

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

周彤[#] 吴丽娟[#] 王英 程兆榜 季英华 范永坚 周益军^{*}

(江苏省农业科学院 植物保护研究所, 江苏 南京 210014; [#] 共同第一作者; ^{*} 通讯联系人, E-mail: yjzhou@jaas.ac.cn)

Preliminary Report on the Transmission of Rice Black-Streaked Dwarf Virus from Frozen Infected Leaves to Rice by Insect Vector Small Brown Planthopper (*Laodelphax striatellus*)

ZHOU Tong[#], WU Lijuan[#], WANG Ying, CHENG Zhaobang, JI Yinghua, FAN Yongjian, ZHOU Yijun^{*}

(Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; [#] These authors contributed equally to this paper; ^{*} Corresponding author, E-mail: yjzhou@jaas.ac.cn)

ZHOU Tong, WU Lijuan, WANG Ying, et al. Preliminary report on the transmission of rice black streaked dwarf virus from frozen infected leaves to rice by insect vector small brown planthopper (*Laodelphax striatellus*). *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(4): 425-428.

Abstract: In order to preserve virus for identifying resistant rice varieties against rice black streaked dwarf disease, a simple and reliable method was developed by which virus free small brown planthopper(SBPH) acquired rice black streaked dwarf virus(RBSDV) from frozen infected leaves and transmitted the virus to healthy rice plants. RBSDV acquired from infected leaves frozen at -70°C by SBPH was transmitted to a susceptible rice variety. The experimental result showed that the SBPH could acquire the virus from frozen infected leaves and transmit it to the susceptible rice variety. For the ability of obtaining and transmitting the virus by SBPH, there was no significant difference between frozen infected leaves and fresh infected leaves. The novel method could be applied to the resistance identification of rice varieties to rice black streaked dwarf disease and it would facilitate the breeding process for rice black streaked dwarf disease resistance.

Key words: rice black streaked dwarf virus; frozen infected leaves; small brown planthopper; methodology

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. *中国水稻科学*, 2010, 24(4): 425-428.

摘要: 研究出一种利用灰飞虱从冷冻病叶中获得水稻黑条矮缩病毒(rice black streaked dwarf virus, RBSDV)的方法。以-70°C条件下冷冻保存的RBSDV罹病植株叶片对灰飞虱饲毒,随后接种感病水稻品种,结果发现灰飞虱可从冷冻病叶上获得RBSDV,并传播RBSDV,且获毒能力和传毒能力与新鲜病叶没有差异。这表明从冷冻病叶上获得RBSDV的灰飞虱可以应用于品种抗性鉴定,此法可望加快RBSDV抗病品种的选育进程。

关键词: 水稻黑条矮缩病毒; 冷冻病叶; 灰飞虱; 方法

中图分类号: S432.4⁺1; S435.112⁺.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2010)04-0425-04

水稻黑条矮缩病是一种恶性病毒病,自1963年在浙江余姚县发现以来^[1],20世纪主要在浙江等省的局部籼稻产区发生^[2]。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最主要的病毒病害。水稻黑条矮缩病的病原为水稻黑条矮缩病毒(rice black streaked dwarf virus, RBSDV),属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10条双链RNA组成^[3-5],主要由介体灰飞虱(*Laodelphax striatellus* Fallén, SBPH)以持久性不经卵方式传播^[6],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^[7-9]。这些病毒病害的严重发生给粮食作物的安全生产带来了很大的威胁。

防治病毒病最为理想的方法是选育和利用抗病品种^[10-12],而这一工作的开展首先需要建立科学的抗性鉴定方法对品种进行客观的抗性评价。由于RBSDV传播方式的特殊性,不能使用病汁液摩擦方式进行接种。研究者多采用在病株上饲喂方式获得携带RBSDV的灰飞虱进行病毒的接种,而罹病植株往往生长势受到较大影响难以长期保存,发

病植株在采集后需尽快饲毒,极大地限制了研究时间。这给围绕RBSDV开展的抗病品种选育和抗性遗传研究工作带来了一定的难度。Zhang等^[13]在同为灰飞虱传播的水稻条纹病毒(rice stripe virus, RSV)的研究中发现采用冷冻方法保存的病叶中病毒仍然具有侵染性,可用于病毒的接种,为解决这一技术瓶颈提供了一种全新的思路,而迄今为止针对水稻黑条矮缩病的病原保存方法的研究尚未见报道。为此,本研究采用冷冻病株(叶)方式保存RBSDV,并通过灰飞虱从冷冻病株(叶)上获得病毒及获毒后传播病毒的能力试验明确这一方法是否可应用于品种的抗性鉴定,以期为水稻抗黑条矮缩病的品种选育和遗传规律研究提供基本的研究手段。

