毒的检测及其在江西省的区域分布

杨迎青¹ 李湘民^{1*} 兰波¹ 钟玲² 孟凡^{1,3} 张洁^{1,3}

(1. 江西省农业科学院 植物保护研究所, 江西 南昌 330200; 2. 江西省植保植检局, 江西 南昌 330096; 3. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

摘要:为明确水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)和南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV)这2种病毒在江西省的分布,首先从永修县、南昌县和大余县等8县市采集水稻疑似矮缩病株,用2种病毒一步检测法对这2种病毒进行RT-PCR检测。结果表明:永修县所有样品均检出RBSDV,检出率为100%;南昌县同时检出RBSDV和SRBSDV,检出率分别为90%和20%,其中南昌县的1个样品同时检出2种病毒,存在复合侵染;大余县、莲花县、崇义县、婺源县、万安县和井冈山市等6县的所有样品均检出SRBSDV,检出率100%。然后,对这2种病毒在江西省的分布特点进行分析。统计分析结果表明:江西省西南部和东北部只有SRBSDV分布,江西省北部只有RBSDV分布,而处于以上3个病毒重发区之间的南昌县同时有RBSDV和SRBSDV分布。同时基于S9序列和S10序列建立这2种病毒及其近缘种的系统发育树,分析其亲缘关系。

关键词:水稻黑条矮缩病毒;南方水稻黑条矮缩病毒;RT-PCR;检测;区域分布

中图分类号:S435.111.4⁺⁹ 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2012)05-0918-04

Detection of Rice Black-streaked Dwarf Virus and Southern Rice Black-streaked Dwarf Virus and Their Regional Distribution in Jiangxi Province

YANG Ying-qing¹, LI Xiang-min^{1*}, LAN Bo¹,
ZHONG Ling², MENG Fan^{1,3}, ZHANG Jie^{1,3}

(1. Institute of Plant Protection, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China; 2. Plant Protection and Quarantine Bureau of Jiangxi Province, Nanchang 330096, China; 3. College of Agronomy, Nanchang 330045, China)

Abstract: To verify the distribution of two rice viruses, i. e. rice black-streaked dwarf virus and southern rice black-streaked dwarf virus, in Jiangxi, the suspected dwarf rice plants were gathered from 8 counties, i. e. Yongxiu, Nanchang, Dayu and so on, and were detected using the one-step detection method of 2 viruses. The results revealed that in all of the samples from Yongxiu County rice black-streaked dwarf virus was detected with a detection ratio of 100%, both rice black-streaked dwarf virus and southern rice black-streaked dwarf virus were detected in Nanchang County with the detection ratios of 90% and 20%, of which 2 viruses detected in the same sample, and all of the samples from Dayu County, Lianhua County, Chongyi County, Wuyuan County, Wan'an County and Jinggangshan County were identified as southern rice black-streaked dwarf virus with a detection ratio of 100%. Furthermore, the regional distribution of these 2 viruses in Jiangxi

收稿日期:2012-05-04 修回日期:2012-06-21

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)

作者简介:杨迎青(1981—),男,助理研究员,博士,主要从事植物病理学研究,E-mail:yyq8295@163.com;* 通讯

作者:李湘民,研究员,博士,E-mail:xmli1025@yahoo.com.cn。

was analyzed and the statistical analysis result revealed that there only existed southern rice black-streaked dwarf virus in the southwest and northeast of Jiangxi, there only existed rice black-streaked dwarf virus in the north of Jiangxi and there existed the two viruses in Nanchang at the junction of the above 3 disease regions. At the same time, phylogenetic trees among these two virus and their relatives were constructed based on the S9 and S10 sequences and their phylogenetic relationship was analyzed.

