

·技术与方法·

单头灰飞虱体内水稻条纹叶枯病毒的快速检测

曲志才^{1*}, 沈大棱²

¹曲阜师范大学生命科学学院, 曲阜 273165; ²复旦大学遗传学研究所, 上海 200433

摘要 利用RT-PCR检测感病植株和单头带毒灰飞虱, 均扩增出水稻条纹叶枯病毒特有的一个长540 bp的片段, 且人工饲毒虫的病毒含量高于自然感病稻田虫。以病毒S蛋白的多克隆抗血清, 采用Western印迹技术从单虫体内检测到病毒抗原的2个专一性条带, 大小分别为20.7和19.7 kDa。DIBA (dot immunobinding assay)检测法快速、简便, 但专一性和灵敏度不及RT-PCR与Western印迹检测。对不同检测方法所得昆虫带毒率差异的原因进行了探讨。

关键词 灰飞虱, 水稻条纹叶枯病毒, 病毒检测

曲志才, 沈大棱 (2008). 单头灰飞虱体内水稻条纹叶枯病毒的快速检测. *植物学通报* 25, 459–464.

自20世纪60年代在江浙发现水稻条纹叶枯病(rice stripe)以来, 至今该病在国内16个省区均有发生, 已成为我国分布最广的一种水稻病毒病(林奇英等, 1990)。近年来, 该病在苏、鲁、豫、沪和浙等地发病严重, 其危害程度呈逐年加重的趋势。2004年仅江苏省就有数万公顷稻田绝收(任春梅等, 2007)。病害的病原是水稻条纹叶枯病毒(rice stripe virus, RSV), 由介体灰飞虱(*Laodelphax striatellus*)以持久方式经卵传给后代, 引起病毒病蔓延流行(Toriyama, 1986)。介体的传毒活动虽然能引起病毒病蔓延流行, 然而介体的群体中并非都是带毒者。由于自然种群的介体昆虫在传毒能力上是异质性的, 同种介体中有些种群与病毒亲和, 有些种群与病毒不亲和。因此, 介体的数量有时与病毒的流行并不呈直接作用关系, 而是与带毒的介体直接相关(曲志才等, 2002)。所以, 介体带毒的百分率是更为关注的流行因素。在农业实践中, 要准确预测、预报水稻条纹叶枯病的发生, 不仅需要知道介体灰飞虱的数量, 同时还必须测定感病稻田灰飞虱的带毒百分率(吕永平等, 2002)。

目前检测植物病毒的方法较多, 其中酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是常用的血清学测试手段, 但该方法灵敏度不高, 检测结果不够理想(秦文胜等, 1994; Farinelli and Oliveira, 1996)。

近年来, 有报道以RSV外壳蛋白制备高特异性的单克隆抗体, 通过ELISA技术检测灰飞虱的带毒率(王贵珍等, 2004)。但RSV单抗的制备比较繁琐, 技术要求高。胶乳凝聚测试是一种准确、可靠的血清学诊断方法, 但使用该法突出的问题是某些昆虫匀浆物可能干扰抗血清的胶乳凝聚作用(Omura et al., 1984)。PCR技术已用于植物材料的病毒检测, 特别是利用反转录-PCR(RT-PCR)检测一些含量较低的植物RNA病毒, 其效果比ELISA方法更好(Farinelli and Oliveira, 1996; Lopez et al., 2003)。

目前在介体昆虫体内检测RSV的研究已有一些报道(秦文胜等, 1994; Qu et al., 1999; Cai et al., 2003; 王贵珍等, 2004)。本文利用改进的病毒RNA提取方法, 以RSV已知序列合成特异引物, 利用RT-PCR技术对水稻植株及单头灰飞虱进行病毒检测; 用RSV致病专一蛋白(stripe disease-specific protein, S蛋白)(Toriyama, 1986)的抗血清, 通过斑点免疫结合法(dot immunobinding assay, DIBA)及Western印迹技术检测单虫体内的病毒抗原, 以期探索致病蛋白在介体昆虫中的表达情况, 进而测定灰飞虱群体的带毒率。本研究为提高水稻病毒病害预测、预报的准确性以及流行病学研究提供了理论和实验依据。

收稿日期: 2007-08-24; 接受日期: 2008-01-29

基金项目: 山东省自然科学基金(No.Z2002D02)和美国McKnight基金(No.14001404)

