

高抗 BYDV 的 *Yd2* 基因在西藏青稞种质资源中的分布

徐齐君^{1,2}

(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, 西藏 拉萨 850002; 2. 西藏自治区农牧科学院农业研究所, 西藏 拉萨 850002)

摘要:黄矮病是麦类作物的重要病害, 麦类作物的黄矮病是由大麦黄矮病毒 (Barley yellow dwarf virus, 简称 BYDV) 引起的, 以蚜虫为介体进行持久性非增殖方式传播, 近年来, 在西藏青稞种植区域造成青稞减产。 *Yd2* 基因是目前发现在大麦中对 BYDV 抗性最有效的基因。本研究选取 1215 份西藏青稞种质资源材料, 通过 *Yd2* 基因的检测, 筛选出携带 *Yd2* 基因的材料共 7 份, 并对 *Yd2* 基因在西藏青稞种质资源中的分布情况进行了分析。这些研究为将 *Yd2* 基因在青稞抗黄矮病育种上奠定材料与技术基础。

关键词:青稞; 大麦黄矮病毒 (BYDV); *Yd2* 基因

中图分类号:S512.1 **文献标识码:**A

Distribution of Barley Yellow Dwarf Virus Resistance Gene *Yd2* Gene in Tibetan Hulless Barley Germplasm Resources

XU Qi-jun^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Hulless Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement, Tibet Lhasa 850002, China; 2. Agricultural Research Institute, TAAAS, Tibet Lhasa 850002, China)

Abstract: Barley yellow dwarf luteovirus (BYDV), a widespread cereal virus, causes serious loss in cereal yield worldwide. In recent years, hulless barleys in Tibet and Yunnan have been suffering severe yield reduction because of BYDV. So far, the *Yd2* gene, a barley yellow dwarf disease resistance gene from Ethiopian barleys, is the most effective gene to provide resistance against BYDV in barley. When infected by BYDV, barley strain which contains *Yd2* gene shows less yellowing and a low degree of viral infection, so virus's impact on crop yield can be mitigated. As a resistance gene that has an important value, *Yd2* can be widely applied to cereal breeding for disease resistance. In this study, we chose 1215 hulless barley materials from Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, and detected them to screen out materials that carry the *Yd2* gene, and identified distribution of *Yd2* gene in Tibet hulless barley. This study lay the groundwork for effective utilization of *Yd2* gene in hulless barley breeding for resistance to barley yellow dwarf luteovirus and the final map to clone this excellent disease resistance gene.

Key words: Hulless barley; Barley yellow dwarf luteovirus (BYDV); *Yd2* gene

大麦黄矮病毒 (BYDV) 是广泛感染谷类作物最严重的病毒病原体之一, 其主要侵染小麦、大麦、筱麦、野燕麦、粟、糜子、玉米及鹅冠草等 100 多种禾本科杂草。该病害最早于 1951 年在美国加利福尼亚被发现, 我国 BYDV 遍布全国近 20 个省, 其中以西北、华北麦区发生最为严重^[1]。作物感染 BYDV 后, 表现出植株叶片黄化和植株矮小等症状, 其光合

作用和代谢遭到破坏, 从而影响植株分蘖、抽穗和结实, 最终导致作物减产^[2-3]。全世界麦类作物产区因 BYDV 造成的产量损失年均约 20%, 在某些区域病害流行的年份, 甚至导致毁种或绝收^[4], 目前 BYDV 仍是世界及我国粮食作物的一种严重病害。由蚜虫作为传播媒介的 BYDV 属于黄症病毒科 (Luteoviridae) 的单链 RNA 球形病毒, 主要传播蚜虫有麦二叉蚜、麦长管蚜、禾谷卷管蚜、麦无网长管蚜及玉米蚜等, 根据不同种麦蚜传毒能力的差异, 中国的 BYDV 分为 GAV、GPV、RMV 和 PAV4 种株系, 其中 GPV 株系为我国特有的株系类型, 也是造成我国作物黄矮病流的主要株系^[5-7]。BYDV 以持续、

收稿日期: 2018-09-12

基金项目: 西藏财政专项 (2017CZZX002, XZNY-2018-C-021); 国家大麦青稞产业技术体系建设专项 (CARS-05)

作者简介: 徐齐君 (1984-), 女, 硕士, 副研究员, 主要从事青稞遗传育种研究, E-mail: xuqijun_1314@163.com。

循环和非繁殖的方式进行传播,当蚜虫以受感染植株的韧皮部为食时,会将其唾液中的病毒转移到健康植物的维管组织中,并会通过韧皮部细胞迅速传播^[8],病毒感染的植物经历强烈的代谢和超微结构变化^[9]。

