应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2011,48(5):1309—1313

低温胁迫对灰飞虱种群生长发育与繁殖的影响*

安志芳 张爱民 刘向东**

(南京农业大学植物保护学院 南京 210095)

摘 要 为了探讨低温在灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (Fallén) 种群发生发展中的作用,本文以南京冬季的旬平均最低温为依据,设定出 -6~2℃ 的低温,研究了用该低温处理 3~4 龄若虫不同时间后,灰飞虱的存活、生长与繁殖特性。结果表明,灰飞虱 3~4 龄若虫有较强的耐低温能力,-6~2℃ 的温度下,其半致迷和半致死时间分别为 1.22 和 20.49 d。低温抑制了若虫的生长发育,发育历期明显延长。低温处理后成虫的性比有所提高,并且短翅率显著增加。3~4 龄若虫低温处理 1~7 d 后羽化的成虫有产卵前期缩短、寿命延长的趋势,但对繁殖力没有显著影响,并且低温处理 2 d 后的产卵量要稍高于没有处理的对照。由此可见,-6~2℃ 低温的短期胁迫对灰飞虱种群的发生发展不会产生抑制作用。

关键词 灰飞虱,低温胁迫,耐寒力,发育,繁殖,翅型

Effect of low temperature shock on the development and fecundity of *Laodelphax striatellus* (Fallén)

AN Zhi-Fang ZHANG Ai-Min LIU Xiang-Dong**

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

Abstract In order to explore the effect of low temperature on the development of the small brown planthopper (SBPH), the survival, development and fecundity of SBPH were studied in the laboratory at a temperature similar to the average winter temperature in Nanjing (-6-2℃). The results indicate that 3rd and 4th instar nymphs were relatively cold resistant with median knockdown and lethal times of 1.22 and 20.49 days, respectively. Cold shock inhibited nymphs' development. There was a significant difference in the sex ratio of SBPH exposed to cold temperatures for 4 days and the control group. The rate of adult brachyptery increased significantly with duration of exposure to cold temperatures whereas the preoviposition period tended to decline and adult longevity tended to increase. However, the subsequent fecundity of 3-4th instar nymphs was not affected by duration of exposure to cold. Furthermore, the number of eggs produced by nymphs subject to two days at cold temperature slightly exceeded that of the control group. The results suggest that short-term exposure to cold temperatures do not significantly retard the population development of SBPH.

Key words *Laodelphax striatellus*, cold shock, cold hardiness, development, fecundity, wing form

冬季持续的低温环境对昆虫种群的繁衍是一个威胁。昆虫的耐寒性和越冬存活率对种群的持续发生起着重要作用(Bale,1989,1991,2002)。极端低温影响着昆虫的繁殖、生存等适合度特征(Hoffman *et al.*,2003)。同时,昆虫为了适应环境胁迫,也进化出了多样的机制和策略,来应对变化的环境(Block,1982; Zachariassen,1985; Addo-Bediako *et al.*,2002; 陈兵和康乐,2005)。温度胁迫是种群适应性反应的进化动力,会导致物种分化甚至新物种的形成(Sφrensen,2003)。灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (Fallén) (SBPH) 种群抗逆性强,具有一定的抗低温能力,能以休眠或滞育状态越冬,但也能以生长发育状态越冬。在日本的大部分地区,灰飞虱主要以 4 龄若虫及少量 3 龄若虫滞育越冬(Kisimoto,1989)。韩国以 2~5 龄若虫越冬,且越冬若虫在 12—4 月份间体重不断增

* 资助项目:国家"973"计划项目(2010CB126201)。

**通讯作者,E-mail: liuxd@njau.edu.cn

收稿日期:2011-06-12,接受日期:2011-08-18

加(Mishiro *et al.*,1994;Bae *et al.*,1995)。灰飞虱在我国高寒地区可以2~5龄若虫在杂草丛中顺利越冬,但成虫不能正常越冬(夏温澍,1962;蔡邦华等,1964;刘芹轩等,1982;郝丹青等,1995;林志伟等,2004)。在江苏南部越冬期若虫并不休眠,仅在-3℃且持续时间较长时才会产生麻痹冻倒的现象,但除部分致死外,其它仍能复苏(浦茂华,1963)。灰飞虱4~5龄若虫的过冷却点均在-10℃以下,表现了较强的抗寒力(刘向东等,2007)。不过,近年来灰飞虱种群的连年大发生,这是否与冬季气温的变暖有关?冬季低温的短期胁迫对灰飞虱种群发展有何影响?这些问题还有待于用实验数据来阐明。因此,本文采用模拟室外低温的方法,对灰飞虱种群进行一系列时间长度的低温胁迫,测定低温胁迫后种群在存活、发育及繁殖特性上的变化,以期明确低温对灰飞虱种群的影响作用。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