* 通讯作者。E-mail: zcqu@mail.qfnu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 实验材料和试剂

供试灰飞虱(*Laodelphax striatellus*)和毒源水稻(*Oryza sativa*)材料均采自云南姚安感病稻田,昆虫于70%乙醇4°C保存,用于RT-PCR分析或血清学检测。同时以健康水稻或未饲毒的灰飞虱作为对照材料。

血清学检测的初级抗体为S蛋白的多克隆抗血清(Qu et al., 1999),次级抗体为碱性磷酸酶偶联的羊抗兔IgG及其底物BCIP/NBT(Sigma)。硝酸纤维素膜(NC)为Hybond-c extra(Amersham)。SuperScript II反转录酶为Gibco BRL产品。Taq DNA聚合酶及其它主要分子生物学试剂和药品均为国产产品。

1.2 灰飞虱的饲毒和传毒

从非感病稻田捕捉2-3龄灰飞虱若虫,在表现典型症状的病稻上饲毒48小时,编号后转移到健康水稻上,单虫单苗单管饲养2周。对号收集最后成活的灰飞虱,作为RT-PCR或免疫检测的饲毒虫材料。将接种过的水稻对号移栽到防虫网室,并将检测结果与相应的水稻植株发病情况进行比较,以确定某号昆虫是否为传毒者。

1.3 RT-PCR方法检测RSV

1.3.1 引物的设计与合成

根据本实验室克隆的RSV组分2编码糖蛋白的基因设计1对专一性引物,用于不同寄主体内RSV基因组的反转录。引物由上海生物工程技术有限公司合成,分别为F: 5'-CATTTTAAATCATATTTTC-3' (34-51), R: 5'-GGGCTTGATTGCAACACC-3' (559-576)。

1.3.2 病毒RNA的提取与cDNA合成

病毒RNA的提取主要参考Singh等(1995)的方法并略有改进。取单头灰飞虱或50 mg水稻病苗,液氮研磨,单虫加50 μ L RNA提取缓冲液(200 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.5, 1.5% 十二烷基磺酸锂, 300 mmol·L⁻¹ LiCl, 10 mmol·L⁻¹ EDTA, 1% NP-40, 1% β -巯基乙醇); 植物材料加2.5倍体积提取缓冲液,充分混匀,加1.6倍体积的

5 mol·L⁻¹ 醋酸钾(pH 6.5), 14 000 \times g离心45分钟,收集上清液,加20 μ g糖原,用等体积异丙醇沉淀病毒RNA, 14 000 \times g离心30分钟,用70%乙醇洗涤。从单虫或感病水稻中提取的病毒RNA分别溶于50 μ L或100 μ L双蒸水,用于cDNA合成。

按以下反应合成cDNA第1链: 1 μ L病毒RNA提取物, 20 μ mol·L⁻¹反向引物0.5 μ L, 40 U· μ L⁻¹ RNA酶抑制剂0.25 μ L, 0.25 μ L甲酰胺, 4 μ L双蒸水。上述各成分充分混匀后,65°C处理10分钟,冰上放置5分钟。再加入10 \times PCR缓冲液(Gibco BRL)1 μ L, 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 1 μ L, 100 mmol·L⁻¹ DTT 1 μ L, 10 mmol·L⁻¹ dNTPs 0.5 μ L, 200 U· μ L⁻¹ SuperScript II反转录酶0.25 μ L, 双蒸水0.25 μ L。反转录反应条件: 42°C保温1小时,最后65°C 10分钟。取1.5 μ L用于PCR扩增。

1.3.3 cDNA的PCR扩增及电泳

在上述1.5 μ L反转录产物中加入10 \times PCR缓冲液(含Mg²⁺) 2.5 μ L, 10 mmol·L⁻¹ dNTPs 0.5 μ L, 20 μ mol·L⁻¹正、反向引物各0.5 μ L, 5 U· μ L⁻¹ Taq DNA聚合酶,加水至25 μ L。然后置于PCR仪(Tgradient 96)中反应。PCR程序为94°C 60秒, 47°C 45秒, 72°C 50秒, 35个循环;最后72°C延伸10分钟。

