

吴淑华,杜琳琳,兰莹,等. 冷冻法处理带毒灰飞虱研究初报[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):117-118.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.039

冷冻法处理带毒灰飞虱研究初报

吴淑华,杜琳琳,兰莹,王美芳,周益军

(江苏省农业科学院植物保护研究所,江苏南京 210014)

摘要:为了加快灰飞虱传病毒病接种鉴定的速度,研究了冷冻处理带毒灰飞虱的最佳时间以及对灰飞虱传毒及羽化能力的影响。结果表明, -20 ℃ 冷冻处理带毒灰飞虱 20 min 不影响灰飞虱传播水稻条纹病毒,冷冻处理对灰飞虱传毒能力和羽化的影响不明显。

关键词:冷冻法;水稻条纹病毒;灰飞虱;传毒;羽化

中图分类号: S435.112+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0117-02

水稻条纹叶枯病是由灰飞虱(*Laodelphax striatellus* Fallén)传播水稻条纹病毒(rice stripe virus,RSV)引起的一种重要的水稻病害^[1],最早于 1897 年在日本关东地区发生^[1]。在我国,该病于 1963 年在江苏南部地区始发^[2],目前已扩及到全国 18 个省(市、自治区),其中以江苏、浙江、山东、河南、云南等地粳稻田发病更为普遍,20 世纪 90 年代在全国粳稻种植区流行,造成水稻严重减产^[3]。在江苏省,该病 1998 年在部分稻区流行,2001 年在大部分稻区暴发流行且不断蔓延,2002 年重病田病株率 50%^[4],2004 年发病面积占江苏水稻种植面积的 79%,部分田块绝收,2005 年发病面积持续扩大,并开始向浙江、安徽、河南、山东、上海等周边省(市)蔓延,引起了很大社会反响^[5]。在江苏建湖等地,还发现水稻条纹病毒危害小麦的现象^[6]。2005 年以后,江苏省通过推广防控技术和种植抗病品种,使水稻条纹叶枯病的危害逐渐降低。然而,鉴于病毒病害突发性和爆发性的特点,以及单一抗性基因存在的隐患,新抗性资源的继续发掘和抗性品种的选育刻不容缓。

抗病新资源的发掘和新抗性品种的选育,首先需要稳定、科学的接种鉴定方法,周彤等建立的水稻条纹叶枯病苗期接种鉴定方法^[7]稳定可靠,是水稻条纹叶枯病抗性鉴定的首选方法,但是接种鉴定过程中发现,由于传毒介体灰飞虱的移动性较强,定量接种灰飞虱成为一件操作复杂而繁琐的工作。本试验对冷冻法处理带毒灰飞虱进行了研究,为水稻条纹叶枯病等灰飞虱传病毒病的接种鉴定提供了一种处理携带病毒灰飞虱的新方法(国家发明专利^[8]),大大加快了灰飞虱传病毒病接种鉴定的速度,为加快抗病品种的鉴定速度和选育进程提供了技术支持。

收稿日期:2014-03-25

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)1003];国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201003031);江苏省科技支撑计划(编号:BE2012303)。

作者简介:吴淑华(1962—),女,副研究员,研究方向为水稻病毒病。

E-mail:kingplasmid@gmail.com。

通信作者:周益军,博士,研究员,博士生导师,研究方向为植物病毒病。

E-mail:yjzhou@jaas.ac.cn。

1 材料与方法

1.1 水稻材料和传毒介体

水稻材料:感病品种武育梗 3 号(武进稻麦良种场提供)。

传毒介体灰飞虱的筛选与饲养:2005 年从江苏省海安县水稻条纹叶枯病重病区稻田采集灰飞虱若虫,在育有武育梗 3 号幼苗的玻璃杯中饲养,交配后单头雌虫单独产卵,雌虫产卵后采用周益军等的方法^[9]检测其携带 RSV 情况,带毒雌虫后代在育有武育梗 3 号幼苗烧杯中饲养,饲养 2~3 代后同上法再筛选 1 次,所得纯系经 2~3 代扩繁后用于接种试验。试验过程中定期进行筛选,使供试虫的带毒率维持在 80% 以上。

