

不同抗性青稞品种接种 BYDV-GAV 后 病毒含量的变化研究

旺 姆,杨春葆,徐齐君,扎 桑,羊海珍*

(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/西藏自治区农牧科学院农业研究所,西藏 拉萨 850032)

摘 要:本研究以抗黄矮病青稞品系 C280 和感病品种康青 3 号为供试材料,人工接种 BYDV-GAV 病毒,采用 TAS-ELISA 方法,监测供试材料叶片和根系中的病毒含量的动态变化。研究结果表明,抗、感病材料叶片和根系中的 BYDV-GAV 含量均呈现出先上升后下降的变化趋势;病毒首先在新叶中被检测到,之后移动到根系中。接种 10~30 d,抗病品系 C280 根系中的病毒含量明显低于感病品种康青 3 号;在测定时间内,抗、感病品种叶片中的病毒含量无明显差异。以上结果为进一步探索青稞黄矮病侵染机制和抗病机制提供依据。

关键词:大麦黄矮病毒;青稞;TAS-ELISA;病毒含量;品种抗性
中图分类号:S512.3 **文献标识码:**A

Changes of Virus Content in Different Resistant Hulless Barley Varieties Infected with Barley Yellow Dwarf Virus-GAV (BYDV-GAV)

Wangmu, YANG Chun-bao, XU Qi-jun, Zhasang, YANG Hai-zhen*

(State Key Laboratory of Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement/Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850032, China)

Abstract:In the present study, the resistant BYDV-GAV virus hulless barley line C280 and susceptible cultivar Kangqing-3 were used as materials to monitor the dynamic changes of the virus content in the leaves and roots after artificially inoculated BYDV-GAV virus by the TAS-ELISA method. The results showed that the content of BYDV-GAV in leaves and roots were both increased first and then decreased in two hulless barley varieties, and the virus was primarily detected in new leaves and then moved to roots. After 10–30 days of inoculation, the virus content in the roots of disease-resistant line C280 was significantly lower than that of susceptible varieties Kangqing-3, while there was no significant difference in leaves of two varieties. The above results provided a basis for further exploring the BYDV-GAV infection and resistance mechanisms of hulless barley.

Key words:Barley yellow dwarf virus (BYDV-GAV); TAS-ELISA; The virus contents; Varieties resistance

大麦黄矮病毒 (Barley yellow dwarf viruses, BYDVs) 是一类在世界范围内广泛分布的植物病毒,专性寄生于植物韧皮部组织,仅能通过特定的麦蚜以持久循环非增殖方式传播^[1]。BYDVs 主要侵染小麦、大麦、燕麦等禾本科作物,引起植株矮化、叶片退绿、分蘖减少等症状,导致严重的产量损失^[2]。据报道,BYDVs 造成的作物产量损失范围为 5 % ~

80 %,在黄矮病大流行年份,部分田块甚至绝收^[3]。青稞 (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f) 属于禾本科大麦属,主要种植于青海、西藏、云南迪庆州、四川阿坝州等高原地区,是藏族人民主要的粮食作物和重要的畜牧饲料^[4],在高原农业中一直占据举足轻重的地位。近年来,随着高原气候的变化,再加上生产中绝大部分青稞品种对 BYDVs 的抗耐性差,导致青稞黄矮病在各种植区屡有报道^[5-6],严重威胁着青稞的生产)。研究青稞黄矮病的致病、抗病机制,可以为青稞抗病育种提供基础材料及技术指导,对促进青稞产业的发展具有重要意义。

目前,植物对大麦黄矮病病毒的抗性鉴定主要依据田间发病症状来进行,但这种方法存在费时费

收稿日期:2020-06-04
基金项目: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自主课题 (XZNKY-2019-C-007Z03);西藏自治区重大科技专项 (XZ2019NA01-014)
作者简介:旺 姆 (1989-),女,研究实习员,主要从事青稞遗传育种研究,E-mail:wm1252354663@163.com; * 为通讯作者:羊海珍 (1992-),女,研究实习员,主要从事青稞遗传育种研究,E-mail:17782673107@163.com。