取10 μ L PCR反应产物,在1%琼脂糖凝胶中电泳1小时后,用溴化乙锭染色,最后使用凝胶成像系统观察并拍照。

1.4 介体昆虫体内RSV抗原的血清学检测

单头灰飞虱于50 μ L Tris-PVP(聚乙烯吡咯烷酮,分子量为40 kDa)缓冲液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.2, 0.02% (w/v) PVP)中匀浆,6 000 \times g离心1分钟。吸取5 μ L用于DIBA测试,取1 μ L上清液稀释5倍后进行15% SDS-PAGE分析。

用于DIBA和Western印迹测试的S蛋白抗血清效价分别为1:400和1:660,次级抗体效价均为1:10 000。具体操作步骤分别参照曲志才等(2002)和Qu等(1999)的方法。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR检测水稻植株中的RSV

利用 RT-PCR 技术对水稻病苗进行测试, 得到了预期长约 540 bp 的 DNA 片段(图 1), 健康植株未检测到任何 DNA 片段。说明 RT-PCR 方法能准确、有效地检测出水稻病株体内的 RSV, 检测灵敏度约为 20 μg 鲜重的病叶。由此可见, 以 RSV 的糖蛋白基因设计引物进行 RT-PCR 检测, 不仅特异性强, 且扩增效率高, 适于水稻植株 RSV 的鉴定。

2.2 单头灰飞虱体内 RSV 的 RT-PCR 检测

利用 RT-PCR 技术对单虫体内的 RSV 进行检测, 无论是人工饲毒虫还是乙醇固定大田虫, 均得到长约 540 bp 的 DNA 片段(图 2)。但在病毒含量及检测特异性方面二者略有差异: 人工饲毒虫的病毒含量高(图 2A), 而乙醇固定大田虫检测的特异性不及饲毒虫(图 2B); 无毒昆虫未扩增到特异条带。表明 RT-PCR 能特异地检测出单头介体昆虫体内的 RSV, 其灵敏度为单虫病毒 RNA 提取物的 1/50。

在人工饲毒的情况下所检测的 113 头灰飞虱中, 有 33 头呈现出特异性条带(图 2A, 表 1), 即 RT-PCR 检测阳性率为 29.2%, 80 头无毒昆虫未扩增出预期大小的条带。将昆虫测试结果与相应水稻植株的发病情况进行比较, 发现所有传毒者 RT-PCR 检测均呈阳性(表 1), 即受试昆虫的传毒率为 5.31%, 而非传毒者显阴性。

为了解田间雌、雄虫自然带毒情况, 对介体昆虫带毒率进行统计分析。结果显示, 在测试的 80 头感病稻田中(6 月下旬)采集的灰飞虱(雌虫 58 头, 雄虫 22 头)中, 有 19 头为带毒虫, 其中雌虫 15 头, 雄虫 4 头, 总带毒率为 23.75%, 即为当年感病稻田介体种群的自然带毒率。

从上述情况来看, 无论人工饲毒还是在自然条件下, 雌虫带毒率和获毒率均比雄虫高, 饲毒雌虫的传毒率也比雄虫高。这与 RSV 持久性经卵传播的特性是一致的。

2.3 单头灰飞虱的血清学检测

2.3.1 DIBA 快速检测

从感病稻田采回的灰飞虱种群中随机挑选 4 龄以上若虫

及成虫(6 月下旬采集)进行 DIBA 检测。结果表明, 在测试的 745 头灰飞虱中, 133 头(均为雌性)呈阳性反应(图 3), 带毒率为 17.85%, 检测灵敏度仅为单虫病毒抗原提取物的 1/10, 无毒虫对照呈阴性反应。然而, 在 DIBA 检测呈阴性反应的雄虫中, RT-PCR 检测呈阳性的个体