灰飞虱种群采自江苏南京的稻田,带回室内在光照培养箱(24℃,L∶D=12∶12)内用稻苗(武育粳3号)饲养多代备用。

1.2 低温处理

1.2.1 低温环境的设定 由江苏省气象局网站(http://www.jsmb.gov.cn/service/folder40/index.php)免费提供的气温数据可知,南京地区近年11月至次年2月的旬平均最低温度在-6~2℃之间。由此,在室内利用可调温度的海尔普通冰柜(BL|BD-102B型),将温度调在-6~2℃的变化范围之内,并用测温装置连续监测冰柜内温度,当温度稳定后用于试虫的处理。

1.2.2 试虫的处理 挑取24℃下群体饲养的3~4龄若虫,将其单头饲养在装有稻苗的指形管中。试虫在指形管中生活1 d后,将其转入5℃的低温环境下预冷5 h,然后放入低温(-6~2℃)环境中进行处理。每天定时检查处理试虫,观察时用细毛笔触动虫体,看其是否运动,将1 min内不能活动的个体记为昏迷个体,并将之转移到5℃环境下恢复适应5 h后,放回24℃的恒温条件下饲养,没昏迷的个体继续冷冻。连续5 d处理后,分别获得了冷冻处理1、2、3、4和5 d的昏迷个体。第5天仍没冻昏的个体继续冷冻到第7天时全部取出,并记录冻昏迷的个体数,5℃恢复适应后饲养于24℃下。起始冷冻处理若虫共500头,每头单独编号。以在24℃下饲养的3~4龄若虫为对照。低温处理后的试虫,每天定时检查其存活和脱皮情况。处理不同时间的个体如果不能发育到下一虫龄,则人为规定为冷冻致死个体。

1.3 成虫特性的测定

冷冻处理不同时间的试虫羽化后,分别记录羽化个体的性别和翅型,并将低温处理相同天数的雌、雄虫配对后放入大试管的稻苗上进行交配产卵。产卵量的测定采取隔日换苗镜检法,调查每头雌虫的日产卵量。配对后3 d内如出现雄虫死亡,则补充相应的雄虫,以保证雌虫能交配。每天观察雌、雄虫的存活与产卵情况。产卵量检查直到雌虫死亡时为止。调查结束后,统计成虫寿命、产卵前期、性比、翅型、雌虫产卵量。

1.4 数据分析方法

灰飞虱在低温条件下处理不同时间后,其昏迷率和致死率分别由昏迷个体数和致死个体数与处理的总虫量的比值来表示。低温致昏迷和致死中时间采用机率值分析法,即昆虫在低温条件下处理时间的对数值(X)与昏迷率或死亡率的机率值(Y)的线性关系,计算出半致迷或半致死时间,也就是该低温下导致50%的个体昏迷或死亡的时间。由于灰飞虱较为抗寒,在处理7 d后还没达到50%个体的死亡,因此其半致死时间仅由死亡率机率值和处理时间的对数值间的线性方程推导而来。不同处理时间下,灰飞虱的发育历期和产卵量的显著性比较采用Duncan氏新复极差法($P<0.05$)。性比及短翅型比率采用非参数检验中的二项分布检验方法,比较其是否显著偏离恒温24℃下对照的比率。所有差异显著性分析均在统计软件SAS 9.0中进行。全文数据均为平均数±标准差。

2 结果与分析

2.1 低温对灰飞虱的致昏迷与致死效应

灰飞虱在低温下处理不同时间后的昏迷率和死亡率如图1所示。由图1可知,灰飞虱的累积昏迷率与死亡率均随处理天数的增多而增大,并且处理时间超过3 d后,昏迷率与死亡率变化很

小。灰飞虱在低温环境下的存活率较高,长达 7 d 的低温胁迫后死亡率仅为 41%,当低温持续时间较短时对灰飞虱的生存造成的影响较小。计算得到昏迷率的机率值(Y_1)和死亡率的机率值(Y_2)与不同处理天数的对数值(X)间存在显著的线性关系,关系表现为: $Y_1 = 4.87 + 1.53X$ ($r = 0.996$)和 $Y_2 = 4.22 + 0.59X$ ($r = 0.916$)。由此计算得出在 -6 ~ 2℃的低温下,灰飞虱 3 ~ 4 龄若虫的半致迷时间为 1.22 d(95% 置信区间为 1.05 ~ 1.38 d),半致死时间为 20.49 d(95% 的置信区间为 12.82 ~ 47.80 d)。