力、易受环境条件及和人为因素影响、重复性差等弊端。寻找一种快速、稳定的黄矮病鉴定方法一直是国内外学者关注的热点。通过分子生物学方法对寄主体内的病毒含量进行定量,再建立病毒含量与抗性等级之间的相关性,是植物病毒抗性鉴定的一种新思路^[7]。

监测病毒在寄主植物组织中累积量的动态变化,在一定程度上能反应了病毒的运动规律和侵染程度^[8],有助于我们揭示病毒的致病机制。血清学技术是检测植物病毒含量的常用方法,其中近年发展起来的三抗体夹心酶联免疫吸附法(Three antibodies sandwich ELISA, TAS-ELISA)能对病毒含量进行相对定量分析^[9],且具有特异性强、灵敏度高等特点。本研究以青稞抗病品系 C280 和感病品种康青 3 号为材料,温室条件下接种大麦黄矮病毒 GAV 株系,采用 TAS-ELISA 的方法,监测两份材料叶片和根系中 BYDV-GAV 含量随时间的动态变化,为进一步探索青稞黄矮病侵染机制和抗病机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以田间抗病性鉴定试验筛选到的黄矮病高度抗病型青稞品系 C280、高度感病型品种康青 3 号以及寄主材料藏青 2000 作为供试材料。供试材料藏青 2000、C280 和康青 3 号材料均由西藏自治区农牧科学院农业研究所提供;毒源为保存于小麦活体植株上的大麦黄矮病毒 GAV 株系,传毒介体为麦二叉蚜(*Schizaphis graminum*),均由西北农林科技大学植物保护学院吴云锋教授提供。

1.2 青稞毒源材料的获得

本研究选择易感病材料藏青 2000 作为寄主,人工接种 BYDV-GAV,以获得青稞毒源材料,方便为后续研究提供病原。接种前用毛笔将无毒麦二叉蚜接到带有 BYDV-GAV 的小麦植株上饲毒 72 h,获得带毒蚜虫。选取籽粒饱满、无虫害的藏青 2000 种子,10 % H_2O_2 消毒 10 min,无菌水冲洗 3 次,置于铺有两层滤纸的培养皿内催芽,待种子露白后,播于装有花园土与育苗基质比例为 1:1 的花盆(10 cm × 12 cm)内,每盆播种 30 粒种子,出苗后置于人工气候室进行培养(光照 14 h/黑暗 10 h,24 °C/18 °C),常规管理,培养至 3 叶 1 心期。将幼苗分为 2 组,第一组每株上接种 10 头带毒蚜虫,第二组不接种蚜虫(对照组),2 周后观察病毒症状并记录。

1.3 病毒接种

参照 1.2 中幼苗培养方法及条件,播种 C280 和康青 3 号各 18 盆。待青稞幼苗生长至 2 ~ 3 叶期时,参照 1.2 中的接种方法,将带毒蚜虫从藏青 2000 病株上转接至待测植株的第二片叶上,每株接种 10 头蚜虫,每份材料接种 9 盆(处理组),另外 9 盆不接种(对照组)。分别给处理组的每个盆罩上防虫罩,传毒 72 h 后喷洒吡虫啉杀死蚜虫。接种后第 1、3、5、10、15、20、25、30 天分别采集新叶和根系,每盆选取 10 株混合取样,取样后立即保存于 -20 °C,用于后续的病毒含量测定,试验设置 3 次生物学重复。

1.4 TAS-ELISA 测定病毒含量

参照 Nano Diagnostics 公司 BYDV TAS-ELISA 检测试剂盒操作说明,测定各样品中的病毒含量:将稀释的包被抗体加入酶联板的孔中,每孔 100 μ l,24 °C 孵育 4 h 后清空孔中液体,用 PBST 洗涤 4 ~ 6 次;待测样品按 1:10 的比例加入抽提缓冲液研磨成匀浆,按每孔 100 μ l 加入酶联板,每个样品重复 3 个孔,同时设阳性对照、阴性对照和缓冲液空白对照,于 4 °C 冰箱中孵育过夜,充分洗涤 6 ~ 8 次;将稀释好的酶标抗体按每孔 100 μ l 加入酶联板中,24 °C 孵育 2.5 h 后洗涤 6 ~ 8 次;按说明配制显色底物溶液,每孔加入 100 μ l,室温避光反应 45 min 后,用酶标仪读取各孔反应液在 405 nm 波长处的吸光值(OD_{405}),计算每份材料接种组和对照组 OD_{405} 的平均值。