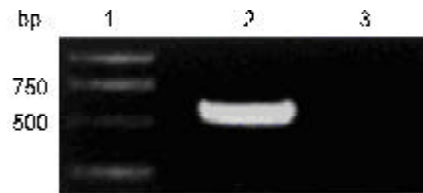


图 1 RT-PCR 检测水稻植株中的 RSV 电泳图谱

1: DNA 标准样品(DL 2000); 2: 水稻病株; 3: 健康水稻

Figure 1 Agarose gel analysis of RT-PCR products of RSV in rice plants

1: DNA marker(DL 2000); 2: Virus-infected rice plant; 3: Healthy rice plant

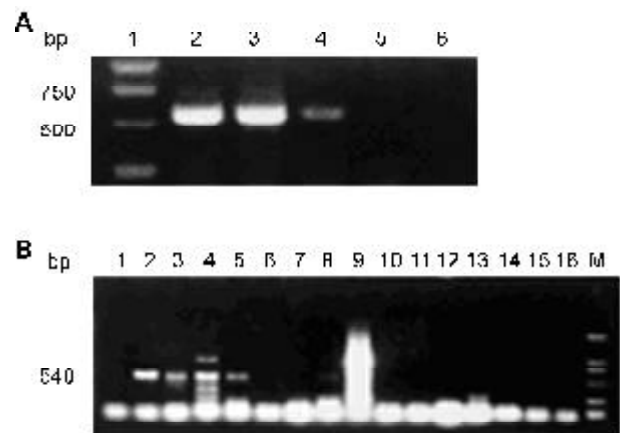


图 2 RT-PCR 检测单头灰飞虱体内的 RSV 电泳图谱

(A)人工饲毒虫 1: DNA 标准样品(DL 2000); 2-4: RT-PCR 阳性; 5, 6: RT-PCR 阴性; (B)乙醇固定大田虫 M: DNA 标准样品(DL 2000); 2-5, 8: RT-PCR 阳性; 1, 6, 7, 9-16: RT-PCR 阴性

Figure 2 Agarose gel analysis of RT-PCR products of RSV from individual planthopper

(A) Feeding insects 1: DNA marker (DL 2000); 2-4: Positive by RT-PCR; 5, 6: Negative by RT-PCR; (B) Insects stored in 70% ethanol M: DNA marker (DL 2000); 2-5, 8: Positive by RT-PCR; 1, 6, 7, 9-16: Negative by RT-PCR

表 1 RT-PCR 检测灰飞虱获毒与介体传毒之间的关系

Table 1 Relationship between acquired vectors of planthoppers and viruliferous transmitter detected by RT-PCR assay

	No. of insects tested	Positive reaction by RT-PCR assay	Negative reaction by RT-PCR assay	Transmitter	Nontransmitter
Female	60	27	33	4	23
				0	33
Male	53	6	47	2	4
				0	47

30 头未饲毒虫作为对照

Thirty healthy insects (female or male) were used as controls

占 1.2%。

2.3.2 Western 印迹测定带毒虫的阳性率

利用 S 蛋白的抗血清, 从单虫病毒抗原提取物的 1/50 样品中检测到清晰的 2 个条带(图 4), 大小分别为 20.7 和 19.7 kDa。分子量和带谱均与水稻病株检测结果完全一致(Qu et al., 1999), 而无毒虫则没有任何条带。这是首次从单个介体昆虫中检测到 RSV 的 S 蛋白, 说明该蛋白的编码基因在不同宿主中的表达产物是一致的, 均为 2 条大小相近的条带。本研究结果与 Toriyama(1986) 采用 ELISA 方法在水稻中报道的结果相吻合。

对自然种群灰飞虱带毒率的检测表明, 在 86 头第一代若虫及其成虫(4 月中旬采集)中, 有 10 头 Western 印

迹检测呈阳性反应, 出现 2 条特异条带(图 4), 自然带毒率为 11.6%, 为当年本田期的主要毒源。

从 DIBA 检测呈阳性的 133 头雌虫中, 随机抽取 25 头, 对其剩余提取物进行 Western 印迹分析, 其中 18 头仍表现阳性反应, 占 72%, 另 7 头则呈阴性。可见, Western 印迹检测结果是高度特异的。

3 讨论

对于植株体内的 RSV 病毒, 虽然可以根据其发病症状来判断, 但植株从感染病毒到发病需要一段潜育期, 在此期间无法判断是否受病毒感染, 而且生物学症状判断易受寄主生理、环境条件和观察者经验等因素的影响(Omura et al., 1984)。而用 RT-PCR 检测可以避免这些因素的干扰, 并且具有专一性强、灵敏度高和快速而

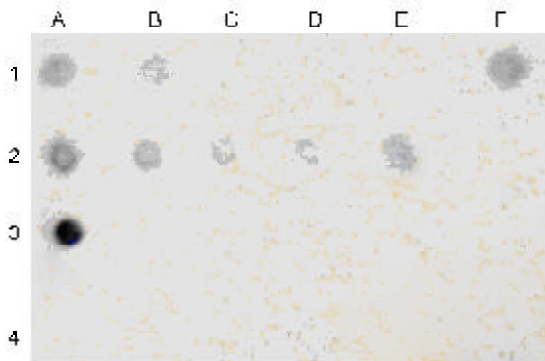


图 3 DIBA 检测单头灰飞虱

A - F: 不同介体昆虫; 1: 6 头饲毒虫; 2: 6 头乙醇固定虫; 3: 阳性对照(RSV 提取物); 4: 阴性对照

Figure 3 Detection of single planthopper by DIBA method

A - F: Individual planthopper; 1: Six of feeding insects; 2: Six of insects stored in 70% ethanol; 3: Positive control (RSV extract); 4: Negative control

