

应用 Real-Time RT-PCR 鉴定 2 个水稻品种(品系) 对水稻条纹病毒的抗性差异

杨金广, 方振兴, 张孟倩, 徐 飞, 王文婷, 谢荔岩, 林奇英, 吴祖建, 谢联辉

(福建省植物病毒学重点实验室, 福建农林大学 植物病毒研究所, 福建 福州 350002)

摘要:应用 Real-time RT-PCR 检测了水稻条纹病毒(*Rice stripe virus*, RSV)在 2 种水稻品种(品系)武育梗 3 号和 KT95-418 的悬浮细胞内复制变化和相对含量的差异, 结合传统生物学接种试验, 确定了这 2 个品种(品系)对 RSV 抗性的差异. 结果表明, RSV 在武育梗 3 号的悬浮细胞内 24 h 达到复制高峰, 病毒含量为侵染初期的 7.46 倍. 而在 KT95-418 的悬浮细胞内, RSV 达到复制高峰需要 36 h, 病毒含量为侵染初期的 4.51 倍. 利用病毒生物学接种的方法, 武育梗 3 号发病率达 91.7%, 而 KT95-418 仅为 36.0%. 由此可见, KT95-418 较武育梗 3 号对 RSV 具有较高的抗病性. 因此, Real-time RT-PCR 方法与传统生物学接种试验方法相比, 具有更高的准确性和灵敏性, 可以作为传统品种抗病性鉴定的验证手段.

关键词:Real-Time RT-PCR; 水稻; 水稻条纹病毒; 品种抗性; 悬浮细胞

中图分类号:S435.111.49

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)03-0025-04

Detection on Different Resistance of Two Rice Varieties Against *Rice stripe virus* in Real-Time RT-PCR

YANG Jin-guang, FANG Zhen-xing, ZHANG Meng-qian, XU Fei, WANG Wen-ting,

XIE Li-yan, LIN Qi-ying, WU Zu-jian, XIE Lian-hui

(Key Lab of Plant Virology of Fujian Province Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture
and Forest University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The different resistance against *Rice stripe virus* (RSV) between rice Wuyujing 3 and KT95-418 was investigated by detecting the replication cycle and relative amount of RSV in two varieties rice suspension cells by using Real-time RT-PCR assay and conventional RSV infected assay. The results showed that it needed 24 and 36 h when RSV replication reached its peak in rice suspension cells of Wuyujing 3 and KT95-418 respectively, and at their peaks, the amount of RSV increased 7.46 and 4.51 times respectively. The infected incidences of Wuyujing 3 and KT95-418 were 91.7% and 36.0% by conventional RSV infected method. It was showed that KT95-418 had higher resistance against RSV than Wuyujing 3. In comparison with conventional RSV infected methods, Real-time RT-PCR assay was more accurate and sensitive, and would be used to validate the result of conventional RSV infected assay.

Key words: Real-Time RT-PCR; rice; *Rice stripe virus* (RSV); variety resistance; suspension cells

水稻条纹病毒(*Rice stripe virus*, RSV)是由灰飞虱^[1], 该病毒引起的水稻条纹叶枯病是我国温带和亚热带稻区的主要病害^[2]. 从 1999 年以来, 该病害

收稿日期: 2007-11-16

作者简介: 杨金广(1979—), 男, 博士研究生; 通讯作者: 谢联辉(1935—), 男, 教授, E-mail: fjsxh@126.com

基金项目: 国家 973 项目(2006CB100203); 教育部博士点专项科研基金(20040389002; 20050389006); 国家自然科学基金(30671357); 福建省教育厅科技三项费用(K03005)

