

# 水稻对黑条矮缩病感病生育期研究初报

周彤<sup>1,2</sup>, 吴丽娟<sup>1,2</sup>, 王英<sup>1,2</sup>, 程兆榜<sup>1</sup>, 季英华<sup>1</sup>, 范永坚<sup>1</sup>, 周益军<sup>1</sup>

(1. 江苏省农业科学院 植物保护研究所, 江苏 南京 210014 2 南京农业大学 植物保护学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 为明确水稻品种对黑条矮缩病的感病生育期, 分别于水稻二、四、六、八、十叶龄期模拟田间发病条件对特普和华粳 6 号两品种进行接种比较抗病性差异。结果发现八叶龄以内的特普与十叶龄以内的华粳 6 号均表现为感病, 十叶龄水稻品种则表现为不感病, 随着叶龄的增加水稻品种对病害敏感程度呈下降趋势。这表明水稻品种不同生育期对黑条矮缩病感病性存在差异, 而秧田期和本田前期是水稻对水稻黑条矮缩病感病性较强的时期, 本研究结果可望为水稻黑条矮缩病综合防治策略的制定提供重要依据。

**关键词:** 水稻黑条矮缩病; 灰飞虱; 感病生育期; 叶龄

中图分类号: S435. 111. 4<sup>+</sup> 9 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)06-0128-04

## Preliminary Report on the Susceptible Growth Stages of Rice to Rice Black-streaked Dwarf Disease

ZHOU Tong<sup>1,2</sup>, WU Lijuan<sup>1,2</sup>, WANG Ying<sup>1,2</sup>, CHENG Zhaobang<sup>1</sup>,  
JI Yinghua<sup>1</sup>, FAN Yongjian<sup>1</sup>, ZHOU Yijun<sup>1</sup>

(1 Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agriculture Sciences, Nanjing 210014, China

2 College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract** In order to identify the susceptible growth stages of rice to rice black-streaked dwarf disease, the difference of resistance level among 2, 4, 6, 8, 10 leaf ages in two rice varieties Tetep and Huajing No. 6 were analyzed in simulated field conditions. The results showed that Tetep with leaf age less than 8 and Huajing No. 6 with leaf age less than 10 were susceptible to rice black-streaked dwarf disease, while both Tetep and Huajing No. 6 at 10 leaf age were resistance to the disease. With the increase of leaf ages, the sensitivity of rice varieties on disease decreased. This indicated that the susceptibility showed differences in the various growth stages of rice to rice black-streaked dwarf disease. The susceptible growth stages of rice to rice black-streaked dwarf disease were the seedling stage and the early field stage. The results were expected to provide essential evidence for the integrated control strategy to rice black-streaked dwarf disease.

**Key words** Rice black-streaked dwarf disease; Small brown planthopper; Susceptible growth stages; Leaf age

水稻黑条矮缩病毒 (Rice black-streaked dwarf virus, RBSDV) 属于呼肠孤病毒科斐济病毒属, 病毒颗粒呈正二十面体, 双层外壳均有突起, 基因组由内含 10 条双链 RNA 组成<sup>[1-3]</sup>, 主要由介体灰飞虱 (*Laodelphax striatellus* Fallen, SPBH) 以持久性不经卵方式传播<sup>[4]</sup>, 能侵染水稻、玉米和小麦, 分别引起水稻黑条矮缩病、玉米粗缩病和小麦绿矮病<sup>[5,6]</sup>。

水稻黑条矮缩病自 1963 年在浙江省余姚县发现以来<sup>[7]</sup>, 20 世纪主要在浙江等省的局部籼稻产区发生危害<sup>[8]</sup>, 近年来随着灰飞虱发生量的日益上升, 水稻黑条矮缩病在华东稻区开始大面积发生, 并迅速上升为生产上主要的病毒病害, 给粮食作物的安全生产带来了很大的威胁<sup>[9]</sup>。

由于生产上使用的品种对黑条矮缩病的抗性不

收稿日期: 2010-10-09

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2009325); 国家科技支撑计划资助项目 (2006BAD02A16; 2006BAD08A04);

转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08001-013B; 2009ZX08001-019B); 江苏省农业三项工程项目 (SX(2008)018); 江苏省支撑计划项目 (BE2009385); 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX(10)414; CX(08)606)