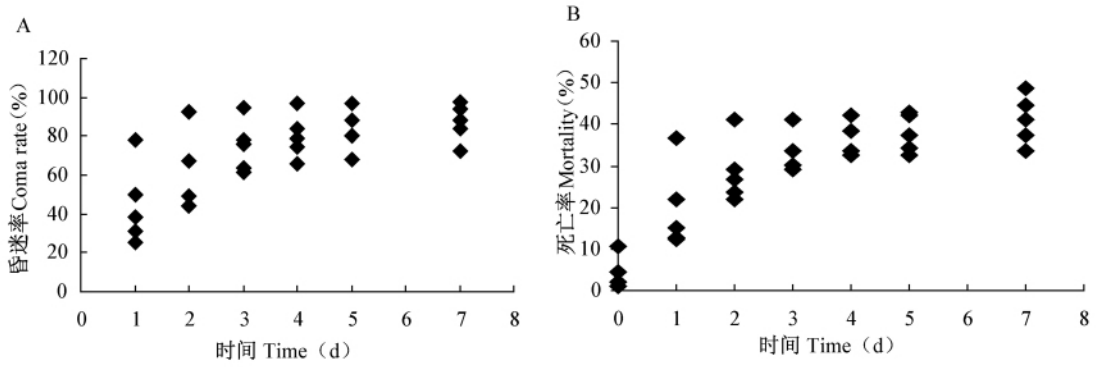

图 1　低温处理不同时间后灰飞虱的昏迷率(A)和死亡率(B)

Fig. 1　Coma rate (A) and mortality (B) of SBPH shocked by different days under low-temperature

2.2　低温对灰飞虱发育、羽化和成虫寿命的影响

低温对灰飞虱发育的影响如表 1 所示。由表 1 可知,-6 ~ 2℃的低温延迟了灰飞虱的发育,且处理时间越长发育速度越慢。低温处理 1 ~ 4 d 后,若虫的发育历期比恒温 24℃的延长 4 ~ 6 d; 而 5 和 7 d 的低温处理,历期会延长 9 d 左右。低温处理 3 ~ 4 龄若虫 1 ~ 7 d 后,其羽化后成虫的寿命在不同处理时间下的差异较小,仅在处理 4 d 和处理 5 d 间存在显著差异。低温处理后成虫的性比有随处理时间的延长而增大的趋势,并且在处理 4 d 时与 24℃恒温下的 1∶1.57 差异极显著($P < 0.01$)。

低温处理不同时间后,成虫的短翅比例明显高于没经低温处理的对照组,短翅雄性个体的比率随着处理时间的延长而增加,且低温处理 1 ~ 7 d 的均与恒温不处理的存在极显著差异($P < 0.01$)。而短翅雌性个体的比率低温处理 1 d 后的显著高于对照($P < 0.05$); 但处理 2 ~ 7 d 后,羽化出的雌虫已全部为短翅个体,没有长翅个体出现,均与对照组存在极显著差异($P < 0.01$)。由此说明,短期低温胁迫灰飞虱 3 ~ 4 龄若虫,对其翅型分化有显著影响,低温处理时间越长,短翅比例越高(表 1)。

2.3　低温对灰飞虱繁殖力的影响

由表 2 可知,低温处理后,灰飞虱的产卵前期与对照相比有明显的缩短趋势,但仅在处理 1、3 和 5 d 的显著短于对照,处理 1 ~ 7 d 间无显著差异。雌虫寿命以处理 2 d 的最长,且显著长于处理 4 d 的和对照; 而处理 1、3、4、5 和 7 d 的与对照无显著差异。低温处理不同时间后羽化的雌虫,其产卵量与没经过低温处理的对照间无显著差异,平均产卵量均在 125 粒/♀以上,并且低温处理2 d 后羽化出的雌虫其单雌的最高产卵量达 405 粒,要比对照组的高出 100 粒。由此说明,灰飞虱在 3 ~ 4龄若虫期受 -6 ~ 2℃的低温处理 7 d,对存活下来的成虫的繁殖力没有影响。

3　讨论

昆虫受低温胁迫后会表现出冻倒甚至死亡的现象。浦茂华(1963)研究表明,灰飞虱 3 龄若虫在 0 ~ 4℃条件下持续 720 min(0.5 d)以内无冻倒现象产生; 持续 1 200 min(20 h)时仅有 14.3% 的虫冻倒,且均可复苏。若虫在越冬期间并不休眠,仅在 -3℃下且持续时间较长时才产生麻痹冻倒的现象,但除部分致死外,其它仍能复苏。灰飞虱 3 ~ 4 龄若虫的过冷却点在 -22℃以下,表现出了

表 1 低温胁迫不同时间后灰飞虱的发育历期、成虫寿命、性比和翅型

Table 1 Developmental duration, longevity, sex ratio and brachyptery rate of SBPH shocked different days at 3 – 4th instar nymphae by low temperature