在江苏、安徽、浙江、河南、山东、辽宁、云南、北京和上海等地流行暴发,给当地稻米生产造成巨大损失,引起社会的广泛关注^[3]。感病品种的大面积栽培是造成该病害大规模暴发流行的主要因素之一。因此,筛选和培育抗病品种是解决该病害危害最为经济有效的措施。当前,在品种抗病性筛选中,多采用田间小区试验和实验室的病毒生物学接种试验,这些方法均费时费力,并且因传播介体灰飞虱传毒效率的差异,易造成较大的试验结果误差。笔者所在实验室已筛选出2个水稻品种(品系)武育梗3号和KT95-418对RSV的抗性存在显著差异。其中KT95-418是从武育梗3号高发田间筛选出的单株抗病植株,推测可能为武育梗3号感病品种变异而来的抗病新品系。田间小区试验和实验室传统生物学接种试验均显示KT95-418较武育梗3号对RSV具有较高的抗病性。为进一步验证病毒生物学接种的试验结果,本研究通过Real-Time RT-PCR检测RSV在这2个水稻品种(品系)悬浮细胞内复制情况的变化,以期从细胞水平揭示两者对RSV的抗性差异,来探讨两者抗性差异的原因。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻品种武育梗3号和水稻新品系KT95-418,福建省植物病毒学重点实验室保存。

毒源分别采自江苏洪泽(HZ)和云南楚雄(CX)水稻田间呈典型水稻条纹叶枯病症状的病株,经RT-PCR鉴定后,保存于水稻(台中1号)植株上。发病病株用于水稻条纹病毒(*Rice stripe virus*, RSV)提纯^[4]。RSV经灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 高效传毒于二叶期水稻幼苗,并在28℃、14 h光照/10 h黑暗、防虫条件下培养,10 d后,观察待试植株症状发生,30 d后,统计发病结果,3次重复,接种总株数武育梗3号为192株、KT95-418为186株。以发病率表示其抗病性的差异,其差异显著性通过 t 检验进行分析。

1.2 水稻悬浮细胞培养与RSV侵染

参照Yang等^[5]的方法。

1.3 Real-Time RT-PCR检测

取植物样品0.1 g,用1 mL TRIZOL试剂(Invitrogen, USA)提取总RNA,方法按产品说明进行。

应用PerlPrimer软件进行Real-Time PCR引物设计^[6]。为保证所设计引物特异性,所选引物均在GenBank数据库Blast程序下进行比较分析,以避免与水稻基因组序列同源。RSV CP基因保守区域5'端引物CP1为:5'-RTTGACAGACATACCAGCCAG-3'

(R = A/G); 3'端引物CP2为:5'-CATCATTCACCTCTCCAAATAACY-3'(Y = C/T)。水稻真核延伸因子基因(eukaryotic elongation factor 1- α gene, eEF-1 α)作为内参基因^[7], 5'端引物EP1为:5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3'; 3'端引物EP2为:5'-GACTTCCTTCACGATTCATCGTAA-3'。

1 μ g总RNA与1 μ L 3'端引物(10 pmol/L)混合后,于70℃处理10 min,再按照TaKaRa公司的Exscript™ RT reagent Kit试剂盒说明书进行cDNA第一链的合成。1 μ L cDNA用于Real-Time PCR检测,PCR在50 μ L反应体系中,在48孔MiniOpticon™ System (Bio-Rad, USA)进行以下反应。95℃预变性10 s后,进行45个循环(每个循环为95℃变性6 s, 62℃退火20 s)。然后进行融解曲线制作。

Real-Time RT-PCR扩增产物的特异性均通过10 g/L琼脂糖凝胶电泳和每个基因的融解曲线进行鉴定。利用一系列4倍稀释的cDNA作为模板进行Real-Time RT-PCR灵敏性检测和标准曲线构建。根据参比基因对所有样品进行归一化处理(初始RNA量校正),然后确定每个目的基因在不同样品中的相对表达量。每个试验样品重复检测3次,并至少进行2次生物试验重复。