收稿日期: 2009-11-04; 修改稿收到日期: 2010-01-28。

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资助项目(2009ZX08001-013B); 农业部行业专项资助项目(nyhyzx07-051); 江苏省农业科技自主创新资金资助项目(cx[08]129)。

1 材料与方法

1.1 病毒来源

2009 年 5 月于江苏邳州重病区采集由 RBSDV 引起的小麦绿矮病病株, 症状主要表现为植株丛矮或矮缩, 分蘖不增多, 叶色浓绿, 无条纹, 有时心叶有缺刻, 叶片质厚、茎秆粗硬且有弹性^[14]。采用 RT-PCR 方法检测确定病株是否携带 RBSDV。参照 Trizol (Reagent) 说明书提取小麦总 RNA。根据已发表的 RBSDV 的 S9 序列^[15] 设计引物 (上海英俊生物技术公司), R: 5'-GGATTACAACAHACACAMCGAA-3'; F1: 5'-GRTAGACAGGCAAAYMTAAGCGT-3'。

按照 M-MLV 反转录酶 (Promega) 说明书进行反转录。PCR 扩增体系如下: cDNA 模板 3.0 μ L, Taq plus 酶 0.5 μ L, dNTP (每份 10 mmol/L) 0.5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, 5' 端引物 (10 pmol/L) 1.0 μ L, 3' 端引物 (10 pmol/L) 1.0 μ L, ddH₂O 16.5 μ L, 合计 25 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 下预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 下变性 1 min, 51 $^{\circ}$ C 下退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 下延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 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)^[16] 确定病株是否携带 RSV。将筛选出的一部分病株保存于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中, 其余移栽于温室中。

1.2 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 只用 DIBA 法检测确定为无毒虫。

1.3 传毒介体的获毒

冷冻时间设置 45 d、140 d 两个处理, 饲毒时从 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中取出适量病叶, 4 $^{\circ}$ C 下放置 3~5 h 使叶片自然展开, 然后将其移入三角瓶内, 每个三角瓶接入 60 只预先饥饿 3 h 的 1~2 龄无毒灰飞虱 (图 1), 重复 3 次。饲毒 48 h 后记录存活的灰飞虱数量。以等量的新鲜小麦病叶作为对照, 采用同样方法饲毒。以小麦健康叶片饲喂作为空白对照。

1.4 传毒介体的传毒

饲毒后, 将各处理存活灰飞虱分别移入烧杯 (预先育有武育粳 3 号水稻秧苗) 单独饲养 15 d, 使其度过循环期。从各处理中随机选取 25 头灰飞虱接种感病水稻品种华粳 6 号: 预先在试管中 (15 mm \times 150 mm) 放 1 株 1.5 叶期的秧苗, 每个试管接入 1 头灰飞虱, 接种 4 d 后移出全部灰飞虱备用, 再将秧苗移栽至大田, 注意肥水管理。移栽 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^[9]。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。

1.5 传毒介体中 RBSDV 的检测

接种后移出灰飞虱采用下述方法提取总 RNA: 取单头灰飞虱于 2.0 mL 离心管, 加 300 μ L Trizol 液摇动匀浆, 室温下放置 10 min, 加入 70 μ L 的氯仿, 按住管盖剧烈振荡



图 1 冷冻病叶饲毒灰飞虱

Fig. 1. Virus free small brown planthoppers acquire RBSDV from frozen infected leaves.

15 s, 室温放置 2~3 min, 12 000 r/min 下离心 15 min, 取上清液于一新离心管中, 加入 200 μ L 的异丙醇, 颠倒数次混匀; 室温放置 10 min, 12 000 r/min 下离心 10 min, 弃去上清液; 再加入 1 mL 75% 酒精轻洗 RNA 沉淀, 7 500 r/min 下离心 5 min, 去上清液, 室温干燥 5~10 min, 最后溶解于 10 μ L DEPC 预处理水中。再采用 RT-PCR 检测灰飞虱是否携带 RBSDV, 方法同 1.1。

2 结果与分析

2.1 小麦病株的筛选

采集的 12 株小麦病株, 经 RT-PCR 检测, 发现均携带 RBSDV, 经 DIBA 法检测筛选到 9 株不携带 RSV 的小麦病株。随后取 4 株小麦病株保存于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中, 其余 5 株移栽于温室中, 用于新鲜病叶对照试验。