处理时间(d) Treat duration	羽化个体数 Number of adult	3 ~ 4 龄若虫 – 成虫的时间(d) Duration from 3 – 4th instar to adult	成虫寿命(d) Longevity of adult	性比(♀:♂) Sex ratio	短翅比例 Ratio of brachyptery	
					♀	♂
CK	77	7.27 ± 0.38c	22.37 ± 1.48ab	1:1.57	0.87	0
1	102	11.41 ± 0.32b	22.96 ± 1.31ab	1:1.13ns	0.96*	0.31**
2	47	12.60 ± 0.46b	25.00 ± 1.92ab	1:1ns	1.00**	0.29**
3	37	12.54 ± 0.45b	21.03 ± 2.26ab	1:2.70ns	1.00**	0.33**
4	10	13.10 ± 1.09b	18.10 ± 4.71b	1:0.25**	1.00**	0.5**
5	18	16.50 ± 0.99a	26.39 ± 1.85a	1:0.80ns	1.00**	0.5**
7	22	16.22 ± 0.69a	26.13 ± 2.93ab	1:0.77ns	1.00**	0.8**

注: 同列数据后不同小写字母代表各处理时间间存在显著差异。* 和 ** 分别表示性比和雌、雄虫短翅型比率分别与对照存在显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)差异; ns 表示无显著差异。下表同。

Data followed by different lowercase in the same column indicate significant difference among different treat durations at 0.05 level. * and ** indicate significant difference of sex ratio, ratio of brachyptery of female and male compared with control (CK) at 0.05 and 0.01 level, respectively. ns means no significant difference. The same blow.

表 2 低温处理不同时间后雌虫的产卵前期、寿命和繁殖力

Table 2 Preoviposition duration, longevity and fecundity of female shocked different days at 3 – 4th instar nymphae by low temperature

处理时间(d) Treat duration	雌虫数 Number of females	产卵前期(d) Preoviposition period	雌虫寿命(d) Longevity of female	平均产卵量(粒/♀) Average number of eggs per female	最大产卵量(粒/♀) Maximum number of egg per female
CK	9	3.2 ± 0.4a	22.7 ± 2.1bc	166.4 ± 32.9a	301
1	39	2.2 ± 0.2b	26.0 ± 1.8abc	151.3 ± 15.7a	367
2	21	2.4 ± 0.2ab	33.8 ± 2.0a	215.5 ± 17.5a	405
3	10	2.2 ± 0.2b	27.1 ± 3.6abc	144.9 ± 27.2a	309
4	6	2.5 ± 0.6ab	21.5 ± 6.3c	125.8 ± 49.9a	321
5	11	2.3 ± 0.3b	28.3 ± 1.8abc	201.2 ± 19.4a	317
7	11	3.0 ± 0.4ab	31.6 ± 3.5ab	168.8 ± 30.0a	328

强的抗寒力(张爱民和刘向东,2010)。本研究表明,灰飞虱若虫的死亡率随着 –6 ~ 2℃ 低温处理时间的延长而升高,但冷冻处理 3 d 后,其累积死亡率上升很慢,继续冷冻的致死效果不明显。由此说明,灰飞虱的 3 ~ 4 龄若虫有很强的耐寒性。–6 ~ 2℃ 低温处理 1 d(24 h)后灰飞虱的昏迷率和死亡率分别为 50% 和 22%,这与前人 20 h 低温处理的结果基本相符(浦茂华,1963)。

温度对昆虫的翅型分化有一定影响。田间调查发现灰飞虱越冬若虫羽化的成虫中,短翅型占优势(浦茂华,1963)。在云南保山地区的调查也发现越冬代灰飞虱的短翅型成虫多于长翅型成虫(林莉等,1990)。在 24℃ 和 27℃ 的适宜温度下饲养的灰飞虱,其雄性基本无短翅型产生,但在 18℃ 下饲养时却有 45% 的雄性为短翅型(张爱民等,2008)。本研究也发现在 –6 ~ 2℃ 下胁迫 3 ~ 4 龄若虫的时间越长,雄性的短翅率越高,这进一步说明,低温对灰飞虱翅型的分化有较大影响,并且只要在 3 ~ 4 龄期受到 1 ~ 7 d 的低温胁迫就会影响翅型。