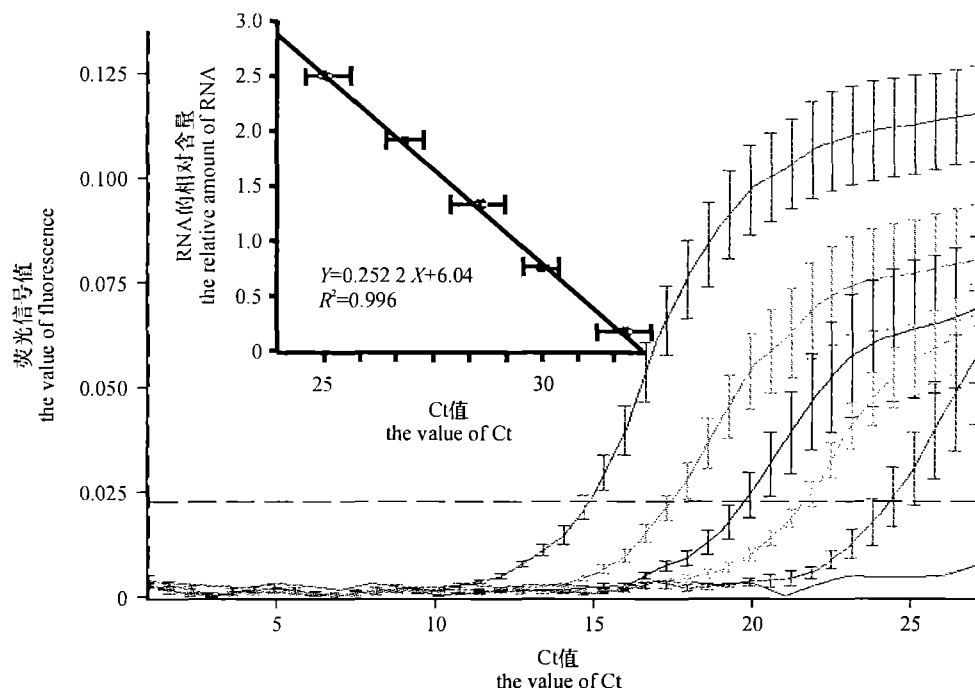
2 结果与分析

2.1 武育梗3号和KT95-418的病毒生物学特征

武育梗3号和KT95-418二叶期水稻幼苗接种RSV后,10~20 d内表现症状,2个品种(品系)发病症状无明显差异,发病后期(接种后30 d)病株均枯死。但武育梗3号发病率为91.7%,而KT95-418发病率仅为36.0%。通过 t 检验分析发现 P 为0.000 05,说明武育梗3号和KT95-418对RSV的抗病性存在明显差异($P < 0.05$),KT95-418品系较武育梗3号对RSV具有较高的抗性。

2.2 水稻悬浮细胞内RSV CP基因的扩增及标准曲线的建立

通过采用特异性引物CP1/CP2对水稻病株和RSV侵染后的水稻悬浮细胞进行Real-time RT-PCR检测,均能检测到条带单一、大小为243 bp的PCR产物。以同体积的PEG介导液处理的健康水稻悬浮细胞为对照样品,经Real-Time RT-PCR分析后,未发现特异性的荧光信号,说明该对引物特异性强,适合SYBR Green染料法的Real-Time RT-PCR检测。将CP基因cDNA进行4倍稀释5个梯度,得到CP基因的标准曲线方程为 $Y = -0.252 2X + 6.04$,相关系数(R^2) = 0.996(图1),表明该引物对检测RSV CP基因具有较高的灵敏性。



扩增曲线从左到右分别是 CP 基因的 cDNA 稀释 4^0 、 4^1 、 4^2 、 4^3 和 4^4 倍为底物的扩增曲线
Shown from left to right are the curves of decreasing concentrations of cDNA with 4^0 、 4^1 、 4^2 、 4^3 and 4^4 -fold dilution

图1 RSV CP 基因的扩增曲线与标准曲线

Fig.1 Amplification curve and standard curve of RSV CP gene

2.3 武育梗 3 号和 KT95-418 悬浮细胞内 CP 基因表达差异的分析

RSV 侵染水稻悬浮细胞后 6 h, 开始对细胞内 RSV CP 基因的相对表达量进行分析。结果(图 2)表明, RSV 侵染武育梗 3 号悬浮细胞 24 h 达到复制高峰, CP 基因相对表达量是侵染后 6 h 的 7.46 倍。而在 KT95-418 悬浮细胞中, RSV 侵染 36 h 后才能达到复制高峰, CP 相对含量仅为侵染初期的 4.51 倍。由此可见, RSV 在 KT95-418 悬浮细胞中复制受阻, KT95-418 表现出更高的抗性。