Yd2 基因是通过全球 6689 个大麦种质的 BYDV 抗性筛选发现的,其中 100 多个埃塞俄比亚种质表现出明显的 BYDV 抗性^[10],而且大麦 *Yd2* 基因是禾谷类作物及近缘野生种各类抗源中对 BYDV 最有效的抗源。目前已发现了 *Yd1*, *Yd2* 和 *Yd3* 等抗 BYDV 的基因,其中 *Yd2* 基因的抗性要优于 *Yd1* 和 *Yd3*^[11]。大麦中存在许多不同的 *Yd2* 等位基因,不同品系的 *Yd2* 基因表现的抗性水平也不同^[12]。*Yd2* 不能阻止病毒从侵染点向全株系统的扩散,但能够限制病毒在植株维管组织中的扩增,通过减少寄主植物病毒量使其受害减少,从而表现出高抗性。这种机制对 BYDV 病原菌选择压较小,病毒不易产生新变异,从而赋予植物持久抗病性^[13]。*Yd2* 基因位于大麦第 3 号染色体着丝粒附近^[14-15],其在遗传上属于单位点基因^[16]。然而,*Yd2* 基因在不同遗传背景及不同环境中的表型有时表现为不完全显性或隐性性状,而且 *Yd2* 基因型常与不良性状连锁^[17],所以依据表型就不能准确地选择携带 *Yd2* 基因的个体。通过提取 DNA 鉴定 *Yd2* 基因型,而不是通过抗性表型测试来选择基因型。这种分子鉴定选种将极大地提高选择的准确性及有效性。

青稞 (*Hordeum vulgare* var. *nudum*) 属于禾本科 (Gramineae) 大麦属 (*Hordeum*) 作物,具有丰富的营养成分和保健功能,也是藏族人民的主食。20 世纪 90 年代末,青稞黄矮病在迪庆州大面积发生。西藏青稞黄矮病最早报道于 1990 年,在林芝波密县发现有 20 hm² 青稞出现叶片黄花、植株矮化,1992 年林芝米林县发现有 40 hm² 青稞叶尖发紫、植株矮化^[24]。2010 年,青稞黄矮病在青海中毒发生^[25],2013 年,青稞黄矮病在拉萨、日喀则等地普遍发现,2015 年阿里等地也出现青稞黄矮病^[8],至今为止西藏青稞主产区或轻或重均有黄矮病的发生。青稞黄矮病引起青稞植株叶片变黄、矮化和分蘖减少,发病严重时甚至不孕或者不能抽穗以至不能结实^[18]。本研究利用西藏地区丰富的青稞种质资源,收集整理后进行抗 *Yd2* 基因的鉴定,可为青稞新品种的培育提供新的抗源材料。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为西藏自治区农牧科学院农业研究所

提供的 1215 份青稞材料。

1.2 材料培养

将 1215 份青稞材料每个编号取 30 粒饱满的種子土培发芽,置于恒温光照培养箱中(光照/黑暗为 18h/6h,22/16 ℃,光照强度 3040 lx)培养,待青稞发育到三叶时期,取叶片提取 DNA。

1.3 DNA 的抽提及 PCR 阳性检测

青稞叶片总 DNA 的抽提采用 CTAB 法:① 向研钵中加入 800 μl 1.5 × CTAB,取适量水稻幼嫩叶片于研钵中充分研磨转移研磨液至 1.5 mL 离心管中;② 65 ℃ 水浴 30 min,期间颠倒 2 ~ 3 次,然后加 600 μl 氯仿:异戊醇(24:1),混合振荡 15 min;③ 12 000 r/min 离心 6 min;吸取上清 400 μl 转移到新的 1.5 mL 离心管中,加入 800 μl 95 % 乙醇摇匀, -20 ℃ 放置 20 min 以上(也可 -20 ℃ 过夜);④ 12 000 r/min 离心 20 min,弃上清,加入 400 ~ 1000 μl 75 % 乙醇洗沉淀,离心 5 min,倒掉乙醇,用移液枪吸去残余的乙醇,风干后加入 30 ~ 50 μl ddH₂O 溶解(充分溶解后直接用于后续实验或 -20 ℃ 保存)。⑤ PCR 扩增和电泳检测。