低温对昆虫的存活、成虫交配和繁殖能力均可造成较大的影响。越冬期田间灰飞虱虫量的降

低,这不仅与寄主植物营养的变差有关,而且有温度降低的重要影响。本研究发现,低温处理后灰飞虱的存活率明显降低。春季灰飞虱种群的迅速上升,这与气温等环境条件变好有直接关系,不过,这也与灰飞虱受低温胁迫后其繁殖力没有下降,反而有所提高的特性有关。另外,3 ~ 4 龄若虫期受低温胁迫后,其成虫的产卵前期缩短、成虫寿命延长,这增长了灰飞虱的产卵期,从而产卵量提高,因此越冬后种群数量增长较快。同时,3 ~ 4 龄若虫低温处理后,其发育出的雌成虫短翅比率以及性比均提高,这无疑将提高其繁殖率,从而引起种群数量的迅速上升。因此,灰飞虱 3 ~ 4 龄期经受 -6 ~ 2℃ 的低温,不仅不会抑制其后代的种群数量,反而会致使种群数量的急增。不过,低温处理后,灰飞虱繁殖力与适应性提高的生理机制等,还值得继续研究。

参考文献(References)

Addo-Bediako A, Chown SL, Gaston KJ, 2002. Metabolic cold adaptation in insects: a large-scale perspective. *Functional Ecology*, 16(3): 332—338.

Bae SD, Song YH, Park KB, 1995. Study on the bionomics of overwintering small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* Fallén, in Milyang. *Korean Journal of Applied Entomology*, 34(4): 321—327.

Bale JS, 1989. Cold hardiness and over-wintering of insects. *Agricultural Zoology Reviews*, 3: 157—192.

Bale JS, 1991. Insects at low temperature: a predictable relationship. *Functional Ecology*, 5(2): 91—298.

Bale JS, 2002. Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 357(1423): 849—862.

Block W, 1982. Cold hardiness in invertebrate poikilotherms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 73(4): 581—593.

陈兵,康乐, 2005. 昆虫对环境温度胁迫的适应与种群分化. 自然科学进展, 15(3): 261—271.

蔡邦华,黄复生,冯维熊,傅亿荣,董其芬, 1964. 华北稻区灰稻虱的研究. 昆虫学报, 13(4): 552—571.

郝丹青,顾才东,洪波, 1995. 灰飞虱发生规律与防治. 宁夏农学院学报, 16(1): 74—78.

Hoffman AA, Sorensen JG, Loeschcke V, 2003. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology*, 28(3): 175—213.

Kisimoto R, 1989. Flexible Diapause response to photoperiod of a laboratory selected line in the small brown planthopper, *Laodelphax striatllus* Fallén. *Appl. Entomol. Zool.*, 24(1): 157—159.

林莉,刘玉彬,包绍永,李晓铭, 1990. 灰飞虱生物学特性及传毒特性研究初报. 云南农业科技, 3: 16—20.

林志伟,刘洋,辛惠, 2004. 寒地稻田灰飞虱生物学特性初步研究. 黑龙江八一农垦大学学报, 16(2): 15—18.

刘芹轩,张桂芬,孙万启, 1982. 河南省三种稻飞虱的发生和生物学特性. 昆虫知识, 19(5): 1—5.

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

Mishiro K, Fujisaki K, Nakasuji F, 1994. Comparison of female reproductive effort and male mating success between macropterous and brachypterous forms. *Appl. Entomol. Zool.*, 29(2): 211—217.

浦茂华, 1963. 苏南灰稻虱(*Delphacodes striatella* Fallén)的初步研究. 昆虫学报, 12(2): 117—135.

Sφrensen JG, Kristensen TN, Loescheke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecological Letters*, 6(11): 1025—1037.

夏温澍, 1962. 武昌灰稻虱的初步研究. 昆虫学报, 11(2): 105—117.

Zachariassen KE, 1985. Physiology of cold tolerance in insects. *Physiological Reviews*, 65(4): 799—832.

张爱民,刘向东, 2010. 灰飞虱的种群特性及其与温度的关系. 昆虫知识, 47(2): 326—330.

张爱民,刘向东,翟保平,顾晓莹, 2008. 温度对灰飞虱生物学特性的影响. 昆虫学报, 51(6): 640—645.

应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2011,48(5):1314—1320

南方水稻黑条矮缩病毒介体昆虫白背飞虱的传毒特性*

曹 杨[1] 潘 峰[2] 周 倩[1] 李冠华[1] 刘双清[1] 黄志农[3] 李有志[1]**

(1. 湖南农业大学生物安全科技学院植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室 长沙 410128;
2. 湖南省永顺县植物保护站 永顺 416700;3. 湖南省植物保护研究所 长沙 410126)

