

青稞种质资源对大麦黄矮病毒的抗性鉴定和生理分析

向思琪^{1,2}, 羊海珍¹, 旺 姆¹

(¹省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室, 拉萨 850002; ²西藏农牧学院, 林芝 860000)

摘要: 为明确青稞种质资源对大麦黄矮病毒(BYDV, barley yellow dwarf virus)的抗性水平,本研究采用田间人工接种法,对245份青稞材料进行了连续3年抗病性鉴定。供试材料中仅有08-1280表现为高抗黄矮病,6份材料(ZYM1289、北青6号、ZDM4409、甘青2号、藏青3000、ZYM1853)表现为抗病,中抗、感病、高感材料分别有47份、173份、18份。分子标记检测结果显示08-1280携带Yd2抗性基因。为了解大麦黄矮病毒侵染对青稞抗性生理指标的影响,分析了接种病毒后高抗材料08-1280、高感材料康青3号中总酚、脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白含量的变化差异。接种后10 d,高抗材料总酚、脯氨酸含量增加幅度显著高于高感材料。接种后30 d时,高抗材料总酚含量增加幅度高于高感材料,可溶性糖含量增加幅度显著低于高感材料;与对照组相比,高抗材料可溶性蛋白显著下降,高感材料显著上升。本研究为青稞抗病品种培育和抗性机制研究提供了优异资源和理论参考。

关键词: 青稞;大麦黄矮病毒;抗性鉴定;抗性生理

Resistance Identification of Hulless Barley Germplasm Resources to Barley Yellow Dwarf Virus and Physiological Analysis

XIANG Si-qi^{1,2}, YANG Hai-zhen¹, WANG Mu¹

(¹State Key Laboratory of Hulless Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement, Lhasa 850002; ²Tibet Agriculture & Animal Husbandry University, Linzhi 860000)

Abstract: To evaluate the resistance of hulless barley to barley yellow dwarf virus (BYDV), 245 hulless barley genotypes were tested by inoculation with viruliferous aphids under field conditions in three calendar years. The results showed that the genotype 08-1280 was highly resistant to BYDV, and six genotypes (ZYM1289, Beiqing 6, ZDM4409, Ganqing 2, Zangqing 3000, ZYM1853) were resistant. 47, 173 and 18 genotypes showed moderately resistance, susceptibility and highly susceptibility to BYDV, respectively. The genotype 08-1280 was found carrying the resistance gene *Yd2* based on genotyping using molecular marker. Moreover, to gain a better understanding of physiological mechanism of hulless barley against BYDV infection, the differences in total phenol, proline, soluble sugar and soluble protein content between resistant genotype 08-1280 and susceptible genotype Kangqing 3 were investigated. At 10 days after inoculation, the contents of total phenol and proline were elevated in 08-1280, higher than that of Kangqing 3. At 30 days after inoculation, a higher increase of total phenol in resistant genotype, if compared to that of susceptible genotype, was detected, while an opposite result for the soluble sugar was observed; the soluble protein decreased dramatically in 08-1280, whereas increased in Kangqing 3. Collectively, this study provided elite germplasm resources and theoretical reference in breeding of resistant varieties and analysis of resistant mechanisms in hulless barley.

Key words: hulless barley; barley yellow dwarf virus; resistance identification; resistant physiology

收稿日期: 2022-12-31 修回日期: 2023-02-07 网络出版日期: 2023-03-02

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20221231001>

第一作者研究方向为青稞资源评价与利用, E-mail: xsq13060083703@163.com

通信作者: 羊海珍, 主要研究方向为青稞遗传育种, E-mail: 17782673107@163.com

基金项目: 西藏自治区重大科技专项(XZ202101ZD0004N); 国家大麦青稞产业技术体系(CARS-05-01A-08)

Foundation projects: Tibet Department of Major Projects (XZ202101ZD0004N); National Barley and Highland Barley Industry Technology System Program (CARS-05-01A-08)

青稞(*Hordeum vulgare* L. var. *nudum*)又称裸大麦,主要分布在西藏、青海、云南迪庆州、四川甘孜州、四川阿坝州和甘肃甘南州等地区。青稞具有高蛋白、高维生素、高可溶性纤维、低脂肪、低糖等组分特性,且富含 β -葡聚糖、 γ -氨基丁酸、母育酚等多种活性物质,因而日益受到人们的关注,在食品、保健等行业中具有广阔的应用前景^[1-2]。由于青稞对极端环境的适应性较强,使其成为了青藏高原地区藏族人民的主要粮食作物和重要的畜牧饲料^[3]。西藏是世界上青稞资源最丰富的地区之一,种植面积占总耕作面积的70%以上^[4]。近年来,青稞病虫害发生频率逐渐上升,其中,黄矮病在西藏各个青稞种植区时有发生^[5],给青稞生产造成了极大的损失。青稞黄矮病是由大麦黄矮病毒(BYDV, barley yellow dwarf virus)侵染引起的一种病毒病害,由特定的蚜虫以持久循环非增殖的方式传播^[6]。大麦黄矮病毒可侵染小麦、大麦、玉米等多种禾本科作物,被侵染的作物通常表现出叶片发黄、植株矮化、抽穗率降低等症状,进而影响作物的产量和品质^[7]。据报道,大麦黄矮病毒造成的作物产量损失范围为5%~80%^[8],严重地块甚至绝收。