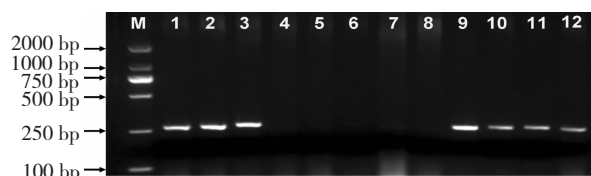
2 结果与分析

2.1 抗 BYDV 的 *Yd2* 基因检测

通过提取 1215 份青稞幼苗的 DNA,通过 PCR 扩增,并进行电泳检测。在 Atlas68,Shannon,C280,北青 2 号,西藏吉隆一季青稞,西藏谢通门卡嘎和西藏仁布白浪兰 7 个材料中检测到了 *Yd2* 基因(图 1)。

2.2 大麦黄矮病毒 *Yd2* 基因在西藏青稞种质资源中的分布

在选取的 1215 份材料中,共检测到 7 份材料含有抗 BYDV 的 *Yd2* 基因,具体分布为,其中 67 份近缘野生大麦中没有检测到含有 *Yd2* 基因、西藏青稞地方品种 1005 份中有 3 份材料含有 *Yd2* 基因,分别是西藏吉隆一季青稞、西藏谢通门卡嘎、西藏仁布白浪兰;育成品种 99 份中检测到 2 份含有 *Yd2* 基因,



从左到右:1:Atlas68,2:Shannon,3:C280,4:康青 2 号,5:喜拉 4 号,6:拉萨紫青稞,7:甘青 3 号,8:甘肅 2000,9:北青 2 号,10:西藏吉隆一季青稞,11:西藏谢通门卡嘎,12:西藏仁布白浪兰

图 1 引物 YlpPCRMF & YlpRAS 筛选出的抗性材料电泳图

表 1 大麦黄矮病毒基因 Yd2 基因在西藏青稞种质资源中的分布

材料类型	地区	材料份数	基因频率分布 100 %	
			R	S
地方品种	山南地区	256	0	100
	昌都地区	226	0.39	99.61
	日喀则地区	201	0.99	99.01
	拉萨地区	199	0	100
	林芝地区	115	0	100
	阿里地区	8	0	100
	合计	1005	0.29	99.71
育成品种	西藏育成品种	45	2.22	97.78
	青海育成品种	10	0	100
	甘肃育成品种	10	10.00	90.00
	其它	34	0	100
	合计	99	3.03	96.97
野生大麦	西藏	67	0	100
国外引进材料		44	4.54	95.46
	合计	1215	0.82	99.18

分别是 C280 和北青 1 号;在国外引进材料 44 份检测到有 2 份材料含有 Yd2 基因,分别是 Atlas68 和 Shannon。在西藏青稞地方品种 1005 份中检测到有 3 份材料含有 Yd2 基因。具体分布见表 1。

3 讨 论

自从 Oswald 和 Houston 发现 BYDV 病害以来,人们就开始探索通过栽培耕作、化学农药和生物防治等策略来控制 BYDV 的危害^[19]。发掘和充分利用存在于现有栽培种抗或耐受 BYDV 的种质资源在抗病育种上有重要价值,也是控制 BYDV 的最经济和有效的措施^[20]。然而,现有的栽培种中,BYDV 有效抗性基因较少,如燕麦中 BYDV 抗性由 1~4 个基因控制,但未发现能较高提供 BYDV 抗性的单个主效基因^[21]。Moletti 等发现了一些抗性由一个单基因控制的抗 BYDV 意大利水稻品系,但其在不同生长条件下抗性会变得不完全显性^[22]。一些近缘野生植物中存在着高抗 BYDV 的优异基因,目前将近缘野生种属一些 BYDV 抗源导入缺乏有效抗源的普通小麦,已获得了不少有用的抗性材料^[23]。但是,这些来自野生近缘种的抗源遗传机制复杂,而且常与一些其他性状相连锁,在作物抗 BYDV 育种中广泛应用难度较大。

大麦 Yd2 基因是 BYDV 的有效抗源,具有持久抗病性和独特的抗病机制,迄今为止,Yd2 基因是唯一成功用于大麦抗 BYDV 育种实践的有效抗病基

因。在研究中,从西藏青稞种质资源从检测 Yd2 基因,研究 Yd2 基因在西藏青稞种质资源中的分布情况。鉴定和克隆青稞 Yd2 基因可为青稞基因工程育种提供持久抗病基因,同时也为禾谷类作物比较基因组学和植物功能基因组学研究提供了有益的信息。

参考文献:

[1]周广和,成卓敏,张向才,等. 麦类病毒病及其防治[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987.