摘 要 白背飞虱 *Sogatella furcifera*(Horváth)为传播南方水稻黑条矮缩病病毒(SRBSDV)的媒介昆虫,阐明其传毒特性将有助于了解南方水稻黑条矮缩病的发生流行规律和建立相应的防治方法。本研究通过 RT-PCR 技术测定了白背飞虱的传毒参数。结果表明,白背飞虱初孵若虫、3 龄若虫、5 龄若虫、长翅型成虫和短翅型成虫的最短获毒时间分别是 11、6、3、2 和 2 min,最长获毒时间分别是 19、12、9、8 和 8 min。在 26℃时,SRBSDV 在不同虫态(初孵若虫、3 龄若虫、5 龄若虫、长翅型成虫和短翅型成虫)的白背飞虱体内的循回期分别是 7~11、5~8、3~7、4~8 和 3~6 d。5 龄若虫、长翅型和短翅型成虫在三叶一心稻苗的最短接毒时间为 4、5 和 6 min,最长接毒时间为 8、10 和 11 min;它们在分蘖初期稻苗上的最短接毒时间分别是 5、7 和 7 min,最长接毒时间分别是 10、12 和 12 min。白背飞虱获毒后可终身传毒,但不能经白背飞虱卵传毒,单虫最多传毒株数为 87 株,平均传毒 48.3±0.8 株。可见,该虫具有较强的获毒能力和传毒能力,秧苗易感染 SRBSDV。因此,在防治上应尽量清除田间 SRBSDV 毒源植物,减少白背飞虱获毒的机会,在秧田期和移栽初期应重点防治飞虱。

关键词 白背飞虱,南方水稻黑条矮缩病毒,获毒饲育时间,循回期,接毒取食时间

Transmission characteristics of *Sogatella furcifera*: A vector of the *Southern rice black-streaked dwarf virus*

CAO Yang[1] PAN Feng[2] ZHOU Qian[1] LI Guan-Hua[1] LIU Shuang-Qing[1]
HUANG Zhi-Nong[2] LI You-Zhi[1]**

(1. Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, College of Biosafety Science & Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
2. Plant Protection Station of Yongshun County, Yongshun 410650, China;
3. Institute of Hunan Provincial Plant Protection, Changsha 410125, China)

Abstract *Sogatella furcifera* (Horváth) is an important vector of the *Southern rice black-streaked dwarf virus* (SRBSDV). Establishing the transmission characteristics of this species is therefore important to determining the periodicity of this disease and developing effective control methods for it. The presence or absence of SRBSDV in different life-stages of *S. furcifera* was determined using RT-PCR. The results show that the viral acquisition periods of first instar nymphae, third instar nymphae, fifth instar nymphae, macropters and brachypters were 11-19 min, 6-12 min, 3-9 min, 2-8min and 2-8 min, respectively. At 26℃, the circulative period of SRBSDV in the body of these different life-stages was 7-11 d, 5-8 d, 3-7 d, 4-8 d and 3-6 d, respectively. The shortest periods required for the transmission of the virus to rice seedlings at the three-leaf stage by each of these developmental stages were 4 min, 5 min and 6 min, respectively, whereas the longest were 8 min, 10 min, and 11 min, respectively. The shortest period required for infection of rice seedlings at the early tillering stage by fifth instar nymphae and macropter and brachypter stages were 5 min, 7 min and 7 min, respectively, whereas the longest were 10 min, 12 min and 12 min, respectively. Once infected with the virus, individual *S. furcifera* can remain infectious for life. However, the virus is not passed on to the egg stage. The maximum

* 资助项目:湖南省水稻产业技术体系专项资助(2010-2014)、湖南省研究生创新项目资助(CX2010B297)
**通讯作者,E-mail: liyouzhi2008@sina.com
收稿日期:2011-08-01,接受日期:2011-09-01

number of rice plants infected with SRBSDV by a single *S. furcifera* was 87 and the average was 48.3 ± 0.8. The results indicate that *S. furcifera* has a strong capacity for both the acquisition and transmission of SRBSDV, and that rice seedlings are highly susceptible to SRBSDV. The prevention and control of SRBSDV requires both effective control of *S. furcifera* in rice seedling beds and the weeding out of infected rice plants.

Key words　*Sogatella furcifera*, *Southern rice black-streaked dwarf virus*, acquisition period, circulative period, inoculative periods

南方水稻黑条矮缩病是近年来流行于南方稻区的一种水稻新病害,南方水稻黑条矮缩病毒(*Southern rice black-streaked dwarf virus*,SRBSDV)是该病病原(Zhang *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008)。水稻在秧苗期感染该病毒后出现矮缩、不抽穗,严重影响产量,甚至绝收(刘万才等,2010)。现已确定白背飞虱 *Sogatella furcifera*(Horváth)(WBPH)为传播该病毒的主要介体(Zhou *et al.*, 2008; 郭荣等,2010)。白背飞虱是危害水稻的一种迁飞性害虫(沈君辉等, 2003; 汪远坤和翟保平, 2004; 包云轩等, 2007),该虫本身也是南方水稻黑条矮缩病毒的寄主(Zhou *et al.*, 2008)。目前该病毒病的发生地涉及到国内的海南、两广、湖南、江西、江浙以及国外的越南等地(Zhou *et al.*, 2008; Ha *et al.*, 2009; 陈卓等,2010; 郭荣等,2010; 刘万才等,2010; 张松柏等,2010; 周倩等, 2010)。据湖南省植保站统计,湖南省 2009 年水稻大面积出现矮缩,成灾面积近 2 万 km^2; 2010 年该病在湖南进一步扩散、蔓延,发生面积近千万亩。