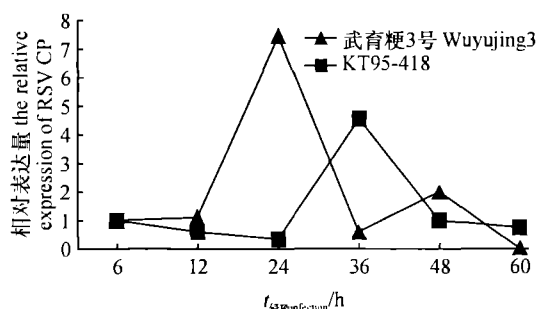


图2 RSV 在武育梗 3 号和 KT95-418 悬浮细胞中的复制变化与相对含量变化

Fig.2 The change of RSV replication and relative amount in rice suspension cells of Wuyujing 3 and KT95-418

3 讨论

基于 SYBR Green 染料法的 Real-Time RT-PCR 检测中引物设计是 PCR 扩增获得成功的关键之一。

引物首先要求对被检测基因具有很高的特异性, 所设计引物的被扩增片段通常介于 80 ~ 300 bp 之间, 片段越小定量扩增结果就越精确^[8], 本研究所选择的扩增片段为 243 bp, 且扩增产物单一, 在无病毒侵染的水稻悬浮细胞内, 没有检测到任何扩增信号和 PCR 产物。这说明 CP1/CP2 对 RSV 检测具有很高的特异性。为了有效地检测 RSV CP 基因, 笔者对 GenBank 中已有的 RSV CP 基因进行了分析比较, 选择 CP 最保守区域进行引物设计, 以保证所设计引物能够扩增出目前已知的所有 RSV 分离物。

当前, 由 RSV 引起的水稻条纹叶枯病是我国水稻种植区最主要病毒病, 种植抗病品种是防治该病害最为经济有效的措施。因此, 抗病品种的筛选和培育成为目前的主要任务。但在传统的抗病品种筛选中, 多采用传统病毒生物学接种方法, 此方法需要饲养大量的传播介体灰飞虱, 而对其饲毒、传毒、观察病害发生情况等, 均需要大量的人力和较长的周期。同时, 由于灰飞虱不同群体间存在着传毒效率的差异^[9], 且灰飞虱传毒具有间歇性, 这些特点均易造成较大的实验误差, 需要大量的重复试验来进行验证。本研究利用 RSV 侵染水稻悬浮细胞体系, 通过 Real-Time RT-PCR 检测 RSV CP 基因在寄主细胞内表达含量的变化, 结合传统的品种抗病性检测的结果来分析比较寄主抗病性的差异。该方法可以快速、灵敏、准确地鉴定出 2 种及 2 种以上品种的抗性差异, 为抗病品种鉴定和抗性种质资源的筛选提供了准确

可靠的方法。但该方法的弊端是,在检测鉴定过程中,水稻悬浮细胞培养需要严格地无菌操作和专业无菌实验室,同时 Real-Time RT-PCR 则需要精密、昂贵的仪器和复杂的操作程序以及繁琐的分析过程。这些很难在基层得以普及,目前只能适合在实验室中对传统的生物学鉴定的结果进行必要的验证和补充。因此,目前传统生物学接种试验和田间小区试验暂时依然是验证品种抗病性差异的主要技术手段。

参考文献:

- [1] TORIYAMA S. *Rice stripe virus*: Prototype of a new group of viruses that replicate in plants and insects[J]. Microbiological Sciences, 1986, 3: 347-351.
- [2] 林奇英,谢联辉,周仲驹,等. 水稻条纹叶枯病的研究: I. 病害的分布和损失[J]. 福建农学院学报, 1990, 19(4): 421-425.
- [3] 魏太云. 水稻条纹病毒的基因组结构及其分子群体遗传[D]. 福州: 福建农林大学植物保护学院, 2003.
- [4] TORIYAMA S. Characterization of *Rice stripe virus*: A heavy component carrying infectivity [J]. Journal of General Virology, 1982, 61: 187-195.
- [5] YANG W, WANG X, WANG S, et al. Infection and replication of a planthopper transmitted virus—*Rice stripe virus* in rice protoplasts [J]. Journal of Virological Methods, 1996, 59: 57-60.
- [6] MARSHALL O J. PerlPrimer: Cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR [J]. Bioinformatics, 2004, 20: 2471-2472.
- [7] JAIN M, NIJHAWAN A, TYAGI A K, et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 345: 646-651.
- [8] MEYER R, JACCAUD E. Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of glyphosphate-tolerant soybeans [C]//AMADÒ R, BATTAGLIA R. Proceedings of the Ninth European Conference in Food Chemistry, Authenticity and Adulteration of Food – the Analytical Approach. Switzerland: Interlaken, 1997: 23-28.
- [9] 曲志才,马向前,白逢伟,等. 活跃传毒介体灰飞虱 *Laelodelphax striatellus* 品系的杂交与选育[J]. 复旦学报: 自然科学版, 2002(6): 91-94.