作者简介: 周彤 (1978-), 男, 江西宜春人, 助理研究员, 主要从事植物病毒病害的研究。

通讯作者: 周益军 (1957-), 男, 江苏淮安人, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物病毒病害的研究。

明,也缺乏黑条矮缩病毒有效防治药剂,治虫防病是当前较为有效的应急防治手段。而在明确水稻对黑条矮缩病的感病生育期的基础上,选择与灰飞虱传播病毒重叠的时期进行防治,可望取得更好的防治效果。前人曾观察到水稻不同生育期对 RBSDV 的抗性表现有不一致的现象,秧苗期较为感病<sup>[10]</sup>,但在当前病害发生程度大大高于以往的水稻品种是否仍具有成株期抗性(灰飞虱发生量与前人研究时相比已逾数十倍),以决定在水稻的全生育期是否可以采取差异化的水稻黑条矮缩病防治策略。为此设计本试验,模拟江苏省重病区水稻黑条矮缩病的田间发生情况,研究不同生育期水稻对黑条矮缩病的感病性,以期水稻黑条矮缩病的综合防控策略的制定提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试品种

2009年6-7月将水稻品种特特普和华粳6号分期播种于江苏省农科院实验田水泥池中,待长至三叶龄左右移栽(接种二叶龄的植株提前移栽),获得叶龄期分别为二、四、六、八、十的水稻植株用于接种试验,正常水肥管理,全程用无纺布罩于水稻苗上。

### 1.2 毒源获得

2009年5月于江苏邳州重病区采集由 RBSDV 引起小麦绿矮病株<sup>[11]</sup>。取少量病株叶片,参照杨杰等<sup>[12]</sup>方法提取小麦总 RNA,根据已发表的 RBSDV 的 S9 序列<sup>[13]</sup>设计引物(上海英俊生物技术公司),R: 5'-GGATTACAACAACACACAMCGAAA-3', F1: 5'-GRTAGACAGGCAAAYMTAAGCGT-3'<sup>[14]</sup>。按照 M-MLV 反转录酶(Promega)说明书进行反转录。PCR 扩增体系如下: dDNA 模板 3.0 μL, Taq plus 酶 0.5 μL, dNTP(每份 10 mmol/L) 0.5 μL, 10 × PCR 缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL, 5'端引物(10 pmol/L) 1.0 μL, 3'端引物(10 pmol/L) 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 16.5 μL, 合计 25 μL。反应程序为: 95℃下预变性 5 min, 94℃下变性 1 min, 51℃下退火 1 min, 72℃下延伸 1 min, 35 个循环;最后 72℃下延伸 10 min, 4℃下保存。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。再采用斑点免疫结合法(Dot immunobinding assay DIBA)确定病株是否携带水稻条纹病毒(Rice stripe virus, RSV)<sup>[15]</sup>, 筛选出携带 RBSDV 但不携带 RSV 的病株移栽于温室中。

### 1.3 传毒介体的筛选

2008年4-5月从江苏省农业科学院田间采集

灰飞虱若虫,在水稻品种武育粳3号上进行饲养,交配后单头雌虫单独产卵,再采用 DIBA 法检测雌虫携带 RSV 情况,保留不带毒雌虫的后代,饲养 2~3 代后获得灰飞虱群体饲养备用。饲毒前从灰飞虱群体中随机取 100 只 DIBA 法检测确定为无毒虫。

### 1.4 饲毒试验

将筛选得到的病苗种于大烧杯中,土面覆盖滤纸,将适量 1~2 龄无毒若虫移入其中,并用纱布封口。饲毒 2 d 后将虫移入烧杯(预先育有武育粳3号秧苗)中饲养,循环 13 d 后每批随机取出 30 头灰飞虱提取总 RNA,方法如下:取单头灰飞虱于 2.0 mL 离心管,加 300 μL Trizol 液摇动匀浆,室温下放置 10 min,加入 70 μL 的氯仿,按住管盖剧烈摇荡 15 s,室温放置 2~3 min, 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液于一新离心管中,加入 200 μL 的异丙醇(与上清等体积),颠倒数次混匀;室温放置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,再加入 1 mL 75% 酒精轻洗 RNA 沉淀, 7 500 r/min 离心 5 min,去上清,室温干燥 5~10 min,最后溶解在于 10 μL DEPC 预处理的水中,保存于 -20℃ 冰箱中。再采用 RT-PCR 测定灰飞虱带毒率,方法同 1.2。