实践证明,筛选抗黄矮病种质资源,挖掘抗病基因,培育抗病品种是防治黄矮病最经济、有效的方法。目前,在大麦中发现了4个与大麦黄矮病毒抗性相关的基因(*Ryd1*、*Ryd2*、*Ryd3*、*Ryd4Hb*)和少量QTL。*Ryd1*是从大麦品种Rojo中鉴定出的1个隐性基因^[9],由于效率低而未应用于育种。*Ryd2*(*Yd2*)基因是通过在埃塞俄比亚大麦品种的抗性筛选发现的^[10],为不完全显性基因,定位于3号染色体上^[11]。该基因是大麦育种中使用的主要抗性基因^[12],已被引入多个大麦品种中。目前,已开发出与*Ryd2*基因共分离且易于利用PCR技术检测的分子标记,提高了选择效率^[13-15]。Niks等^[16]在大麦品种L94中发现了抗黄矮病基因*Ryd3*,并将其定位于6号染色体,目前该基因已被引入两个冬大麦品种^[17]。*Ryd4Hb*是在球茎大麦(*Hordeum bulbosum*)中发现的抗黄矮病基因^[18],已引入到普通大麦,但由于连锁阻力,至今仍未应用于大麦育种^[19]。关于抗黄矮病大麦种质资源的鉴定,国内仅有零星报道,国外报道的抗源以冬性皮大麦居多^[20],能应用于青稞育种的有效抗源很少。本研究于2019、2020、2022年对245份青稞种质资源的黄矮病抗性进行了3次鉴定,从中筛选抗病资源,并利用已知黄矮病抗性基因*Yd2*紧密连锁分子标记对高抗、抗病资源进行检测,为青稞品种选育和抗性遗传研究提供材料。

寄主植物受病原物侵染后,体内会产生一系列生理代谢响应,导致叶绿素、激素、防御酶、碳水化合物、氨基酸、蛋白质等含量发生改变,以促进或抑制病原物的侵染^[21-22]。在植物寄主与病毒的相互作用过程中,可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸等渗透调节物质的变化与抗病性密切相关^[23-25]。酚类是植物中常见的抗菌和抗病毒化合物,感病植物中酚类化合物的积累被认为是一种植物防御反应^[26-27]。鉴于目前对大麦黄矮病毒与青稞的互作机制缺乏全面的认知,本研究在黄矮病抗性评价的基础上,利用1对具有代表性的高抗、高感黄矮病青稞材料,比较分析了大麦黄矮病毒侵染对相关生理指标的影响,以期为青稞黄矮病抗性机制探索提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试春青稞种质资源共245份(表1),均由西藏自治区农牧科学院农业研究所提供。其中,西藏材料161份(以ZYM开头的26份为半野生材料,以ZDM开头的99份为农家品种,其余为育成品种)、国内其他地区材料44份(青海材料29份,四川材料12份,甘肃材料3份)、国外材料40份(加拿大材料13份,墨西哥材料10份,丹麦材料8份,日本材料4份,美国材料3份,尼泊尔材料2份)。供试毒源和蚜虫采集自拉萨发病田块,经过鉴定,病原为BYDV-GAV,传毒介体为麦长管蚜*Sitobion avenae*(Fabricius)。

1.2 黄矮病田间抗性鉴定

严重度及抗性评价标准参照中华人民共和国农业行业标准《NY/T 3060.6-2016大麦品种抗病性鉴定技术规程第6部分:抗黄矮病》^[28]。采用条播法,2019、2020、2022年进行3次青稞黄矮病抗性鉴定。每年5月在西藏自治区农牧科学院网室试验地(29°38'17"N,91°1'53"E)内,根据不同青稞材料的生育期长短,按晚熟、中熟、早熟的顺序,分批次进行播种。每行播种40粒,行长1.0 m,行距0.25 m,每隔20行播种1行感病对照品种藏青2000。每份材料共播种4行,其中3行为接种组,1行为不接种蚜虫的对照组。接种前,将无毒蚜虫转接至青稞病株上,在温度21℃/18℃(昼/夜)、光周期16 h/8 h(昼/夜)的人工气候室中饲毒7 d,获得大量带毒蚜虫。青稞分蘖后期,将有带毒蚜虫的青稞病叶剪成小段,用镊子转移至青稞植株上,每株接种4~6头蚜虫,接种15 d后,全田喷施吡虫啉杀灭蚜虫。试验田四周种植保护行,肥水和耕作管理与大田生产相

同,根据情况及时喷施杀菌剂。于青稞灌浆期调查黄矮病的发生情况,每行材料随机调查 10 株,记录每株发病的严重度。严重度分为 6 级,0 级:所有叶片无黄化;1 级:部分叶片尖端黄化;2 级:旗叶下 1~2 片叶的叶尖黄化;3 级:旗叶和其他叶片黄化面积均占总叶面积的 1/2 以下;4 级:旗叶和其他叶片黄化面积均占总叶面积的 1/2 以上;5 级:几乎所有叶

片黄化,植株矮化明显,穗变小甚至不抽穗。每年至少调查两次,各年以最重的发病严重度为准。用 3 年的平均发病严重度 FDS (Final disease severity) 评价种质资源的抗病性:FDS=0 为免疫(IM); $0 < FDS < 1.0$ 为高抗(HR); $1.0 \leq FDS < 2.0$ 为抗病(R); $2.0 \leq FDS < 3.0$ 为中抗(MR); $3.0 \leq FDS < 4.0$ 为感病(S); $S \geq 4.0$ 为高感(HS)。