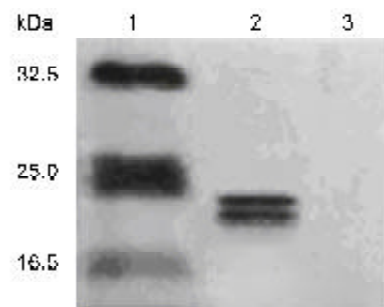


图 4 S 蛋白抗血清对单虫病毒抗原提取物的 Western 印迹分析

1: 蛋白标准分子(Biolab, UK); 2: 带毒虫; 3: 无毒虫

Figure 4 Western blotting of virus antigen extract from individual insect

1: Protein markers (Biolab, UK); 2: Viruliferous insects; 3: Non-viruliferous insects

准确等优点。对介体昆虫而言, 用生物学接种方法只能检测其传毒率, 而不能检测带毒率。基于介体灰飞虱间歇传毒的习性(Omura et al., 1984), 肯定存在带毒而不传毒的个体, 因此无法用生物学接种法检测, 而用 RT-PCR 方法能检测出仅含几个病毒分子的昆虫介体, 其检测结果反映真实的昆虫带毒率。因此, 本实验中所用的 RT-PCR 检测法比用生物学接种方法检测的昆虫带毒率要高。

在以往采用双重 RT-PCR 检测 RSV 的报道中, 以设计的 3 对引物进行扩增, 只有 1 对引物从水稻和昆虫体内得到预期结果, 用与本文相同的引物进行 RT-PCR, 仅从感病叶片中扩增出预期片段, 而虫体内未检测到特异条带(Cai et al., 2003)。本文采用改进的病毒 RNA 提取方法, 操作简单, 从而减少了病毒 RNA 的损失, 提高了 RNA 获得率, 特别适合从大批量不同寄主中提取病毒 RNA、以单一 RT-PCR 检测单虫或病株, 并且可在较短时间内完成。

虽然单虫 Western 印迹检测的条带大小及带型与水稻病苗检测的结果非常一致, 但初级抗血清的稀释度相差较大: 检测昆虫介体以 1:660 稀释, 而检测水稻病株的最高稀释度达 1:10 000(Qu et al., 1999)。可见 RSV 的 S 蛋白基因在不同寄主中其表达水平存在明显差异。该蛋白在病毒感染的水稻植株中大量积累, 其含量与病害症状的严重程度密切相关(Toriyama, 1986)。RSV 的 S 蛋白在不同寄主中积累量差异的原因尚需进一步研究。

Western 印迹测试灵敏度高, 专一性强, 但操作复杂, 需要特殊设备, 不适于大批量样品的检测。DIBA 测试快捷、简便易行, 整个过程仅需 4 - 6 小时, 成本低, 无需太多设备, 适于田间灰飞虱的带毒率测定。但该方法只适合定性检测, 主要缺点是有非特异性反应的干扰(刘永清等, 2005)。本研究中也出现上述情况: 经 DIBA 检测呈阳性的雌虫, 有 28% 的个体 Western 印迹分析呈阴性, 而 DIBA 检测呈阴性的雄虫, 有 12% 的个体 RT-PCR 检测呈阳性。实验表明, 经无毒虫提取物吸附抗血清或适当提高抗血清的稀释度可以降低 DIBA 测试的非特异性反应, 减少背景反应和干扰信号