Key words: rice black-streaked dwarf virus; southern rice black-streaked dwarf virus; RT-PCR; detection; regional distribution; phylogenetic relationship

水稻黑条矮缩病毒(rice black-streaked dwarf virus, RBSDV) 是呼肠孤病毒科(Reoviridae) 斐济病毒属(*Fijivirus*) 中的成员^[1-3], 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^[4-5]。南方水稻黑条矮缩病毒(southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV) 是呼肠孤病毒科(Reoviridae) 斐济病毒属(*Fijivirus*) 的一个新种^[6], 主要由白背飞虱带毒传播, 是近年来造成越南北部和我国南方省区水稻矮缩病的主要病原^[6-8]。近年来我国江西、湖南、广东、海南等省水稻矮缩病发生严重, 据不完全统计, 受害面积超过 $3 \times 10^5 \text{ hm}^2$, 约 $6\,500 \text{ hm}^2$ 水稻失收^[9], 该病主要是由 RBSDV 与 SRBSDV 引起的。许多学着对造成水稻矮缩的病毒进行了报道^[10-12], 但较零散, 缺乏对这 2 种病毒的系统鉴定及区域分布的报道。本研究以江西省永修县、南昌县和大余县等 8 县市的矮缩病株为材料, 对 RBSDV 与 SRBSDV 2 种病毒进行了检测, 并对这 2 种病毒的区域分布和系统发育进行了分析, 以期明确其分类地位, 为有针对性地防治水稻矮缩病提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Total RNA 提取试剂盒购自天根生化科技公司; RT-PCR 试剂盒、DNA Marker 等试剂购自大连宝生物公司; 其它常用试剂均为国产分析纯。

1.2 样品的采集

选取江西省南昌县、永修县、大余县、莲花县、崇义县、婺源县、万安县和井冈山市共 8 县市发病较重的 10 块稻田, 在水稻灌浆期, 从明显矮缩的疑似病株上剪取心叶 1 片, 放入 10 mL 离心管中, 带回实验室检测。每块田采集矮缩疑似病株样品 1 份, 每县市共采集 10 份样品。

1.3 RT-PCR 检测

水稻黑条矮缩病毒(RBSDV) 检测引物参考章松柏等^[13]的引物 S9F/R(S9F: 5' - GGAATTCATG-CGACACCAAGAGCGGGGAG - 3'; S9R: 5' - CGCGATCCTCAAACGTCCTCAATTTCAAGG - 3') , 南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV) 检测引物参考王强^[14]的引物 S10 - OF/R (S10 - OF: 5' - CGCGTCATCTCAAACACTACAG - 3'; S10 - OR: 5' - TTTGTCAGCATCTAAAGCGC - 3') 。2 对引物按 1: 1(终浓度均为 $0.2 \mu\text{mol/L}$) 的比例混合, 退火温度为 $53 \text{ }^\circ\text{C}$ 。Total RNA 提取及 RT-PCR 检测按照试剂盒说明书标准方法进行。

1.4 区域分布分析

对 8 县市矮缩病毒检测结果进行统计分析, 明确其区域分布特点。

1.5 目的片段的克隆与测序

从琼脂糖凝胶上将符合预期大小的扩增条带切下, 克隆到 pMD20-T 载体, 用热击法转入大肠杆菌(*Escherichia coli*) 感受态, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 12 ~ 16 h, 挑取阳性转化子, 将 LB 菌液送交北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