表 1 245 份青稞种质资源信息

Table 1 245 germplasm resources of hulless barley information

来源 Origin	数量 Number	种质名称 Germplasm name
中国西藏 Tibet, China	161	藏青 1, 藏青 2, 藏青 13, 藏青 16, 藏青 17, 藏青 80, 藏青 85, 藏青 148, 藏青 320, 藏青 336, 藏青 690, 藏青 2000, 藏青 3000, 藏青 3179, 藏青 7239, 喜拉 1, 喜拉 2, 喜拉 3, 喜拉 5, 喜拉 6, 喜拉 10, 喜拉 13, 喜拉 15, 喜拉 19, 喜拉 22, 阿青 5 号, 山青 6 号, 昌都青稞, 山南白青稞, 阿里白青稞, 拉萨紫青稞, 拉萨苟芒, 林芝黑六棱, 高原早 1 号, 长芒红四棱, 针芒紫青稞, ZYM0254, ZYM0303, ZYM0439, ZYM0762, ZYM0850, ZYM0861, ZYM1047, ZYM1099, ZYM1202, ZYM1262, ZYM1288, ZYM1289, ZYM1408, ZYM1478, ZYM1490, ZYM1654, ZYM1850, ZYM1853, ZYM1900, ZYM1953, ZYM2162, ZYM2183, ZYM2195, ZYM2501, ZYM2507, ZYM2638, ZDM05021, ZDM06853, ZDM07635, ZDM09814, ZDM09748, ZDM09767, ZDM09772, ZDM09777, ZDM09802, ZDM09824, ZDM4289, ZDM4407, ZDM4409, ZDM4412, ZDM4426, ZDM4438, ZDM4465, ZDM4477, ZDM4472, ZDM4491, ZDM4503, ZDM4505, ZDM4520, ZDM4526, ZDM4530, ZDM4538, ZDM4541, ZDM4545, ZDM4553, ZDM4556, ZDM4576, ZDM4581, ZDM4587, ZDM4591, ZDM4650, ZDM4674, ZDM4678, ZDM4682, ZDM4686, ZDM4689, ZDM4690, ZDM4697, ZDM4699, ZDM4706, ZDM4714, ZDM4735, ZDM4746, ZDM4749, ZDM4757, ZDM4760, ZDM4763, ZDM4765, ZDM4771, ZDM4773, ZDM4775, ZDM4778, ZDM4780, ZDM4787, ZDM4789, ZDM4790, ZDM4792, ZDM4797, ZDM4799, ZDM4802, ZDM4804, ZDM4807, ZDM4824, ZDM5445, ZDM5451, ZDM5458, ZDM5462, ZDM5466, ZDM5471, ZDM5476, ZDM5479, ZDM5481, ZDM5491, ZDM5495, ZDM5535, ZDM5547, ZDM5554, ZDM5557, ZDM5562, ZDM5565, ZDM5572, ZDM5577, ZDM5579, ZDM5582, ZDM5585, ZDM5604, ZDM5609, ZDM5618, ZDM5673, ZDM5686, ZDM5716, ZDM5740, ZDM5780, ZDM5785, ZDM5787
国内其他地区 Other regions of China	44	甘青 1 号, 甘青 2 号, 甘青 3 号, 昆仑 1 号, 昆仑 2 号, 昆仑 3 号, 昆仑 8 号, 昆仑 10 号, 昆仑 13 号, 昆仑 164, 北青 1 号, 北青 3 号, 北青 4 号, 北青 5 号, 北青 6 号, 北青 7 号, 北青 8 号, 北青 9 号, 康青 3 号, 康青 5 号, 康青 7 号, 乐都红胶泥, 青海肚里黄, 乾宁本地青稞, 湟源白浪散, 化隆紫四棱, 海南紫青稞, 理唐勾芒, ZDM02592, ZDM08086, ZDM08108, ZDM08141, ZDM08177, ZDM08193, ZDM08205, ZDM08217, ZDM08227, ZDM08706, ZDM08790, ZDM08811, ZDM08841, ZDM08874, ZDM09463, ZDM09653
国外 Foreign	40	WDM00120, WDM00171, WDM00173, WDM00179, WDM00182, WDM00190, WDM00193, WDM00201, WDM00205, WDM00420, WDM01965, WDM02131, WDM02342, WDM02482, WDM03141, WDM03148, WDM03161, WDM03176, WDM03181, WDM03188, WDM03196, WDM03201, WDM03204, WDM03209, WDM03225, WDM03230, WDM03251, WDM03272, WDM03280, WDM03294, WDM03297, WDM03334, WDM03359, WDM03409, WDM04080, WDM04087, WDM05410, WDM06284, 08-1127, 08-1280

1.3 *Yd2* 基因的分子标记检测

人工气候室内盆栽种植田间抗性鉴定为高抗、抗病的青稞材料,生长至 3 叶期时,采集叶片,使用植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, D1500-50T, 中国),按照说明书提取基因组 DNA。参照 Ford 等^[14]报道的方法,利用 ASPCR-Ylp 显性标记,引物序列为:YlpPCR_M:AATACAGGAATC TGTTGAAAGAA, YlpRAS:CTAGTATCTCTGGCT CAG,进行 *Yd2* 抗性基因检测。

1.4 生理指标测定

在人工气候室内盆栽种植高抗材料 08-1280 及高感材料康青 3 号,待青稞生长至 3 叶期时,用毛笔

将饲毒后的成虫接种至植株的第二片叶(由上至下)上,每株接种 15 头,对照组每株接种 15 头无毒蚜虫,接种 7 d 后喷施杀虫剂。前期的研究发现,在此接种条件下,接种后 10 d 高抗、高感材料叶片的 BYDV 病毒含量无显著差异;接种后 30 d,两个材料叶片中病毒含量差异最大。因此,本研究于接种后 10、30 d 分别采集青稞第一片完全展开的叶子,接种、对照组各设置 3 个生物学重复,每个重复为取自 8 个独立单株的混合样。采用福林酚比色法测定总酚含量^[29],采用茚三酮显色法测定游离脯氨酸含量^[30],采用蒽酮比色法测定可溶性糖含量,采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定可溶性蛋白质含量^[31]。

1.5 数据统计分析

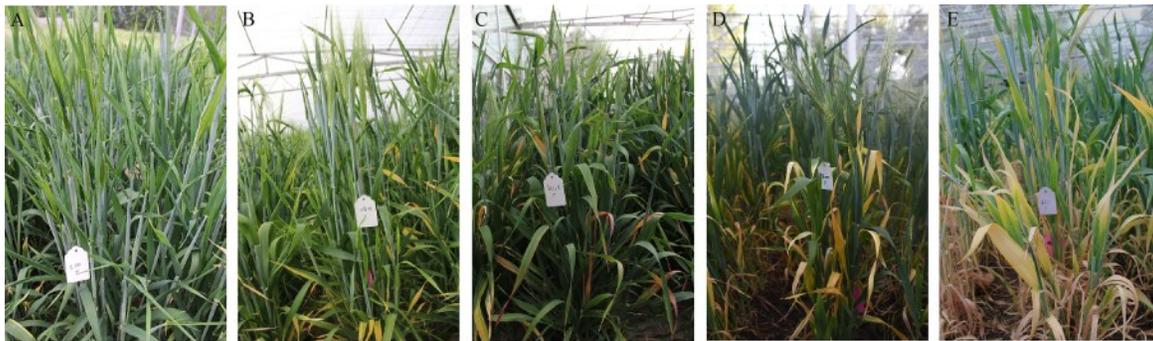
采用Microsoft Excel 2010进行数据整理,使用SPSS 23.0进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 青稞种质资源黄矮病抗性评价