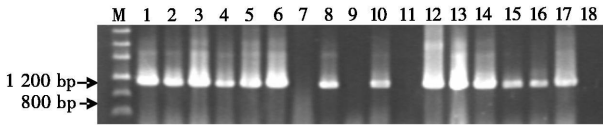
### 1.5 传毒试验

二至八叶龄的苗用两头开口玻璃管(直径 8 cm,高 45 cm)罩住,顶端用尼龙纱布封闭,十叶龄的苗用铁圈支撑的纱网袋罩住,按 8 虫/苗的有效接种虫量接入带毒灰飞虱(有效接种虫量 = 接种虫量 × 带毒率),48 h 后向玻璃管及纱网袋内喷适当浓度的吡虫啉水溶剂灭虫,每个处理 5 株苗,重复 2 次。接种后水稻正常水肥管理,30 d 后开始病害调查,每 4 d 调查 1 次,直至完全显症。症状主要表现为植株矮化,叶片短阔、僵直,叶色深绿,叶背的叶脉和茎秆上初现蜡白色,后变褐色的短条瘤状隆起<sup>[4]</sup>。症状调查结束后,从中随机抽取部分正常植株与发病植株进行 RT-PCR 检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦病株的筛选和接种体制备

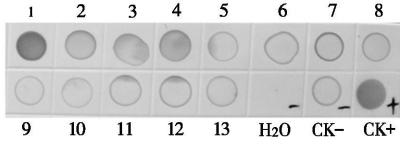
采集 18 株小麦病株经 RT-PCR 检测,14 株能扩增到 1 118 bp 的目的条带(图 1)。携带 RBSDV 的小麦植株中挑选 13 株长势较好的 DIBA 法检测是否携带 RSV,其中有 5 株表现阳性,有 8 株表现阴性(图 2),由此得到了 8 株携带 RBSDV 且不携带 RSV 的小麦病株。饲毒后,灰飞虱带毒率为 40%~63%,根据每批次检测的带毒率,计算实际需接入的灰飞虱的量。



M. 分子标准量; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16  
17 发病植株; 7, 9, 11, 18 正常植株。  
M. Marker ① 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16,  
17. Infected plants; 7, 9, 11, 18 Healthy plants

图 1 小麦植株的 RT-PCR 检测

Fig 1 Detection of RBSDV in wheat plants by RT-PCR



CK+. 阳性对照; CK-. 阴性对照; H<sub>2</sub>O. 清水对照; 1, 2, 3, 4,  
13 阳性; 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 阴性。  
CK+. RSV-positive plant CK-. RSV-negative plant  
H<sub>2</sub>O. Blank control; 1, 2, 3, 4, 13 RSV-positive  
wheat plant; 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 RSV-negative wheat plant

图 2 DIBA 法检测小麦植株是否携带 RSV

Fig 2 Detection of RSV in wheat plants by DIBA

2.2 水稻不同生育期对 RBSDV 感病性分析

不同叶龄期水稻接种 RBSDV 后发病情况如图 3 结果表明, 在本研究的接种强度下, 感病品种华粳 6 号二、四、六、八叶龄对 RBSDV 表现为感病。特特普二、四、六叶龄对 RBSDV 表现为感病。随着接种叶龄增加, 两个品种都呈现出对 RBSDV 感病性降低的趋势, 而十叶龄的华粳 6 号与八、十叶龄特特普则表现为不发病。

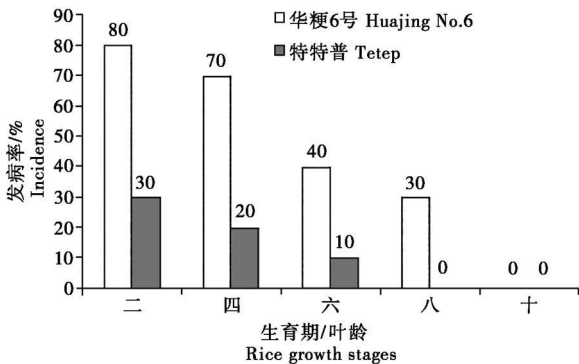
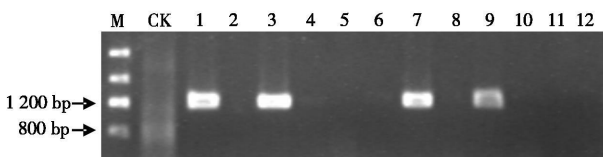