2.2 传毒介体获毒能力

采用冷冻病叶 (冷冻 45 d、140 d)、新鲜病叶及健康叶片方式饲喂 2 d 后, 灰飞虱的存活及获毒情况如表 1。45 d 冷冻病叶、140 d 冷冻病叶、新鲜病叶及健康叶片饲毒处理中灰飞虱平均存活数分别为 35、27.7、52.5 和 54 头, 存活率依次为 58.3%、46.2%、87.5% 和 90%。这表明灰飞虱不太适宜在冷冻病叶上生存。随机取 25 只饲毒后灰飞虱进行接种鉴定, 接种后移出灰飞虱进行 RT-PCR 检测, 发现 45 d 冷冻病叶饲毒灰飞虱平均带毒率为 26.7%, 140 d 冷冻病叶饲毒灰飞虱平均带毒率为 20.0%, 而新鲜病叶饲毒灰飞虱平均带毒率为 28%。45 d 冷冻病叶、140 d 冷冻病叶和新鲜病叶 3 种饲毒处理之间灰飞虱带毒率没有显著差异。

2.3 传毒介体传毒能力

将冷冻病叶和新鲜病叶饲毒处理获得的灰飞虱分别接种感病品种华粳 6 号, 发病后调查结果如表 2。45 d 冷冻病叶饲毒处理平均发病率为 8%, 140 d 冷冻病叶饲毒处理平均发病率为 6.7%, 而新鲜病叶饲毒平均发病率则为 10.7%, 三者之间无显著差异。这表明从冷冻病叶上获毒的灰飞虱能将 RBSDV 传播到水稻植株上。

表 1 冷冻病叶及对照饲毒后灰飞虱存活率及带毒率

Table 1. Survival rates and percentages of viruliferous insects which acquire virus by feeding on frozen or fresh infected leaves.

处理 Treatment	饲毒虫量 Total number of insects	存活虫量 No. of survival insects	灰飞虱带毒率 Proportion of viruliferous insects/%
冷冻 45 d 的病叶 Frozen infected leaves for 45 d	60	27.7 a	20.0 a
冷冻 140 d 的病叶 Frozen infected leaves for 140 d	60	35.0 b	26.7 a
新鲜病叶 Fresh infected leaves	60	52.5 c	28.0 a
健康叶片 Fresh healthy leaves	60	54.0 c	-

同一列数据后跟相同小写字母者表示差异不显著($P < 0.05$)。表 2 同。

Within a column, data followed by the same lowercase letters are not significantly different at $P < 0.05$ level. The same as in Table 2.

表 2 冷冻病叶及新鲜病叶饲毒灰飞虱接种水稻的发病率

Table 2. Percentages of RBSDV infected plants by inoculation of SBPH fed on frozen or fresh infected leaves.

病叶 Infected leaf	发病植株 No. of infected plants	发病率 Proportion of infected plants ($n = 25$) /%
冷冻 45 d Frozen for 45 d	2	8.0 a
冷冻 140 d Frozen for 140 d	1.67	6.7 a
新鲜病叶 Fresh infected leaves	2.67	10.7 a

接种水稻完全显症后(2个月)(图 2),从冷冻病叶(45 d)和新鲜病叶 2 种饲毒处理中随机选取 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 3)。这证实了从冷冻病叶上获毒的灰飞虱能将 RBSDV 传播到水稻植株上。

3 讨论

继水稻条纹叶枯病暴发流行后,同由灰飞虱传播的水稻黑条矮缩病又在华东稻区开始大面积流行。据统计,仅在粳稻主产区江苏省,2007 年病害发生面积为 2.05 万 hm^2 ,2008 年则急速发展到 26.7 万 hm^2 ,当年绝收田块达 2 000 hm^2 (发病率 80% 以上),给粮食安全生产带来了巨大的风险^[17]。借鉴水稻条纹叶枯病综合防治的成功经验,利用寄主自身的抗性无疑是最为经济有效的防治策略^[18]。这一策略得以实施的根本是建立科学客观的品种抗性鉴定方法,而获得携带 RBSDV 灰飞虱则是建立这一方法的基本保证。现有的带毒灰飞虱获得方式分为重病区采集和人工饲毒两种,但前者具