采用田间人工接种法对245份青稞种质资源进行了3年黄矮病抗性鉴定,材料间抗性水平表现出明显差异(图1)。结果显示,245份资源无免疫材

料,仅有1份加拿大引进材料08-1280表现为高抗,占参试材料的0.41%;表现为抗病的材料有6份,占参试材料的2.45%,分别为ZYM1289、北青6号、ZDM4409、甘青2号、藏青3000、ZYM1853;表现为中抗的材料有47份,占参试材料的19.18%(表2);表现为高感的材料有18份,占参试材料的7.35%;其余173份材料均表现为感病,占参试材料的70.61%。鉴定结果表明,77.96%的青稞种质资源对BYDV-GAV表现为感病或高感。



A: 高抗; B: 抗病; C: 中抗; D: 感病; E: 高感
A: HR; B: R; C: MR; D: S; E: HS

图1 青稞接种大麦黄矮病毒后的田间表现

Fig.1 The symptom of hulless barley inoculated with BYDV in the field

表2 青稞种质资源黄矮病抗性种质

Table 2 Resistance germplasm to BYDV in hulless barley

序号 No.	种质名称 Germplasm name	严重度 Final disease severity			平均值 Average	抗性评价 Resistance
		2019	2020	2022		
1	08-1280	0.97±0.05	0.83±0.12	0.87±0.09	0.89±0.06	HR
2	ZYM1289	1.37±0.12	1.17±0.05	1.23±0.12	1.26±0.08	R
3	北青6号	1.23±0.09	1.50±0.08	1.33±0.05	1.35±0.11	R
4	ZDM4409	1.43±0.05	1.57±0.09	1.40±0.00	1.47±0.07	R
5	甘青2号	1.63±0.12	1.43±0.12	1.50±0.16	1.52±0.08	R
6	藏青3000	1.73±0.05	1.53±0.05	1.70±0.08	1.65±0.09	R
7	ZYM1853	1.80±0.08	1.73±0.09	1.83±0.09	1.79±0.04	R
8	ZYM2501	1.93±0.05	2.00±0.08	2.13±0.12	2.02±0.08	MR
9	阿里白青稞	2.17±0.19	2.10±0.08	1.90±0.14	2.06±0.11	MR
10	ZDM02592	2.13±0.12	1.97±0.12	2.10±0.08	2.07±0.07	MR
11	ZDM05021	2.20±0.14	2.10±0.14	2.03±0.09	2.11±0.07	MR
12	ZYM1850	2.17±0.09	2.13±0.17	2.13±0.17	2.14±0.02	MR
13	ZDM4472	2.17±0.12	2.20±0.16	2.10±0.08	2.16±0.04	MR
14	ZDM5495	2.27±0.05	2.13±0.05	2.10±0.14	2.17±0.07	MR
15	ZDM4714	2.23±0.12	2.10±0.16	2.20±0.08	2.18±0.06	MR
16	WDM03196	2.23±0.05	2.30±0.08	2.07±0.05	2.20±0.10	MR
17	ZDM09814	2.17±0.19	2.23±0.09	2.30±0.14	2.23±0.05	MR
18	藏青2	2.23±0.05	2.10±0.08	2.37±0.12	2.23±0.11	MR
19	WDM00193	2.23±0.12	2.30±0.14	2.23±0.05	2.25±0.03	MR

表 2 (续)

序号 No.	种质名称 Germplasm name	严重度 Final disease severity				抗性评价 Resistance
		2019	2020	2022	平均值 Average	
20	ZDM4674	2.33±0.05	2.23±0.12	2.27±0.17	2.28±0.04	MR
21	ZDM5445	2.40±0.08	2.23±0.05	2.27±0.12	2.30±0.07	MR
22	WDM03230	2.27±0.09	2.40±0.16	2.30±0.08	2.32±0.06	MR
23	ZYM1654	2.40±0.08	2.23±0.12	2.40±0.08	2.34±0.08	MR
24	WDM03176	2.47±0.09	2.27±0.05	2.37±0.09	2.37±0.08	MR
25	ZDM4576	2.47±0.12	2.33±0.12	2.33±0.12	2.38±0.07	MR
26	阿青 5 号	2.43±0.05	2.37±0.09	2.40±0.16	2.40±0.02	MR
27	ZDM4765	2.53±0.09	2.30±0.08	2.37±0.12	2.40±0.10	MR
28	甘青 3 号	2.47±0.12	2.30±0.00	2.50±0.08	2.42±0.09	MR
29	ZDM4746	2.53±0.05	2.37±0.05	2.43±0.12	2.44±0.07	MR
30	ZDM09748	2.60±0.08	2.33±0.09	2.40±0.08	2.44±0.11	MR
31	WDM03141	2.53±0.12	2.37±0.05	2.53±0.12	2.48±0.08	MR
32	乐都红胶泥	2.50±0.08	2.37±0.09	2.63±0.05	2.50±0.11	MR
33	ZYM2507	2.70±0.16	2.50±0.08	2.43±0.05	2.54±0.11	MR
34	ZDM4581	2.43±0.05	2.60±0.08	2.63±0.09	2.55±0.09	MR
35	ZDM5673	2.67±0.09	2.37±0.05	2.60±0.08	2.55±0.13	MR
36	WDM00420	2.50±0.14	2.70±0.08	2.50±0.16	2.57±0.09	MR
37	ZYM1408	2.73±0.05	2.53±0.05	2.50±0.08	2.59±0.10	MR
38	08-1127	2.77±0.05	2.43±0.12	2.60±0.14	2.60±0.14	MR
39	ZDM4771	2.60±0.14	2.50±0.08	2.70±0.08	2.60±0.08	MR
40	ZDM4763	2.70±0.14	2.53±0.09	2.70±0.08	2.64±0.08	MR
41	北青 8	2.57±0.05	2.73±0.12	2.73±0.05	2.68±0.08	MR
42	ZYM1288	2.77±0.09	2.60±0.08	2.73±0.09	2.70±0.07	MR
43	ZDM09767	2.70±0.08	2.57±0.09	2.83±0.12	2.70±0.11	MR
44	ZYM1900	2.77±0.09	2.63±0.05	2.73±0.05	2.71±0.06	MR
45	喜拉 13	2.73±0.12	2.80±0.08	2.70±0.08	2.74±0.04	MR
46	ZDM4545	2.77±0.05	2.77±0.12	2.70±0.14	2.75±0.03	MR
47	藏青 148	2.87±0.09	2.77±0.05	2.60±0.08	2.75±0.11	MR
48	ZDM08193	2.70±0.08	2.83±0.05	2.77±0.05	2.77±0.05	MR
49	ZDM5582	2.90±0.16	2.73±0.05	2.80±0.08	2.81±0.07	MR
50	喜拉 2	2.80±0.08	2.93±0.12	2.77±0.09	2.83±0.07	MR
51	ZDM4591	2.93±0.12	2.70±0.08	2.87±0.05	2.83±0.10	MR
52	ZDM08841	2.97±0.17	2.73±0.09	2.90±0.08	2.87±0.10	MR
53	昆仑 13 号	3.00±0.14	2.83±0.12	2.90±0.14	2.91±0.07	MR
54	ZDM4690	2.93±0.21	2.80±0.08	3.10±0.16	2.94±0.12	MR