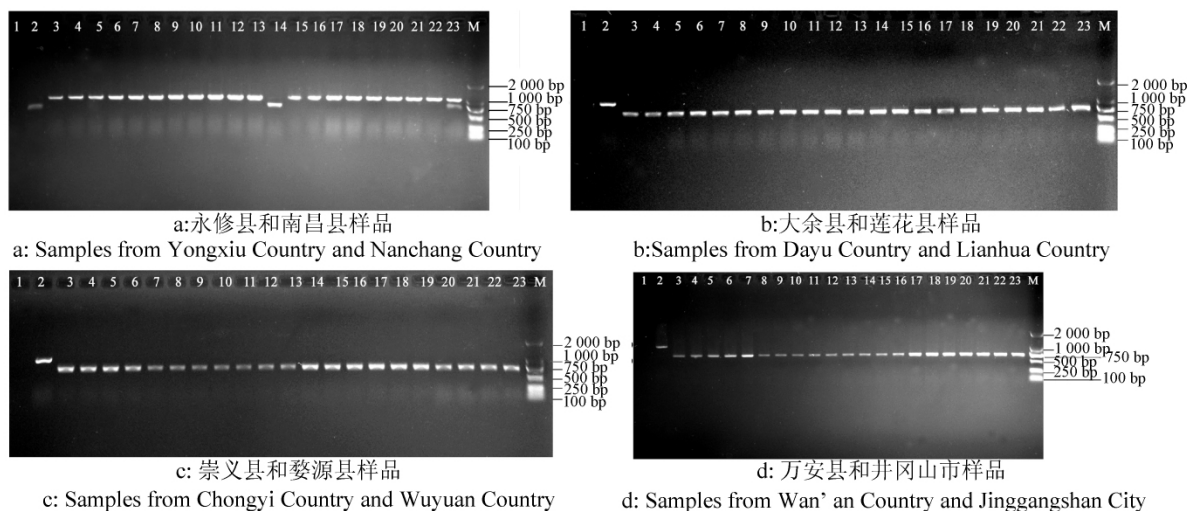
1.6 系统发育分析

将不同省份菌株的 ITS 序列提交到 GenBank 中, 获得相应的序列登录号, 然后用 MEGA4.0 软件中的邻位加入法(neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 检测

结果表明: 永修县所有样品均检出 RBSDV, 检出率 100%; 南昌县同时检出 RBSDV 和 SRBSDV, 检



1: 健康水稻 Total RNA; 2: 标准 SRBSDV Total RNA; 3: 标准 RBSDV Total RNA; 4 - 13: 永修县疑似病株 Total RNA; 14 - 23: 南昌县疑似病株 Total RNA。

1: Total RNA of healthy rice plants; 2: Standard RBSDV Total RNA; 3: Standard SRBSDV Total RNA; 4-13: Total RNA of suspected disease plants from Wan'an County; 14-23: Total RNA of suspected disease plants from Jinggangshan City.

图 1 RT-PCR 检测

Fig. 1 RT-PCR detection

出率分别为 90% 和 20% ,南昌县的 1 个样品同时检出 2 种病毒 ,存在复合侵染; 大余县、莲花县、崇义县、婺源县、万安县和井冈山市所有样品均为检出 SRBSDV ,检出率 100% (图 1) 。

2.2 区域分布分析

统计分析结果表明: 江西省西南部(大余县、莲花县、崇义县、万安县和井冈山) 和东北部(婺源县) 只有 SRBSDV 分布 ,江西省北部(永修县) 只有 RBSDV 分布 ,而处于以上 3 个病毒重发区之间的南昌县同时有 RBSDV 和 SRBSDV 分布(图 2) 。

2.3 系统进化分析

结果表明: 采集于南昌县和永修县的 RBSDV 单独聚为一枝 ,SRBSDV 与其亲缘关系较近(图 3-A) ; 采集于崇义县、大余县和井冈山市的 SRBSDV 单独聚为一枝 ,RBSDV 与其亲缘关系较近(图 3-B) 。

3 结论与讨论

水稻黑条矮缩病毒(RBSDV) 和南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV) 是我们南方省区水稻矮缩的主要病原 ,江西省是该病的主发区 ,该病的大流行严重影响了水稻的高产、稳产。目前已有关于江西省水稻矮缩病毒发生情况的相关报道^[11] ,但较为零散 ,缺乏较为系统的研究。RT-PCR 是病毒检测的一种重要方法 ,具有简单、灵敏和时效性强等特点。为明确这 2 种病毒在江西省的分布 ,



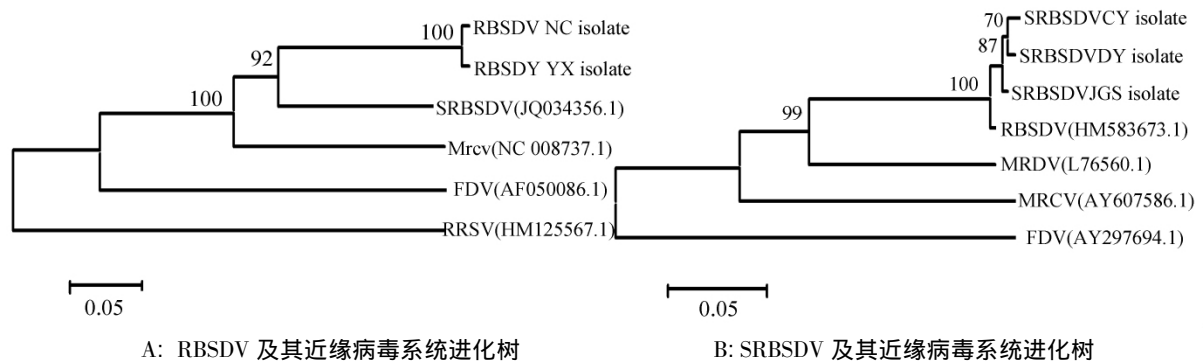
◆为 RBSDV 分布区; ■为 SRBSDV 分布区; ▲为 RBSDV 与 SRBSDV 混合分布区。

◆: RBSDV regions; ■: SRBSDV regions; ▲: Mixed regions of RBSDV and SRBSDV.