图 3 不同生育期水稻接种 RBSDV 后平均发病率

Fig 3 Incidence of rice inoculated RBSDV on different growth stages



M. 分子量标准; CK. 健康植株; 1, 3, 7, 9 发病植株;  
2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12 正常植株。  
M. Marker ① CK. Negative control; 1, 3, 7, 9. Infected plants  
2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12 Healthy plants

图 4 RT-PCR 法检测接种后水稻是否携带 RBSDV

Fig 4 Detection of RBSDV in inoculated rice plants by RT-PCR.

接种水稻完全显症后 (2个月), 随机选取 12 株

水稻采用 RT-PCR 方法进行检测, 结果发现有典型发病症状的植株均能扩增到目的条带, 无发病症状的植株均不能扩增到目的条带 (图 4)。

3 讨论

随着灰飞虱发生量日益上升, 继水稻条纹叶枯病爆发流行后, 同由灰飞虱传播的水稻黑条矮缩病也开始在华东粳稻产区发生流行, 据统计在粳稻主产区江苏省, 2007 年病害发生面积仅 2.05 万  $hm^2$ , 2008 年则急速发展到 26.7 万  $hm^2$  (发病率 80% 以上绝收田块达 0.2 万  $hm^2$ ), 2009 年持续增长至 33.3 万  $hm^2$  [9]。由于当前生产上水稻品种对病害抗感性尚不明了, 亦缺乏有效的抗病毒试剂, 在水稻品种处于 RBSDV 侵染的敏感时期, 切断灰飞虱传播途径无疑是一种行之有效的防治措施, 为此本研究设计上述试验以期明确水稻对黑条矮缩病的感病生育期。

近年来江苏省灰飞虱发生量与前人研究时相比已逾数十倍 [10, 16], 为客观反映当前生产上不同生育期水稻对 RBSDV 的敏感程度, 本试验模拟田间灰飞虱发生情况对接种强度进行了规范。据江苏省植保站统计水稻黑条矮缩病重发区病害主要传播世代——一代灰飞虱发生量约为每公顷量可达  $1.5 \times 10^7$  头, 而其群体带毒率为 10% ~ 20%, 以每公顷大田种植  $3 \times 10^5$  苗折算, 田间有效接种强度为 5 ~ 10 虫/苗, 为此本研究设置的有效接种强度为 8 虫/苗。笔者通过田间抗性鉴定发现特特普对 RBSDV 抗性表现较好, 而华粳 6 号对黑条矮缩病表现为感病, 故本研究以华粳 6 号和特特普为代表, 研究水稻品种对 RBSDV 侵染的感病生育期。此外, 鉴于当前水稻黑条矮缩病和水稻条纹叶枯病共同流行的现状, 田间的病株往往同时携带两种病毒, 本研究在通过 RT-PCR 确认病株携带 RBSDV 后, 又采用 DIBA 方法排除了携带 RSV 的病株; 同时由于灰飞虱可以通过一定比例经卵传播 RSV, 因此试验中筛选了不携带 RSV 的灰飞虱为病毒的传播介体, 避免 RSV 对本试验的干扰。同时为了防止田间携带 RBSDV 的灰飞虱传播病毒干扰试验, 接种前采用无纺布隔离方式确保接种时水稻为无毒苗。

在本试验的接种条件下, 八叶龄以内的特特普与十叶龄以内的华粳 6 号表现为感病, 而且随着叶龄的增加, 两个品种都呈发病率降低的趋势, 十叶龄均表现不发病, 这表明不同生育期水稻品种对 RBSDV 感病性存在差异, 而秧苗期和本田前期为易感病期。不同于水稻条纹叶枯病, 水稻黑条矮缩病是