HR: 高抗; R: 抗病; MR: 中抗。表中数据为平均数±标准差

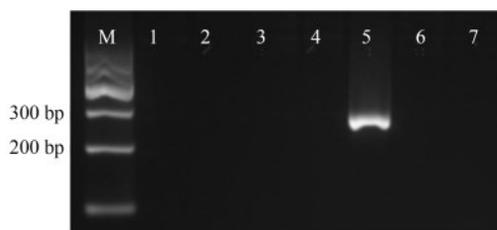
HR: Highly resistance; R: Resistance; MR: Moderately resistance. The data in the table are average values ± standard error

2.2 Yd2 抗性基因检测

利用 ASPCR-Y1p 标记对 1 份高抗材料和 6 份抗病材料进行 Yd2 抗性基因检测, 结果(图 2)表明: 仅在高抗材料 08-1280 中扩增出一条约 260 bp 的目的条带, 表明 08-1280 中含有 Yd2 抗性基因。6 个抗病材料均未扩增到目的条带, 可能含有其他或新的抗病基因。

2.3 BYDV 侵染对不同抗性青稞材料叶片生理指标的影响

2.3.1 总酚含量 由图 3A 可知, 接种大麦黄矮病毒后 10 d, 高抗材料 08-1280 叶片的总酚含量显著高于对照组, 高感材料康青 3 号变化不显著, 高抗材料增加幅度(21.02%)显著高于高感材料(3.87%)。

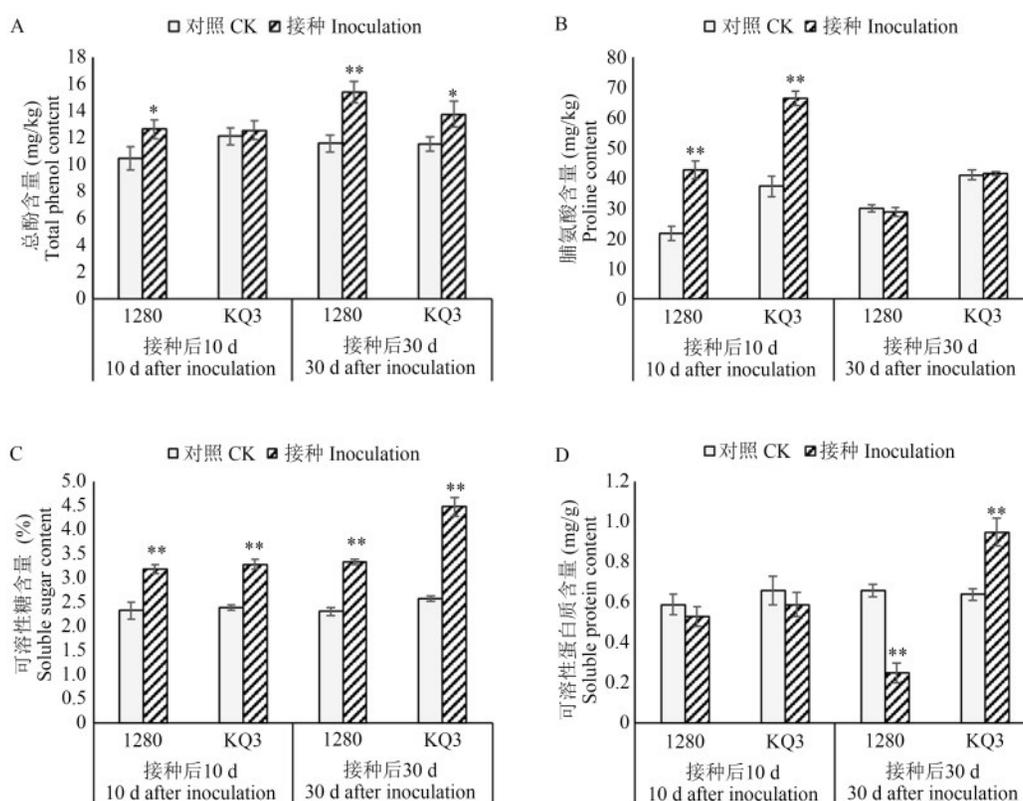


M: DNA Marker; 1: 藏青3000; 2: ZYM1289; 3: ZYM1853; 4: ZDM4409; 5: 08-1280; 6: 甘青2号; 7: 北青6号
M: DNA Marker; 1: Zangqing 3000; 2: ZYM1289; 3: ZYM1853; 4: ZDM4409; 5: 08-1280; 6: Ganqing 2; 7: Beiqing 6

图2 高抗、抗病材料 *Yd2* 基因的检测结果

Fig.2 *Yd2* detection of high resistant and resistant materials

接种后30 d,两个材料叶片的总酚含量均显著增加,高抗材料增加幅度(33.06%)显著高于高感材料



1280:08-1280;KQ3:康青3号。*和**分别表示接种和对照处理之间在0.05和0.01水平上显著

1280: 08-1280; KQ3: Kangqing 3. * and ** represent significant difference between inoculation and control at 0.05 and 0.01 probability level, respectively