的出现。

RT-PCR 和 Western 印迹检测自然种群单头灰飞虱的带毒率显示: 前者带毒率为 23.75%, 后者仅为 11.6%。其差别的原因可能有 3 方面。(1) Western 印迹检测的是第 1 代若虫及成虫的带毒率, 而 RT-PCR 检测的是 6 月下旬采集的样本, 此时恰为水稻条纹叶枯病高发期, 带毒介体昆虫的数量有所上升。(2) 灵敏度和专一性可能不同。RT-PCR 技术是直接检测病毒 RNA, 而 Western 印迹是分析病毒基因表达的产物, 不仅涉及基因表达的调控, 而且杂交所用的多克隆抗血清也会影响检测的灵敏度和特异性。(3) 基于灰飞虱通过循环期后传毒或间歇传毒的习性(Omura et al., 1984), 有的个体可能吸毒有限, 血清学方法难以检测。因此, 在灰飞虱的带毒检测中, 除必须设置对照外, 最好使用 2 种以上方法进行测试, 以便为病毒病害的预测、预报提供可靠的实验数据。

参考文献

- 林奇英, 谢联辉, 周仲驹 (1990). 水稻条纹叶枯病的研究. 福建农学院学报 **19**, 421 - 425.
- 刘永清, 洪霓, 王国平 (2005). 葡萄斑点病毒的血清学检测技术. 果树学报 **22**, 289 - 291.
- 吕永平, 雷娟利, 金登迪, 陈声祥 (2002). 水稻黑条矮缩病毒的 RT-PCR 检测. 浙江农业学报 **14**, 117 - 119.
- 秦文胜, 高东明, 陈声祥 (1994). 灰稻虱体内水稻条纹叶枯病毒快速检测技术研究. 浙江农业学报 **6**, 226 - 229.
- 曲志才, 马向前, 白逢伟, 沈大棣 (2002). 活跃传毒介体灰飞虱 (*Laodelphax striatellus*) 品系的杂交与选育. 复旦大学学报 (自然科学版) **41**, 684 - 687.
- 任春梅, 程兆榜, 魏邦庆, 周益军 (2007). 江苏水稻条纹病毒致病型及其应用评价. 江苏农业科学 (3), 58 - 60.
- 王贵珍, 周益军, 陈正贤, 周雪平 (2004). 水稻条纹病毒单克隆抗体的制备及检测应用. 植物病理学报 **34**, 302 - 306.
- Cai LJ, Ma XZ, Kang L (2003). Detecting rice stripe virus in the small brown planthopper (*L. striatellus*) with high specificity by RT-PCR. *J Virological Methods* **112**, 115 - 120.
- Farinelli L, Oliveira D (1996). Application of the polymerase chain reaction to the detection of plant viruses. *Agro-Food-Industry Hi-Tech* **7**, 7 - 10.
- Lopez M, Bertolini E, Olmos A (2003). Innovative tools for

- detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *Int Microbiol* **6**, 233-243.
- Omura T, Hibino H, Usugi T** (1984). Detection of rice viruses in plants and individual insect vectors by latex flocculation test. *Plant Disease* **68**, 374-378.
- Qu ZC, Shen DL, Tan JZ** (1999). Western blotting of RSV gene products in rice and insects. *Chin J Gene* **26**, 331-337.
- Singh P, Kurz J, Boite au G** (1995). Detection of potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *J Virological Methods* **55**, 133-143.
- Toriyama S** (1986). Rice stripe virus: prototype of a new group of viruses that replicate in plants and insects. *Microbiol Sci* **3**, 347-351.

Rapid Methods for the Detection of Rice Stripe Virus in Single Planthopper (*Laodelphax striatellus*)

Zhicai Qu^{1*}, Daleng Shen²

¹College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu 273165, China

²Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract RT-PCR was used to detect rice stripe virus (RSV) in single viruliferous planthoppers (*Laodelphax striatellus*) and in infected rice plants. A 540 bp product was specifically amplified, and its content was higher in artificially feeding insects than in naturally infected insects in the rice field. Western blot analysis revealed two protein bands, of 20.7 and 19.7 kDa, detectable from individual planthoppers by use of polyclonal antiserum against S protein (stripe disease-specific protein). The DIBA (dot immunobinding assay) method is fast and simple to use in the detection of RSV antigen in single insects but has lower sensitivity and specificity than both RT-PCR and Western blot analysis. Possible explanations were discussed for the difference in proportion of RSV in *L. striatellus* found with use of these methods.

Key words *Laodelphax striatellus*, rice stripe virus, virus detection

Qu ZC, Shen DL (2008). Rapid methods for the detection of rice stripe virus in single planthopper (*Laodelphax striatellus*). *Chin Bull Bot* **25**, 459-464.

* Author for correspondence. E-mail: zcqu@mail.qfnu.edu.cn