由灰飞虱以非卵传方式传播的,介体昆虫需要在若虫期获毒并经过一段较长的循环期后才能传播病毒,因此其主要由高龄若虫和成虫在田间传播危害,所以病害的传播时间也更为短和集中。在水稻黑条矮缩病易感病期和灰飞虱传播期重叠时期采取药剂防治灰飞虱,可以以较小的防治成本获得较好的防治效果。在玉米粗缩病的治理上,调整播期方法使玉米敏感期避开灰飞虱传毒期的这一农业措施已取得非常好的防治效果<sup>[17 18]</sup>,这启发我们在水稻黑条矮缩病的综合防治中,可以采取秧田期集中防虫网覆盖,再根据田间一代灰飞虱的发生情况适当推迟移栽期的方式,使品种的敏感生育期避开介体的传毒期,进而减轻病害的危害。此外,本研究接种强度下两个水稻品种于十叶龄均表现不发病,若灰飞虱发生量进一步上升,对于 RBSDV 能否侵染十叶龄及其以上的水稻有待进一步的试验研究。

#### 参考文献:

- [1] Akihata E, Uyeda I, Kimura I, *et al*. Close similarity between genome structures of rice black-streaked dwarf and maize rough dwarf viruses [J]. *J Gen Virol* 1993, 74: 1227-1232
- [2] 王朝辉, 周益军, 范永坚, 等. 江苏水稻黑条矮缩病毒 S10 的 cDNA 克隆序列分析 [J]. *中国病毒学*, 2002, 17(2): 142-144
- [3] Liu H, J Wei C H, Zhong Y W, *et al*. Rice black-streaked dwarf virus minor core protein P8 is a nuclear dimeric protein and represses transcription in tobacco protoplasts [J]. *FEBS Letters* 2007, 581(13): 2534-2540
- [4] 阮义理, 金登迪, 许如银, 等. 水稻黑条矮缩病的研究 [J]. *浙江农业科学*, 1984(4): 185-192
- [5] 周益军, 范永坚, 程兆榜, 等. 江苏省玉米病毒病研究Ⅴ玉米粗缩病的发生与病原初步鉴定 [J]. *江苏农业学报*, 1998, 14(4): 246-248
- [6] 羊健, 天慧, 戴良英, 等. 我国水稻黑条矮缩病和玉米粗缩病病原的研究概况 [J]. *江西植保*, 2007, 30(1): 2-6
- [7] 朱凤美, 肖庆璞, 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
- [8] 陈声祥, 张巧艳. 我国水稻黑条矮缩病与玉米粗缩病研究进展 [J]. *植物保护学报*, 2005, 32(1): 97-103
- [9] 陈洁, 吴丽娟, 周彤, 等. 江苏省主栽水稻品种对条纹叶枯病与灰飞虱的抗性评价 [J]. *南京农业大学学报*, 2010, 33(4): 105-108
- [10] 林凌伟, 董国堃, 汪恩国, 等. 水稻黑条矮缩病传毒昆虫的防治实践与研究 [J]. *昆虫知识*, 2001, 38(6): 426-428
- [11] 龚祖垠, 沈菊英, 陈巽祯, 等. 我国禾谷类病毒病的病原问题-Ⅱ. 玉米粗缩病病原的研究 [J]. *生物化学与生物物理学报*, 1981, 13(1): 55-59
- [12] 杨杰, 王军, 周彤, 等. 江苏水稻黑条矮缩病病毒的 RT-PCR 分析和快速检测 [J]. *华北农学报*, 2008, 23(6): 87-92
- [13] 张恒木, 陈剑平, 程晔, 等. 水稻黑条矮缩病毒基因组片段 S9 的 cDNA 克隆和全序列分析 [J]. *生物化学与生物物理学报*, 2001, 33(1): 467-471
- [14] 周彤, 吴丽娟, 王英, 等. 灰飞虱从冷冻病叶获得水稻黑条矮缩病毒方法的研究初报 [J]. *中国水稻科学*, 2010, 24(4): 425-428
- [15] 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
- [16] 汪恩国, 关梅萍, 林凌伟, 等. 水稻黑条矮缩病发病规律研究 [J]. *植物保护*, 2001, 28(2): 23-24
- [17] 陈声祥, 张巧艳. 我国水稻黑条矮缩病与玉米粗缩病研究进展 [J]. *植物保护学报*, 2005, 32(1): 97-103
- [18] 成长庚, 赵阳, 林付根, 等. 玉米粗缩病播期避病作用的研究 [J]. *玉米科学*, 2000, 8(3): 81-82