图3 接种大麦黄矮病毒后不同抗性青稞叶片总酚、脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白质含量的变化

Fig.3 Content changes of total phenol, proline, soluble sugar and soluble protein in leaves of different resistant hulless barley materials inoculated with BYDV

2.3.4 可溶性蛋白质含量 由图3D可知,接种后10 d,与对照组相比,两个材料叶片的可溶性蛋白质含量无显著变化。接种后30 d,高抗材料和高感材料叶片可溶性蛋白质含量呈现出不同的变化,其中,高抗材料08-1280较对照组降低62.12%,而高感材料康青3号较对照组升高48.43%,变化均达到了极显著水平。

(19.17%)。

2.3.2 脯氨酸含量 由图3B可知,大麦黄矮病毒侵染后,脯氨酸含量迅速上升。接种后10 d,高抗材料08-1280、高感材料康青3号叶片的脯氨酸含量分别比对照组增加98.91%和78.53%,高抗材料增加幅度显著高于高感材料。接种后30 d,两个材料的脯氨酸含量在接种组和对照组之间均无显著差异。

2.3.3 可溶性糖含量 由图3C可知,接种后10 d和30 d,高抗和高感材料侵染后的叶片可溶性糖含量产生了不同程度的升高,与对照组的差异均达到了极显著水平。接种后30 d,高抗材料08-1280可溶性糖含量增幅(44.93%)显著低于高感材料康青3号的增幅(73.58%)。

3 讨论

种质资源的鉴定是作物育种的核心基础,精准鉴定和评价青稞黄矮病的抗性水平有利于提高抗病育种效率,从而减少杀虫剂的使用,提高青稞生产的经济效益和生态效益。黄矮病症状显现程度

受气候条件(温度、湿度、光照等)、蚜虫接种量、接种时期等因素的影响较大^[32-33],精准鉴定有一定的困难。本研究根据不同青稞材料的生育期长短,分批次春播,使分蘖期和拉萨最适宜发病的条件相遇,且进行了3年的田间抗性鉴定,最大限度的减少气候和生育期对发病程度的影响。此外,本研究采取了人工接种定量蚜虫、根据蚜虫定殖情况及时补接、并采用农药控制外来蚜虫影响等措施,保证了待测青稞材料上蚜虫密度的相对一致。通过以上措施,能更加科学、精准地评价青稞黄矮病抗性。

国内关于黄矮病的研究主要集中在小麦上,大麦中研究较少。杜志强等^[34]对4492份大麦种质资源进行黄矮病鉴定,筛选到43份抗病材料。梅红等^[35]从61份青稞种质资源中筛选到3份高抗材料,感染BYDV-GPV后无明显的症状,株高、分蘖数和理论产量与对照组无显著差异。本研究通过3年试验,鉴定出1份高抗材料和6份抗病材料,丰富了大麦抗病育种亲本材料。其中,近两年本单位培育的青稞新品种藏青3000为黄矮病抗性品种,且产量表现好,在黄矮病频发地区,可以加大该品种的推广种植力度。*Yd2*是唯一成功应用于春大麦抗黄矮病育种实践的有效抗病基因^[12]。本研究发现高抗材料08-1280携带*Yd2*抗性基因,为抗病育种提供了理想抗源。目前,黄矮病抗性基因十分匮乏,单一抗病基因已不能满足实际育种需求,后续需要加大对黄矮病抗性基因的挖掘和利用。

植物的抗病性是建立在一系列物质代谢基础上的。酚类物质是植物特有的一种次生代谢产物,可作为木质素前体诱导细胞壁木质化,从而增加寄主细胞壁的机械强度,阻碍或减缓病原体的扩散^[36-38]。本研究中,大麦黄矮病毒的侵染促进了青稞中总酚的积累,高抗材料在侵染初期总酚含量显著增加,且两个时期的总酚含量增加幅度均显著高于高感材料,表明总酚含量增加的速度和幅度可能是青稞防御大麦黄矮病毒侵染的机制之一。植物遭受逆境胁迫时,游离脯氨酸的快速积累是一种普遍现象。脯氨酸的积累有利于维持细胞渗透平衡,保护细胞膜免受应激损伤,提高植物对逆境的忍耐能力和适应性^[39-40]。本研究中,接种初期高抗、高感青稞材料的脯氨酸含量均显著增加,高抗材料增加幅度显著高于高感材料,表明脯氨酸含量增加的幅度也与青稞黄矮病抗性有关。

可溶性糖和可溶性蛋白质不仅是植物体内重要的渗透调节物质,同时也可以为寄主和病原物提供能量。闫慧娟等^[41]、李佐同等^[42]认为,寄主体内

的可溶性糖含量越高,植物抗病性越强。然而,本研究中,大麦黄矮病毒接种30 d时,高感材料的增幅显著高于高抗材料,而接种10 d时,两个材料增加幅度无显著差异。前期研究发现接种10 d时,高抗、高感材料叶片病毒含量差异不大,而30 d时,高感材料病毒含量已上升至较高水平,与高抗材料差异最大。因此推测侵染后期高感材料中病毒粒子大量复制,经由韧皮组织进行长距离运输和系统侵染,加重了韧皮部的运输负荷,抑制了可溶性糖从源叶片向其他器官的转运,从而导致侵染叶片中糖的浓度增加^[43-44]。有关寄主体内可溶性蛋白质与抗病性关系的报道较多,但结论不尽相同。与Sahhafi等^[23]报道的小麦条纹花叶病毒感染下抗病小麦可溶性蛋白含量较高不同,本研究中,接种大麦黄矮病毒30 d后,高抗材料叶片中的可溶性蛋白质含量显著降低,高感材料中显著升高。综上所述,高抗、高感青稞材料对大麦黄矮病毒侵染的反应差异因接种时间和生理指标而异。本研究为青稞应答大麦黄矮病毒侵染的机制奠定了生理基础,但要全面了解其抗性机制,后续需要从分子水平上进一步探索。