图 2 RBSDV 和 SRBSDV 的区域分布

Fig. 2 Regional distribution of RBSD and SRBSDV

本研究从永修县、南昌县和大余县等 8 县市采集了水稻疑似矮缩病株 ,对这 2 种病毒进行了 RT-PCR 检



A: RBSDV 及其近缘病毒系统进化树

B: SRBSDV 及其近缘病毒系统进化树

A: Phylogenetic tree of RBSDV and related viruses

B: Phylogenetic tree of SRBSDV and related viruses

RBSDV NC isolate 和 YX isolate: 采集于南昌县和永修县的水稻黑条矮缩病毒; SRBSDV CY isolate、DY isolate 和 JGS isolate: 采集于崇义县、大余县和井冈山市的南方水稻黑条矮缩病毒; RBSDV: 水稻黑条矮缩病毒; MRCV: 里奥夸尔托病毒; FDV: 斐济病病毒; RRSV: 水稻齿叶矮缩病毒; MRDV: 玉米粗缩病毒。

RBSDV NC isolate and YX isolate: Rice black-streaked dwarf virus from Nanchang County and Yongxiu County; SRBSDV CY isolate, DY isolate and JGS isolate: Southern rice black-streaked dwarf virus from Chongyi County, Dayu County and Jinggangshan County; MRCV: Mal de Rio Cuarto virus; FDV: Fiji disease virus; RRSV: Rice ragged stunt virus; MRDV: Maize rough dwarf virus.

图 3 RBSDV 与 SRBSDV 及其近缘病毒系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of RBSDV and SRBSDV and the near viruses

测, 对其在江西的分布特点进行了分析, 并分别基于 S9 和 S10 序列构建了 2 种病毒及其近缘病毒的系统发育树。

张松柏等^[10]通过电镜观察、S10 片段部分序列的相似性比对与系统进化树分析, 确定了造成湖南省水稻大面积矮缩的是 SRBSDV。本研究通过对江西 8 县市水稻矮缩病株的 RT-PCR 检测, 发现引起江西省大部分地区水稻矮缩的主要病原是 SRBSDV, 部分地区的病原是 RBSDV, 而有些地区同时有 2 种病毒分布。杨迎青等^[11]建立了 2 种病毒一步检测方法, 并对江西省大余县和南昌县的水稻矮缩样品进行了检测, 结果表明: 大余县的样品全部为 SRBSDV, 检出率为 100%; 南昌县的部分样品为 SRBSDV, 检出率为 70%, 另一部分样品为 RBSDV, 检出率为 30%。本研究对大余县矮缩样品检测结果与杨迎青等^[11]的检测结果一致, 即所有样品均为 SRBSDV; 对南昌县矮缩样品的检测结果与杨迎青等^[11]的检测结果略有差异, 杨迎青等^[11]通过 RT-PCR 检测发现南昌县水稻矮缩病以 SRBSDV 为主, 本研究的检测结果表明南昌县水稻矮缩病以 RBSDV 为主。存在差异的原因可能与样品采集时间及病毒流行规律有关。SRBSDV 的毒源主要靠白背飞虱传入, RBSDV 的毒源主要在本地。杨迎青等^[11]水稻矮缩样品的采集时间是 2010 年, 2010 年 SRBSDV 发生大流行, 所以 SRBSDV 大量传入, 引起南昌县 SRBSDV 毒源的大量增加; 本研究样品的采集时间是 2011 年, 2011 年 SRBSDV 全省发病较轻, 外来毒源减少, 主要以本地毒源为主, 所以 2011 年南昌县的病原以 RBSDV 为主。