【责任编辑 周志红】

(上接第24页)

地疫霉复合接种健康非洲菊后可加速非洲菊根腐病的发病时间和加重其发病症状。

参考文献:

- [1] 曹荣祥,邵和平,魏启舜,等. 非洲菊根腐病的发生与防治[J]. 植物保护, 1998, 24(2): 28-30.
- [2] 李华勇,许大光,郑勤. 非洲菊根腐病的发生与防治方法探讨[J]. 安徽农业科学, 2003, 31(4): 659-661.
- [3] 徐秉良,郁继华,王国平. 非洲菊枯萎病病原菌鉴定及药剂防治[J]. 植物保护, 2002, 28(5): 32-33.
- [4] 徐秉良,郁继华,徐琼. 非洲菊枯萎病菌的生物学特性[J]. 甘肃农业大学学报, 2002, 37(1): 35-39.
- [5] VANOS E A, BRUINS M, WOHANKA W, et al. A technique to minimise the risks of spreading root-infecting pathogens in closed hydroponic systems[J]. Acta Horticulturae, 2001, 559(2): 495-502.
- [6] SUNITA S, GUPTA A K, SEN S. New records of fungi on ornamental plants from Himachal Pradesh[J]. Plant Disease Research, 1996, 11(2): 177-178.
- [7] 谢为龙,谭群英,李冠雄,等. 珠海非洲菊疫病的鉴定和防治[J]. 植物保护, 1999, 25(3): 13-15.
- [8] 谢为龙,谭群英. 隐地疫霉的鉴定和处理[J]. 植物检疫, 2001, 15(4): 198-200.
- [9] 郭成宝,张正光,王源超,等. 非洲菊疫霉根腐病的快速分子诊断[J]. 植物病理学报, 2006, 36(2): 97-101.
- [10] 张正光,郭成宝,王源超,等. 非洲菊根腐病病原的鉴定与 ITS 序列分析[J]. 植物病理学报, 2005, 35(5): 392-396.
- [11] 曾会才,HO H H,蒲金基,等. 海南非洲菊根腐病病原的分离与鉴定[J]. 菌物系统, 2003, 22(2): 314-318.
- [12] THINGGAARD K, ANDERSEN H. Influence of watering frequency and electrical conductivity of the nutrient solution on *Phytophthora* root rot in pot plants of gerbera[J]. Plant Disease, 1995, 79(3): 259-263.
- [13] LEBRUN D. Methods of control for *Phytophthora cryptogea* on gerbera and *P. cinnamomi* on chamaecyparis[J]. PHM Revue Horticole, 2002, 442: 12-16.
- [14] 冯光恒,王继华,王丽花,等. 昆明地区非洲菊疫病的 PCR 技术检测[J]. 西南农业学报, 2004, 17: 221-223.
- [15] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [16] 王拱辰,郑重,叶琪明,等. 常见镰刀菌鉴定指南[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996.
- [17] 余永年. 中国真菌志: 6 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [18] HE Y Q. An improved protocol for fungal DNA preparation[J]. Mycosystema, 2000, 19(3): 434.
- [19] 李海燕,刘惕若,甄艳,等. 辣椒品种对疫病的抗性研究: I. 不同互作中的水解酶活性及其与抗性的关系[J]. 中国农学通报, 2005, 21(6): 322-325.

【责任编辑 周志红】