作为一种病毒病,目前市场上缺少可有效防治该病的药剂,田间调查也没有发现抗病水稻品种。因此,当前对该病的防治主要依赖于治虫防病(刘万才等,2010)。由于湖南省白背飞虱的迁入批次多,虫源地不明,迁入时间难以把握,而且该虫的传毒特性还不十分清楚。基础研究的缺失使得对 SRBSDV 测报困难、防控盲目性大、可用措施不多、长期防控效果不佳(翟保平等,2011)。

本研究拟针对南方水稻黑条矮缩病毒介体昆虫白背飞虱传毒特性不十分清楚的现状,试图探明 SRBSDV 介体昆虫白背飞虱在毒源植物稻苗上的获毒饲育时间、SRBSDV 在其体内的循回期、该介体在不同生育期水稻上接毒取食时间以及该虫在稻田终身最大传毒株数。阐明白背飞虱的这些传毒参数,不仅有助于评估该虫的传毒能力,而且有助于了解南方水稻黑条矮缩病的发生流行规律,更重要的是为揭示其灾变规律,制定有效防治措施提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料

水稻品种为陵两优 268(湖南亚华种子有限公司生产);白背飞虱为室内连续多代饲养,寄主植物为水稻苗;毒苗为事先经 RT-PCR 检测带有 SRBSDV 的盆栽水稻苗。

TRIzol Total RNA Reagent 由 Invitrogen 公司提供; M-MLV 逆转录酶、*Taq* DNA Polymerase 和 dNTPs 由贝博生物试剂公司提供; 氯仿、异戊醇、异丙醇和无水酒精由国药集团化学试剂有限公司提供; 引物参照文献(周倩等,2010)中设计的一对引物,S10F(5′-TTAAGTTTATTCGCAACTTCGAAG-3′), S10R(5′-GTGATTTGTCAGCATCTAAAGCG-3′),扩增产物约 500 bp。

1.2　水稻中 SRBSDV 的检测方法

总 RNA 提取: 取待测水稻叶片 50 ~ 100 mg 左右,在液氮中充分研磨后,加 1 000 μL TRIzol。混匀后转入 1.5 mL 离心管中,加 500 μL 氯仿/异戊醇(v/v = 24∶1),涡旋振荡后冰浴 15 min。12 000 r/min,4℃离心 15 min,取上层水相,加 500 μL 异丙醇,冰盒中放置 15 min。12 000 r/min,4 ℃离心 10 min,弃上清。用 1 000 μL 80% 乙醇洗涤沉淀,12 000 r/min,4 ℃离心 5 min。去上清液后真空干燥 3 ~ 5 min,再用 20 μL DEPC 水(ddH_2O)溶解沉淀,-20 ℃保存。

cDNA 链的合成: 取 RNA 样品 3.0 μL,ddH_2O 7.0 μL,引物 S10F 和 S10R(10 mmol/L)各 1.0 μL,65℃变性 5 min。加入 M-MLV Buffer 4.0 μL, dNTP(10mmol/L) 2.0 μL,30℃ 10 min。再加入 M-MLV 1 μL,42 ℃20 min。然后 99 ℃5 min,自然冷却至室温后,-20 ℃保存。

PCR 扩增: 取 cDNA 2.0 μL,引物 S10F 和 S10R(10 mmol/L)各 1.0 μL, *Taq* Buffer 2.5 μL,

dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μL,2.5 U/μL *Taq* 0.5 μL,反应总体系为 25.0 μL。94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,35 个循环;72 ℃延伸 10 min。取反应产物 5.0 μL,加 1.0 μL 上样缓冲液。经 1% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后,在凝胶成像系统中照相并观察。

1.3 传毒介体获毒时间的测定

供试昆虫:首先在培养皿内装有约 0.5 cm 厚的琼脂培养基,然后在培养基上放置半透膜,再在膜上放置即将孵化的卵。孵化后的若虫在该培养皿内继续放置 3 ~ 5 h。这样获得的若虫被视为饥饿 3 ~ 5 h 的若虫。其它虫态的白背飞虱为无毒稻苗饲养,然后转移至养虫缸内饥饿 3 ~ 5 h 后供进一步试验用。