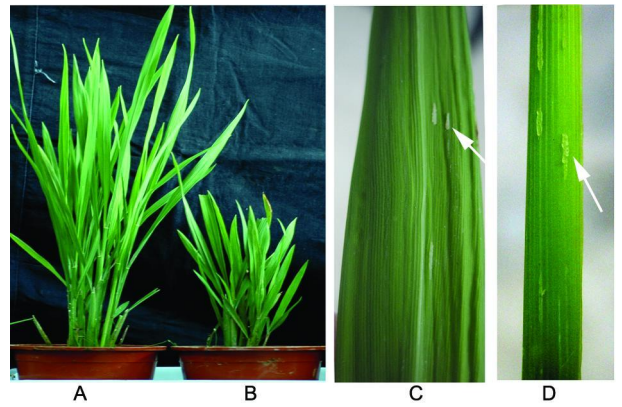


图 2 从冷冻病叶上获毒的灰飞虱接种水稻品种的发病症状

Fig. 2. Typical symptoms of rice plants inoculated with SBPH acquiring RBSDV from frozen infected leaves.

A- 正常植株; B- 发病植株; C- 发病植株叶片; D- 发病植株茎秆。箭头示白(褐)色短条瘤状隆起。

A, Healthy plants; B, Infected plants; C, Typical symptoms on the leaves; D, Typical symptoms on the stem. Arrows indicate white or brown enations with short strip shape.

有虫体易受伤、盲目性大、灰飞虱携带的 RSV 的干扰和发生时间限制等缺点,可操作性较差,研究者多采用人工室内饲毒方式。Shikata 等^[19]发明了一种人工饲毒方法,利用毛细玻璃管将病汁液注射到 3~4 龄灰飞虱腹部,再将灰飞虱在健康稻苗上培养 15 d 度过循环期后,接种玉米发现病毒可以发生侵染,不过这一方法需要较高的实验操作水平,且不适合制备大量的传播介体,此后的研究者鲜有沿袭。阮义理等^[6]以 1~2 龄灰飞虱在病株上饲毒后转移到健康稻苗上饲

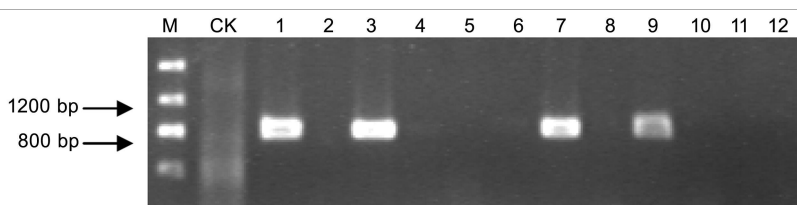


图 3 RT-PCR 法检测接种水稻 RBSDV

Fig. 3. Detection of RBSDV in inoculated rice plants by RT-PCR.

M- 分子量标准; CK- 未接种植株; 1, 3, 7, 9- 发病植株; 2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12- 正常植株。

Lane M, DNA marker; Lane CK, Negative control; Lanes 1, 3, 7 and 9, Infected plants; Lanes 2, 4, 5, 6, 8, 10, 11 and 12, Healthy plants.

养度过循环期,进而获得带毒灰飞虱用于抗性鉴定,这种方法目前被广泛应用。由于罹病植株往往难以长期保存,随着病害发生程度的日趋加重和抗性研究的不断开展,毒源保存已迅速上升为水稻黑条矮缩病品种抗性鉴定中的技术瓶颈。为此,本研究采用冷冻病株(叶)方式保存 RBSDV,并以冷冻病叶为材料开展了灰飞虱的饲毒试验和传毒试验,证明灰飞虱能从冷冻病叶上获得 RBSDV,并且能将获得的病毒传播至水稻上。前人以不同的病毒为对象也得到了相似的结果,如熊克娟等^[3]、Hollings 等^[21-22]研究发现冷冻保存于病叶中的植物病毒(黄瓜花叶病毒、烟草花叶病毒和马铃薯 Y 病毒)可保持对寄主的侵染性;Zhang 等^[31]也在同为灰飞虱传播的水稻条纹病毒的研究中发现采用冷冻方法保存的病叶上的病毒仍然具有侵染性,可用于病毒的接种。另外,Shikata 等^[9]发现冷冻保存的病汁液以其发明的注射灰飞虱方式接种仍然能够侵染玉米,这也从另一方面佐证了本方法的可行性。