1.2 冷冻时间梯度

取 6 个干燥玻璃杯并编号,每杯放 100 头 3~5 龄带毒灰飞虱,纱布封口后,放于 -20 ℃ 冰箱冷冻处理,并开始计时,每 10 min 取出 1 杯,取出后迅速将灰飞虱倒于白纸上,观察并记录灰飞虱活跃状态、苏醒时间及死虫数,调查完后将冷冻过的灰飞虱在育有武育梗 3 号幼苗的 1 000 mL 烧杯中单独饲养,第 2 天统计死亡虫数。

1.3 冷冻灰飞虱对其传毒能力的影响

武育梗 3 号浸种、催芽,至 0.5 叶时播于 250 mL 玻璃杯中,每杯播 12 株,共 6 杯。从带毒灰飞虱群体取 130 头, -20 ℃ 冰箱中冷冻 20 min,然后取 120 头接种武育梗 3 号 1.5 叶龄幼苗,重复 3 次;另外取 120 头不经冷冻处理的带毒灰飞虱接种武育梗 3 号 1.5 叶龄幼苗,重复 3 次。玻璃杯纱布封口,于 22 ℃、光周期 14 h 光照/10 h 黑暗条件下饲养,48 h 后移走全部灰飞虱,移栽大田,移栽 7 d 后开始调查,每隔 1 d 调查 1 次,共调查 15 次,以最后一次调查结果计算发病率。

1.4 冷冻灰飞虱对其羽化的影响

灰飞虱 4 龄若虫置于 -20 ℃ 冰箱冷冻处理 20 min,转移至育有武育梗 3 号幼苗的 250 mL 玻璃杯中饲养,每杯 30 虫,共 5 杯。若虫羽化后,统计羽化成虫数,计算羽化率。饲养若虫的水稻苗继续管理,直至冷冻灰飞虱所产的卵孵化。

2 结果与分析

2.1 灰飞虱冷冻时间

对灰飞虱 -20 ℃ 冷冻处理 10 min,不昏迷、仍可跳动,仍不利于纸上计数,但随着冷冻时间延长,灰飞虱的生命力受到影响。冷冻 40 min 以上,死亡率达约 17%,死亡率和复苏时间都随冷冻时间的延长而增大(表 1)。综合复苏时间与死亡率,带毒灰飞虱冷冻处理以 -20 ℃、20 min 较合适。

表 1 不同冷冻时间处理后灰飞虱的状态

冷冻时间 (min)	复苏时间 (s)	灰飞虱死亡率 (%)
10	0	0
20	70	1.48
30	94	4.76
40	117	17.65
50	150	17.39
60	159	17.65

2.2 冷冻灰飞虱对其传毒能力的影响

经 -20 ℃ 冷冻处理 20 min 的带毒灰飞虱接种武育梗 3 号后的发病率略低于不经冷冻带毒灰飞虱处理灰飞虱所接种水稻的发病率,可是显著性分析发现两者间无显著性差异(表 2),可见冷冻处理对带毒灰飞虱传播水稻条纹病毒的能力无影响。

表 2 冷冻对灰飞虱传毒能力的影响

处理	平均发病率 (%)	5% 显著水平	1% 极显著水平
不冷冻	50.56	a	A
冷冻	45.04	a	A

2.3 冷冻灰飞虱对其羽化的影响

经 -20 ℃ 冷冻处理 20 min 后灰飞虱的平均羽化率达 88.81%,与非冷冻处理的灰飞虱羽化率 100% 进行假设测验知,差异性不显著,说明冷冻对灰飞虱的羽化影响不大(表 3)。继续观察发现,经 -20 ℃ 冷冻处理的灰飞虱所产后代羽化后,成虫仍可产卵并孵化,初步表明 -20 ℃ 冷冻处理 20 min 对灰飞虱交配产卵机能影响不大,其生活史不会因 -20 ℃ 冷冻 20 min 而受影响。