测定方法参考《植物病毒鉴定》(《植物病毒鉴定》编写组,1980),并稍作改动。分别在不同的盆栽带毒稻苗上接入饥饿 3 ~ 5 h 的相同龄期若虫或相同翅型成虫(初孵若虫、3 龄若虫、5 龄若虫、长翅型成虫和短翅型成虫)各 800 头(无毒虫)。接虫后每隔 1 min 取一批(30 头以上)相同龄期若虫或相同翅型的白背飞虱,分别将这批虫转移至盆栽稻苗上(1 株/盆,稻苗上套有纱网),每苗接虫 1 头。接虫后继续观察,接虫 4 d 后该虫在稻苗上正常活动则认为该苗接虫成功。25 d 后每批检测 30 株接虫成功的稻苗是否感染病毒,单苗检测,检测方法见 1.2。如果某稻苗检测出带毒,则认定该苗上所接飞虱在其饲毒期内成功获毒。最早检出带毒稻苗上的那一批白背飞虱的饲毒时间为最短获毒时间;病毒检出率为 100% 的那一批白背飞虱饲毒的时间为最长获毒时间。试验时养虫室内温度为(26 ± 1) ℃。稻苗生育期为三叶一心。

1.4 病毒在传毒介体体内的循回期测定

分别测定环境温度为 20、26、30℃ 时的循回期。测定方法参考《植物病毒鉴定》(《植物病毒鉴定》编写组,1980),并稍作改动。具体是测定前分批播种,获得数批生育期、长势相同的盆栽水稻幼苗(1 苗/盆)。接虫时稻苗生育期为三叶一心。盆栽稻苗在接虫前后均套有防虫网。

将 3 龄无毒若虫在毒苗上饲毒 24 h 后,将其转移至无毒稻苗上,每苗 1 头,24 h 后转移至下批苗(晚播 24 h)上,接毒 24 h 后再将其转移至下一批的稻苗上,依此类推直至该虫衰老死亡为止。在连续转移接虫的过程中,尽量确保每头虫在稻苗上接虫成功。接虫 12 h 后,飞虱仍能在稻苗上正常活动则视为此次接虫成功。如果某头飞虱在衰老死亡前多次转移接虫均成功,则该虫取食过的不同批次的所有稻苗均需经 RT-PCR 检测是否感染 SRBSDV,然后根据稻苗是否感染 SRBSDV,接虫日期以及试虫饲毒日期计算循回期;否则,该虫及被该虫取食过的稻苗将不会被用于循回期的测定。最终确保可用于测定循回期的试虫数为 25 头。接虫 25 d 后检测每株稻苗是否带毒,检测方法见 1.2。分别记录每虫的饲毒日期以及该虫在每株稻苗上的接虫日期。该病毒在 3 龄白背飞虱若虫体内循回期的计算方法:在这 25 头有效试虫中,最先导致稻苗染毒的某头飞虱的饲毒日期与接虫日期之间的相隔天数为最短循回期;最迟导致稻苗染毒某飞虱的饲毒日期与接虫日期之间的相隔天数为最长循回期。

SRBSDV 在其它龄期若虫、长翅型成虫和短翅型成虫体内循回期的测定方法同该病毒在 3 龄若虫体内循回期的测定方法。

1.5 传毒持久性测定

测定方法见《植物病毒鉴定》(《植物病毒鉴定》编写组,1980),结合循回期测定进行观察。如果带毒虫只有在第 1 或第 1、2 两次转移时传毒,以后均不传毒,判定这种传毒关系为非持久性的;如果毒虫从开始转移到中间若干次都能传毒,而后不能传毒,则判定为半持久性传毒;如果毒虫从开始转移传毒,且一直持续到介体昆虫死亡为止,则判定为持久性传毒。

1.6 寄主植物接毒时间测定

测定方法参考《植物病毒鉴定》(《植物病毒鉴定》编写组,1980),并稍作改动。将一批三叶一心和分蘖初期的水稻单苗连根放入试管内,试管底部加入少量水,然后塞入适量棉花,并确保棉花在水的上方保证飞虱不掉入水中。毒虫为室内连续多代在带毒水稻苗上饲养的白背飞虱,将发育一致的 5 龄若虫、长翅型成虫、短翅型成虫接入试管内的稻苗上。每管接虫一头,饲育不同时间(以分钟为单位)后取出稻苗移栽。移栽后正常管理,20 d 后检测每株稻苗是否感染病毒,检测方法见 1.2。分别记录每株稻苗的接虫时间、接虫虫态。每处理重复 30 次。最后统计染毒稻苗的接毒时间。