[2]J Ovesna,J Vacke,L Kucera,et al. Genetic maly8i8 Of resistance in barley yellow dwarf virus[J]. Plant Breeding,2000,119:481-486.

[3]V Sip,L Sirlova,J Chrpova. ScreeningforBarley yellow dwalf virus Resistant Barley Genotypes by assessment of vires content in inoculated seedings[J]. Phytopathology,2006,154:336-342.

[4]张向才,周广和,史明,等. 麦蚜远距离迁飞和传毒规律的研究. 植物保护学报,1985,12(1):9-15.

[5]Zhou G H, Cheng Z M, Zhang S X, et al. Serological identification of Luteoviruses of small grains in China[J]. Plant Disease,1984,68:710-713.

[6]Rochow W F. Biological properties of four isolates of barley yellow dwarf virus[J]. Phytopathology,1969,59:1580-1589.

[7]Rochow W F, muller I A. Fifth variant of barley yellow dwarf virus in New York[J]. Plant Disease,1971,55:874-877.

[8]Walling L L. Avoiding effective defenses: strategies employed by phloem-feeding insects[J]. Plant Physiology,2008,146:859-866 DOI 10.1104/pp.107.113142.

[9]Yan S L, Lehrer A, Hajirezaei M, et al. Modulation of carbohydrate metabolism and chloroplast structure in sugarcane leaves which were infected by Sugarcane Yellow Leaf Virus (SCYLV)[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology,2008,73:78-87.

- [10] Schaller CW, Rasmusson DC, Qualset CO. Sources of resistance to the yellow dwarf virus in barley[J]. *Crop Sci*, 1963(3):342-344.
- [11] Rasmusson D C, Schaller C W. The inheritance of resistance in barley to the yellow dwarf virus[J]. *Agronomy Journal*, 1959, 51:661-664.
- [12] Catherall PL, Jones AT, Hayes JD. Inheritance and effectiveness of genes in barley that condition tolerance to barley yellow dwarf virus[J]. *Ann Appl Biol*, 1970, 65:153-161.
- [13] Ranieri R, Lister R M, Burnett P A. Relationships between barley yellow dwarf virus and titer symptom expression in barley[J]. *Crop Sci*, 1993, 33:968-973.
- [14] 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[J]. *Crop Sci*, 1964, 4:544-548.
- [15] N. C. Collins, N. G. Paltridge, C. M. Ford, et al. The *Yd2* gene for barley yellow dwarf virus resistance maps close to the centromere on the long arm of barley chromosome 3[J]. *Theor. Appl. Genet*, 1996, 92:859-864.
- [16] Damsteegt V D, Bruehl G W. Inheritance of resistance in barley to barley yellow dwarf[J]. *Phytopathology*, 1964, 54:219-224.
- [17] Catherall P L, Jones A T, Hayes J D. Inheritance and effectiveness of genes in barley that condition tolerance to barley yellow dwarf virus[J]. *Ann Appl Biol*, 1970, 65:153-161.
- [18] 刘仁建. 青稞黄矮病发生规律及防治方法[J]. *西藏农业技*, 2015, 37(2):34-35+41.
- [19] 李振歧. 麦类病害. 麦类病毒病[M]. 1997:115-138.
- [20] Ordon F, Friedt W, Scheurer K, et al. Molecular markers in breeding for virus resistance in barley[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2004, 45:145-160.
- [21] McKenzie R I H, Burnett P A, Gill C C, et al. Inheritance of tolerance to barley yellow dwarf virus in oats[J]. *Euphytica*, 1985, 34:681-687.
- [22] Baldi G, Moletti M, Osler R. Inheritance of resistance to giallume in rice[A]. In: Burnett P A (ed. *World Perspectives on Barley Yellow Dwarf CIMMYT*, Mexico D F. Mexico.
- [23] Larkin p J, Banks P M, Lagudah E S, et al. Disomic Thinopyrum intermedium addition lines in wheat with barley dwarf virus resistance and with rust resistance[J]. *Genome*, 1995, 38:385-394.
- [24] 旺姆. 林芝地区麦类黄矮病发生情况的调查初报[J]. *西藏农业科技*, 1993, 15(3):28-29.
- [25] 刘楠, 闫佳会, 姚强, 等. 青海省麦类黄矮病发生情况调查[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(2):154-158.