参考文献

- [1] Zeng X Q, Xu T, Ling Z H, Wang Y L, Li X F, Xu S Q, Xu Q J, Zha S, Qimei W M, Basang Y Z, Dunzhu J B, Yu M Z, Yuan H J, Tashi N. An improved high-quality genome assembly and annotation of tibetan hulless barley. *Scientific Data*, 2020, 7(1): 139
- [2] 翟会生, 李俏, 张玉红, 曾兴权, 唐亚伟, 尼玛扎西, 邓光兵, 龙海, 潘志芬, 余懋群. 72份青稞氨基酸组成与营养价值评价, 植物遗传资源学报, 2021, 22(1): 121-129
Zhai H S, Li Q, Zhang Y H, Zeng X Q, Tang Y W, Tashi N, Deng G B, Long H, Pan Z F, Yu M Q. Evaluation of the amino acids composition and nutrition value of 72 hulless barley. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(1): 121-129
- [3] Xu Q J, Zeng X Q, Lin B, Li Z Q, Yuan H J, Wang Y L, Zha S, Tashi N. A microsatellite diversity analysis and the development of core-set germplasm in a large hulless barley (*Hordeum vulgare* L.) collection. *BMC Genetics*, 2017, 18: 102
- [4] Zeng X Q, Long H, Wang Z, Zhao S C, Tang Y W, Huang Z Y, Wang Y L, Xu Q J, Mao L K, Deng G B, Yao X M, Li X F, Bai L J, Yuan H J, Pan Z F, Liu R J, Chen X, Wang Mu Q M, Chen M, Yu L L, Liang J J, Dunzhu J B, Zheng Y, Yu S Y, Luo Bu Z X, Guang X M, Li J, Deng C, Hu W S, Chen C H, TaBa X N, Gao L Y, Lv X D, Abu Y B, Fang X D, Nevo E, Yu M Q, Wang J, Tashi N. The draft genome of Tibetan hulless barley reveals adaptive patterns to the high stressful Tibetan Plateau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(4): 1095-

- 1100
- [5] 刘何春, 姚小波, 李杨, 雷雪萍, 王文峰. 6种病毒抑制剂对西藏青稞大麦黄矮病的防治效果. 植物保护, 2021, 47(1): 297-302
- Liu H C, Yao X B, Li Y, Lei X P, Wang W F. Control efficacy of six plant virus inhibitors on barley yellow dwarf disease in Tibet. Plant Protection, 2021, 47(1): 297-302
- [6] Gray S, Gildow F E. Luteovirus-aphid interactions. Annual Review of Phytopathology, 2003, 41:539-566
- [7] Kaddachi I, Souiden Y, Achouri D, Chéour F. Barley yellow dwarf virus (BYDV): Characteristics, hosts, vectors, disease symptoms and diagnosis. Journal of Phytopathology, 2014, 3(3):155-160
- [8] Perry K L, Kolb F L, Sammons B, Lawson C, Cisar G, Ohm H. Yield effects of barley yellow dwarf virus in soft red winter wheat. Phytopathology, 2000, 90(9):1043-1048
- [9] Suneson C A. Breeding for resistance to yellow dwarf virus in barley. Agronomy Journal, 1955, 47: 283
- [10] Schaller C W, Qualset C O, Rutger J N. Inheritance and linkage of the Yd2 gene conditioning resistance to the barley yellow dwarf virus disease in barley. Crop Science, 1964, 4: 544-548
- [11] Collins N C, Paltridge N G, Ford C M, Symons R H. The Yd2 gene for barley yellow dwarf virus resistance maps close to the centromere on the long arm of barley chromosome 3. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 92: 858-864
- [12] Ordon F, Habekuss A, Kastirr U, Rabenstein F, Kuhne T. Virus resistance in cereals: Sources of resistance, genetics and breeding. Journal of Phytopathology, 2009, 157: 535-545
- [13] Paltridge N G, Collins N C, Bendahmane A, Symons R H. Development of YLM, a codominant PCR marker closely linked to the Yd2 gene for resistance to barley yellow dwarf disease. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 96: 1170-1177
- [14] Ford C M, Paltridge N G, Rathjen J P, Moritz R L, Simpson R J, Symons R H. Rapid and informative assays for Yd2, the barley yellow dwarf virus resistance gene, based on the nucleotide sequence of a closely linked gene. Molecular Breeding, 1998, 4: 23-31
- [15] 赵彦宏, 王艳芳, 李润植, 牛洪斌, 薛敬爱, 刘林德. 利用分子标记鉴定大麦 Yd2 基因型及其在育种辅助选择中的应用. 作物学报, 2011, 37(9): 1683-1688
- Zhao Y H, Wang Y F, Li R Z, Niu H B, Xue J A, Liu L D. Identification of Yd2 genotype in barley with molecular markers and their application in molecular marker-assisted Selection. Acta Agronomica Sinica, 2011, 37(9): 1683-1688
- [16] Niks R E, Habekub A, Bekele B, Ordon F. A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the barley yellow dwarf virus. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109:1536-1543
- [17] Riedel C, Habekub A, Schliephake E, Niks R, Broer I, Ordon F. Pyramiding of Ryd2 and Ryd3 conferring tolerance to a German isolate of barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV-ASL-1) leads to quantitative resistance against this isolate. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 123: 69-76
- [18] Scholz M, Ruge-Wehling B, Habeku A, Schrader O, Pendinen G, Fischer K, Wehling P. Ryd4 Hb: A novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 119: 837-849
- [19] Del Blanco I A, Hegarty J, Gallagher L W, Falk B W, Brown-Guedira G, Pellerin E, Dubcovsky J. Mapping of QTL for tolerance to cereal yellow dwarf virus in two-rowed spring barley. Crop Science, 2014, 54:1468-1475
- [20] Jarosova J, Beoni E, Kundu J K. Barley yellow dwarf virus resistance in cereals: Approaches, strategies and prospects. Field Crops Research, 2016, 198: 200-214
- [21] Berger S, Sinha A K, Roitsch T. Plant physiology meets phytopathology: Plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. Journal of Experimental Botany, 2007, 58 (15-16):4019-4026
- [22] Hammond-Kosack K E, Jones J D G. Resistance gene dependent plant defense response. Plant Cell, 1996, 8 (10) : 1773-1791
- [23] Sahhafi S R, Bagheri F, Assad M T, Masumi M, Talebi M. Evaluation of some biochemical responses in resistance of fifteen bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes to wheat streak mosaic virus. Journal of Agricultural Science, 2012, 4(5): 75-82
- [24] Radwan M D E, Fayez K A, Mahmoud S Y, Hamad A, Lu G Q. Physiological and metabolic changes of *Cucurbita pepo* leaves in response to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infection and salicylic acid treatments. Plant Physiol Biochem, 2007, 45:480-489
- [25] Arias M C, Lenardon S, Taleisnik E. Carbon metabolism alterations in sunflower plants infected with the sunflower chlorotic mottle virus. Journal of Phytopathology, 2003, 151: 267-273
- [26] Lattanzio V, Lattanzio V M T, Cardinali A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. Phytochemistry: Advances in Research, 2006, 661:23-67
- [27] Siddique Z, Akhtar K P, Hameed A, Sarwar N, Imran-Ul-Haq, Khan S A. Biochemical alterations in leaves of resistant and susceptible cotton genotypes infected systemically by Cotton leaf curl Burewala virus. Journal of Plant Interactions, 2014, 9:702-711
- [28] 中华人民共和国农业部. NY/T 3060.6-2016 大麦品种抗病性鉴定技术规程第 6 部分:抗黄矮病. 北京: 中国标准出版社, 2016
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. NY/T 3060.6-2016 Code of practice for evaluation of barley varieties for resistance to disease - Part 6: Yellow dwarf.