鉴于当前水稻条纹叶枯病和水稻黑条矮缩病共同流行的现状,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 对本研究的干扰。本研究发现灰飞虱经冷冻叶片饲毒后的带毒率为 20%~30%,而采用单虫单苗接种后感病品种的平均发病率仅为 6.7%,这与感病品种的田间发病情况存在一定差异,其原因是田间单株水稻上灰飞虱的发生数量远远超过 1 头,因此,若通过加大接种强度进一步摸索将技术熟化,本方法有望应用于一般的品种抗性鉴定实验。灰飞虱从冷冻病叶获得并传播 RBSDV 的方法成功解决了品种的水稻黑条矮缩病抗性鉴定的毒源保存问题,可望为水稻抗黑条矮缩病的资源发掘鉴定和遗传规律研究提供更为便捷的研究手段,进而加快 RBSDV 抗性品种的选育进程。目前该项技术已申请国家发明专利(申请号:200910034147.1)。本研究中病叶冷冻时间分别设置 45 d、140 d 两种处理,结果表明两种处理灰飞虱均能从冷冻病叶上获得 RBSDV,且其获毒能力、传毒能力与新鲜病叶饲毒处理没有显著差异。而 Shikata 等^[9]发现 RBSDV 病汁液在-30℃条件下保存 232 d 后仍然可以通过注射介体后接种侵染玉米,这暗示冷冻病叶的保存时间可以进一步延长。这有待进一步的试验验证。

参考文献:

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

[2] 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.植物保护学报,2005,32(1):97-103.

[3] 张恒木,陈剑平,薛庆中,等.水稻黑条矮缩病毒基因组片段 S10 的 cDNA 克隆及全序列分析.中国水稻科学,2002,16

(1):24-28.

- [4] 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.中国病毒学,2002,17(2):142-144.
- [5] 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. *FEBS Lett*, 2007, 581(13):2534-2540.
- [6] 阮义理,金登迪,许如银,等.水稻黑条矮缩病的研究.浙江农业科学,1984(4):185-192.
- [7] 周益军,范永坚,程兆榜,等.江苏省玉米病毒病研究:Ⅰ.玉米粗缩病的发生与病原初步鉴定.江苏农业学报,1998,14(4):246-248.
- [8] 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.江西植保,2007,30(1):2-6.
- [9] 张恒木,陈剑平,雷娟丽,等.水稻黑条矮缩病毒基因组片段 S7 的 cDNA 克隆及全序列分析.微生物学报,2002,42(2):200-207.
- [10] 周彤,王磊,程兆榜,等.主栽品种镇稻 88 对水稻条纹叶枯病的抗性特征及其遗传研究.中国农业科学,2009,42(1):103-109.
- [11] 孙黛珍,江玲,张迎信,等.8 个水稻品种的条纹叶枯病抗性特征.中国水稻科学,2006,20(2):219-222.
- [12] Hibino H. Biology and epidemiology of rice viruses. *Annu Rev Phytopathol*, 1996, 34:249-274.
- [13] Zhang S X, Li L, Wang X F, et al. Transmission of rice stripe virus acquired from frozen infected leaves by the small brown planthopper (*Laodelphax striatellus* Fallén). *J Virol Methods*, 2007, 146:359-362.
- [14] 龚祖坝,沈菊英,陈翼祯,等.我国禾谷类病毒病的病原问题:Ⅷ.玉米粗缩病病原的研究.生物化学与生物物理学报,1981,13(1):55-59.
- [15] 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.生物化学与生物物理学报,2001,33(1):467-471.
- [16] 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.江苏农业科学,2004(1):50-51.
- [17] 陈洁,吴丽娟,周彤,等.主栽抗病粳稻品种对水稻条纹叶枯病的抗性特征.南京农业大学学报,2010,33(4):
- [18] 孙黛珍,江玲,张迎信,等.水稻抗条纹叶枯病数量性状座位分析.中国水稻科学,2007,21(1):95-98.
- [19] Shikata E, Kitagawa Y. Rice black streaked dwarf virus: Its properties, morphology and intracellular localization. *Virology*, 1977, 77(2):826-842.
- [20] 熊克娟,李天宪,陈绳亮,等.常见植物病毒冷冻干燥方法的改进与效果观察.华中农业大学学报,1999,18(2):151-153.
- [21] Hollings M, Stone M. The long term survival of some plant viruses preserved by lyophilization. *Ann Appl Biol*, 1970, 65:411-418.
- [22] Hollings M, Lelliott R A. Preservation of plant viruses by freeze drying. *Plant Pathol*, 1960, 9:63-66.