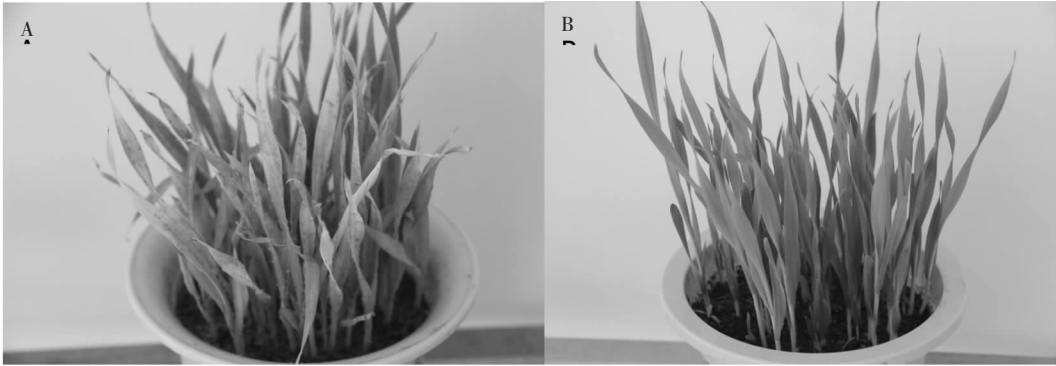
2 结果与分析

2.1 藏青 2000 感染 BYDV-GAV 后的室内表型鉴定

人工接种大麦黄矮病毒两周后,藏青 2000 的叶尖、叶片中间出现了不均匀的黄色区域,呈点状或片状(图 1)。本试验中,藏青 2000 表现出黄矮病的典型症状,且未出现严重生长发育不良的现象,表明了藏青 2000 可以作为 BYDV-GAV 长久保存的寄主,为后续青稞黄矮病研究提供原始浸染病毒。

2.2 不同抗性青稞材料叶片、根系中 BYDV-GAV 含量的动态变化

采用 TAS-ELISA 方法分别检测接种后不同时间段青稞叶片、根系组织中的病毒含量,研究表明:不论抗病材料还是感病材料,BYDV-GAV 侵染后均可以在体内增殖,病毒最先(接种后 1 d)在植株新叶中被检测到,接种 3 d 后首次在根部检测到病毒的存在(图 2)。随着接种天数的增加,C280、康青 3



A:处理组表型图,B:对照组表型图
A represented the phenotypic of treatment group and B represented the phenotypic of control group

图 1 藏青 2000BYDV-GAV 接种处理组与对照组表型

Fig.1 Phenotype identification of Zangqing-2000 BYDV-GAV inoculation treatment and control groups