- Beijing: Standards Press of China, 2016
- [29] 丁璇子, 王岸娜, 吴立根. 响应面法优化小麦麸皮中总酚含量的测定. 粮食与油脂, 2016, 29(9): 37-41
Ding X Z, Wang A N, Wu L G. Determination of total phenol content in wheat bran optimized by response surface method. Cereals & Oils, 2016, 29(9): 37-41
- [30] 高俊凤. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2006: 214-216
Gao J F. Experimental guidance on plant physiology. Beijing: Higher Education Press, 2006: 214-216
- [31] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164-169
Li H S. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment. Beijing: Higher Education Press, 2000: 164-169
- [32] Lowles A J, Tatchell G M, Harrington R, Clark S J. The effect of temperature and inoculation access period on the transmission of barley yellow dwarf virus by *Rhopalosiphum padi* (L.) and *Sitobion avenae* (F.). Annals of Applied Biology, 1996, 128: 45-53
- [33] Choudhury S, Hu H L, Meinke H, Shabala S, Westmore G, Larkin P, Zhou M X. Barley yellow dwarf viruses_ infection mechanisms and breeding strategies. Euphytica, 2017, 213: 168
- [34] 杜志强, 刘艳, 周希明, 钱幼亭, 周广和. 大麦种质资源抗耐大麦黄矮病毒田间鉴定. 中国种业, 1997, 2: 32-33
Du Z Q, Liu Y, Zhou X M, Qian Y T, Zhou G H. Identification of the resistance of barley germplasm resources to BYDV. China Seed Industry, 1997, 2: 32-33
- [35] 梅红, 木德伟, 李学毅, 陶宗仁, 施晓群, 林莉. 云南青稞种质抗大麦黄矮病抗性鉴定研究. 云南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(S1): 25-30
Mei H, Mu D W, Li X Y, Tao Z R, Shi X Q, Lin L. The preliminary identification of Yunnan naked barley germplasm resisting BYDV. Journal of Yunnan University: Natural Science Edition, 2008, 30(S1): 25-30
- [36] Lyon G, Heilbronn J, Forrest R, Johnston D. The biochemical basis of resistance of potato to soft rot bacteria. Netherlands Journal of Plant Pathology, 1992, 2: 127-133
- [37] Boudet A, Lapiere C, Grima-Pettenati J. Biochemistry and molecular biology of lignification. New Phytologist, 1995, 129: 203-236
- [38] Kovalvi S A, Nassuth A. Influence of Wheat Streak Mosaic Virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1995, 47: 365-377
- [39] 焦蓉, 刘好宝, 刘贯山, 王树林, 侯娜, 王全贞, 刘朝科, 冯祥国, 胡晓明, 靳义荣. 论脯氨酸累积与植物抗渗透胁迫. 中国农学通报, 2011, 27(7): 216-221
Jiao R, Liu H B, Liu G S, Wang S L, Hou N, Wang Q Z, Liu C K, Feng X G, Hu X M, Jin Y R. Discussion of accumulation of proline and Its relationship with osmotic stress tolerance of plants. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(7): 216-221
- [40] Singh Y J, Grewal S K, Gill R K. Proline metabolism and phenylpropanoid pathway act independently in conferring resistance against yellow mosaic virus infection in black gram. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2021, 116: 101713
- [41] 闫慧娟, 韩玉杰, 周小梅, 张彦芹, 张明义. 不同抗性玉米接种矮花叶病毒后的生理生化变化研究. 山西大学学报: 自然科学版, 2010, 33(3): 458-462
Yan H J, Han Y J, Zhou X M, Zhang Y Q, Zhang M Y. Physiological and biochemical changes of different resistant corn infected with maize dwarf mosaic virus. Journal of Shanxi University: Natural Science Edition, 2010, 33(3): 458-462
- [42] 李佐同, 靳学慧, 张亚玲, 吴成龙. 水稻幼苗可溶性糖及可溶性蛋白含量与抗瘟性的关系. 北方水稻, 2009, 39(4): 6-9
Li Z T, Jin X H, Zhang Y L, Wu C L. The relationship between soluble Protein, soluble sugar content and rice blast resistance of rice seedlings. North Rice, 2009, 39(4): 6-9
- [43] Gonçalves M C, Vega J, Oliveira J G, Gomes M. Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. Fitopatologia Brasileira, 2005, 30: 10-16
- [44] Addy H S, Nurmalsari, Wahyudi A H S, Sholeh A, Anugrah C, Iriyanto F E S, Darmanto W, Sugiharto B. Detection and response of sugarcane against the infection of Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) in Indonesia. Agronomy, 2017, 7(50): 1-11