同时, 本研究基于 S9 序列建立了 RBSDV 与其近缘病毒的系统发育树, 基于 S10 序列建立了 SRBSDV 与其近缘病毒的系统发育树, 明确了这 2 种病毒的系统发育关系, 研究结果与前人^[6, 10, 12]的结果大体一致, 支持了 Zhou 等^[6]将 SRBSDV 作为斐济病毒属 (*Fijivirus*) 一个新种的观点。

本研究系统检测了江西省永修县、南昌县和大余县等 8 县市水稻矮缩样品的 RBSDV 与 SRBSDV 带毒情况, 对这 2 种病毒在江西的分布特点进行了分析, 为有针对性地防治水稻矮缩病提供了依据; 分析了这 2 种病毒及其近缘病毒的系统发育关系, 明确了其分类地位。

参考文献:

- [1] Van Regenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop D H L. Taxonomy, classification and nomenclature of viruses: seventh report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. New York, San Diego: Academic Press, 2000: 615 - 645.
- [2] Fang S, Yu J, Feng J, et al. Identification of rice black-streaked dwarf Fijivirus in maize with rough dwarf disease in China [J]. Archives of Virology, 2001, 146(1): 167 - 170.

(下转第 927 页)

- [9]李龙,李建庆. 白僵菌代谢提取物对美国白蛾毒性生测方法的研究[J]. 山东林业科技, 2009(6): 29 - 31.
- [10]袁盛勇,孔琼,王丽波,等. 球孢白僵菌 MZ041016 菌株对小菜蛾的室内毒力测定[J]. 江苏农业科学 2007(6): 74 - 75.
- [11]袁盛勇,孔琼,陈斌,等. 球孢白僵菌 MZ050724 对亚洲玉米螟幼虫毒力研究[J]. 西南农业学报, 2011 24(2): 608 - 611.
- [12]陈炳旭,陆恒,董易之,等. 甜玉米亚洲玉米螟化学防治技术研究[J]. 广东农业科学, 2009(9): 93 - 95.
- [13]曹伟平,王刚,甄伟,等. 球孢白僵菌不同感染方式侵染棉铃虫幼虫的毒性比较及组织病理变化[J]. 昆虫学报 2011, 54(4): 409 - 415.
- [14]童应华. 感染萧氏松茎象绿僵菌菌株筛选及其致病机理研究[D]. 福州: 福建农林大学 2009: 24.
- [15]唐启义,冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社 2002: 223 - 225.
- [16]Nowierski R M, Zeng Z, Jaronski S, et al. Analysis and modeling of time-dose-mortality of *Melanoplus sanguinipes*, *Locusta migratoria migratorioides*, and *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) from *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Paecilomyces* isolates from *Madagascar* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1996 67: 236 - 252.
- [17]徐华潮,施祖华,吴鸿. 球孢白僵菌对竹梢白唇斑蚜的毒力[J]. 林业科学, 2006 42(1): 85 - 89.
- [18]何学友. 金龟子绿僵菌松墨天牛优良菌株筛选及其林间宿存研究[D]. 福州: 福建农林大学 2007: 45 - 52.
- [19]林春穆,罗群荣,张潮巨,等. 金龟子绿僵菌对浙江双栉蝠蛾幼虫的感染试验[J]. 福建林学院学报 2009 29(1): 41 - 44.
- [20]罗群荣. 浙江双栉蝠蛾幼虫的防治试验[J]. 福建林学院学报 2009, 29(3): 280 - 284.

(上接第 921 页)

- [3]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.
- [4]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.
- [5]张恒木. 水稻黑条矮缩病毒的分子生物学[D]. 杭州: 浙江大学 2001: 1 - 162.
- [6]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.
- [7]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.
- [8]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.
- [9]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.
- [10]张松柏,张德咏,刘勇,等. 2009 年造成湖南省水稻大面积矮缩的是南方水稻黑条矮缩病[J]. 植物保护 2010 36(4): 98 - 100.
- [11]杨迎青,周国辉,蒲玲玲,等. 2 种水稻矮缩病毒一步检测方法的建立[J]. 华中农业大学学报, 2012 31(3): 1 - 4.
- [12]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.
- [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(SRBSDV)基因组 S1-S8 序列分析及 RT-PCR 检测[D]. 广州: 华南农业大学 2010.