3 讨论与结论

水稻条纹叶枯病重病区田间鉴定方法具有方便、快捷等优点,但是抗性鉴定结果易受环境条件的影响,使得年度和区域间灰飞虱发生量和带毒率的具有不均一性,从而在一定程度上影响结果的重演性^[10]。苗期接种鉴定方法是在可控条件下开展的一种抗性鉴定,利用其评价水稻品种对水稻条纹叶枯病的抗性水平,除了可以很好地克服环境条件的影响,拓宽鉴定时间,还满足了对大量材料进行快速鉴定的需求^[7]。鉴定过程中发现,传毒介体灰飞虱的移动性较强,使得定量接

表 3 冷冻对灰飞虱羽化的影响

编号	总虫数 (头)	羽化数 (头)	羽化率 (%)
1	42	37	88.10
2	32	28	87.50
3	23	21	91.30
4	32	28	87.50
5	29	26	89.66
平均			88.81

种灰飞虱成为一件操作复杂而繁琐的工作,曾对研究进度带来了一定影响,进而对冷冻法处理带毒灰飞虱进行了研究,不仅大大加快了水稻条纹叶枯病接种鉴定的速度,还为灰飞虱传病毒病的接种鉴定提供了一种处理携带病毒灰飞虱的新方法,进而加快了抗病品种的鉴出速度和选育进程。

携带 RSV 的灰飞虱 -20 ℃ 冷冻处理 20 min 后,不仅方便计数,而且对其传毒能力和羽化影响不大,不会影响其对水稻条纹病毒的传播,继续饲养发现对其产卵机能影响也不大,其生活史不会因 -20 ℃ 冷冻 20 min 而受到影响,但其交配与产卵能力的大小是否受影响还须要进一步试验。这与刘向东等报道灰飞虱能抵抗一定低温并忍受一定高温,在江苏南部灰飞虱越冬期不休眠,仅在 -3 ℃ 且持续时间较长时才发生麻痹冻倒现象,冻倒若虫大部分能复苏的结论^[11]基本一致。

参考文献:

[1] Toriyama S. Rice stripe virus(set 17) [M]. CMI / ABB; Description of Plant Viruses, 1983.

[2] 朱凤美,肖狄璞,王法明,等. 江南稻区新发生的几种稻病[J]. 植物保护, 1964, 2(3): 100 - 102, 145 - 146.

[3] 周益军,李 硕,程兆榜,等. 中国水稻条纹叶枯病研究进展[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 1007 - 1015.

[4] 程兆榜,杨荣明,周益军,等. 江苏稻区水稻条纹叶枯病发生新规律[J]. 江苏农业科学, 2002(1): 39 - 41.

[5] 周益军. 水稻条纹叶枯病 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2010.

[6] Xiong R Y, Cheng Z B, Wu J X, et al. First report of an outbreak of rice stripe virus on wheat in China [J]. Plant Pathology, 2008, 57(2): 397.

[7] 周 彤,范永坚,程兆榜,等. 水稻抗条纹叶枯病鉴定方法的研究 [J]. 植物保护, 2008, 34(6): 77 - 80.

[8] 周 彤,周益军,陈 洁,等. 冷冻法处理带毒灰飞虱: 中国, CN101292640 [P]. 2008 - 10 - 29.

[9] 周益军,刘海建,王贵珍,等. 灰飞虱携带的水稻条纹病毒免疫检测 [J]. 江苏农业科学, 2004(1): 50 - 51.

[10] 周 彤,王 英,吴丽娟,等. 水稻品种抗黑条矮缩病人工接种鉴定方法 [J]. 植物保护学报, 2011, 38(4): 301 - 305.

[11] 刘向东,翟保平,胡自强. 高温及水稻类型对灰飞虱种群的影响 [J]. 昆虫知识, 2007, 44(3): 348 - 352.