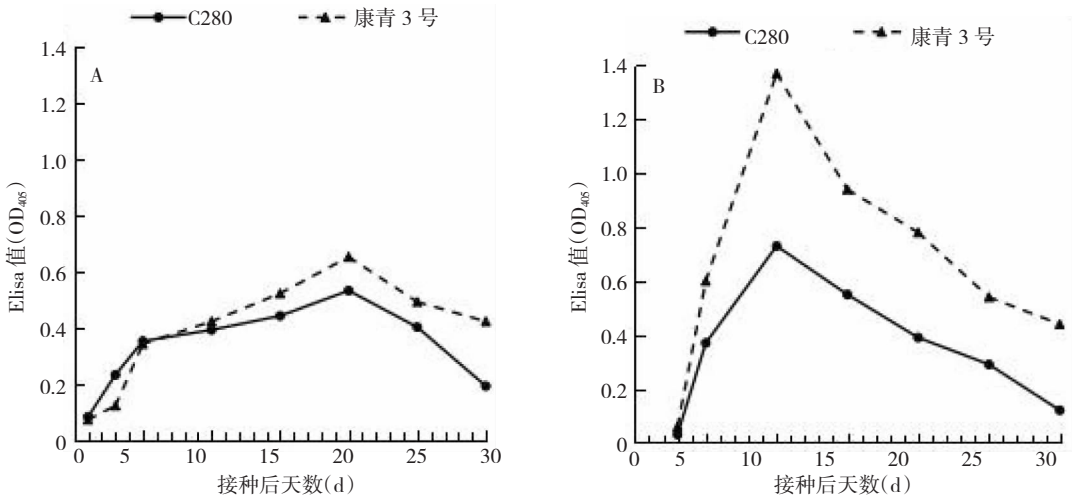


图 2 接种 BYDV-GAV 后 30 d 内 2 个青稞品种叶片 (A)、根系 (B) 中的病毒含量变化

Fig.2 Changes of virus contents in leaves (A) and roots (B) of two hulless barley varieties within 30 days after BYDV-GAV inoculation

号青稞植株叶片和根系中的病毒含量均呈先升高后下降的趋势;且叶片在接种 20 d 达到峰值,根系中接种 10 d 后该病毒含量达到最大值,之后病毒含量急剧下降;接种病毒 10 ~ 30 d,抗病材料 C280 根系中的病毒含量明显低于感病材料康青 3 号;叶片组织中抗、感病材料中的病毒含量差异不明显(图 2)。

3 讨 论

病毒侵染对植物造成的伤害程度与体内病毒的积累量及运动规律有一定的相关性^[10]。本研究选择了两个田间抗性不同的青稞材料 C280 和康青 3 号,初步探究大麦黄矮病毒 GAV 在其植株体内的移动规律和积累量变化。结果表明,接种 BYDV-GAV 后,不论抗病品种还是感病品种,叶片及根部中病毒含量均随时间出现先上升再回落的趋势,病毒均是由接种叶移动到新叶再到根系。青稞抗病品种根系中病毒的积累量明显低于感病品种,这可能是因为

抗病品种中大麦黄矮病毒向根系的移动受到了阻碍。前人研究表明,黄瓜花叶病毒(CMV)、玉米矮花叶病毒(MDMV)等病毒侵染寄主后,抗病品种中病毒的系统运动受到了明显阻滞^[11-12],这可能是植物抗病毒的重要机制。本研究采用了灵敏度高的 TAS-ELISA 方法,实现了对不同时间段叶片和根系中的病毒粒子的定量,发现根系病毒含量比叶片更能反映抗、感病材料的差异,对后续探究黄矮病毒室内抗性鉴定方法更具有参考价值。该研究结果为揭示青稞黄矮病的侵染机制奠定了基础,也为进一步探究黄矮病抗病机制提供了很好的思路。

参考文献:

[1] Miller W A and Rasochová L. Barley yellow dwarf viruses[J]. Annual Review of Phytopathology, 1997, 35: 167 - 190.
[2] Plumb R T. Properties and isolates of barley yellow dwarf virus[J]. Annals of Applied Biology, 2008, 77(1): 87 - 91.
[3] Perry K L, Kolb F L, Sammons B, et al. Yield effects of barley yellow dwarf virus in soft red winter wheat [J]. Phytopathology,

- 2000, 90(9): 1043 - 1048.
- [4] 强小林, 迟德钊, 冯继林, 等. 青藏高原区域青稞生产与发展现状[J]. 西藏科技, 2008(3): 11 - 17.
- [5] 姚小波, 王文峰, 李杨, 等. 西藏大麦黄矮病病毒株系鉴定及介体蚜虫传毒能力分析[J]. 西藏农业科技, 2018, 160(3): 9 - 12.
- [6] 徐云, 木德伟, 梅红, 等. 迪庆青稞黄矮病和介体蚜虫发生规律及防治技术[J]. 植物保护学报, 2003(2): 109 - 110.
- [7] Chain F, Gérard Riault, Trottet M, et al. Analysis of accumulation patterns of barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV) in two resistant wheat lines[J]. European Journal of Plant Pathology, 2005, 113(4): 343 - 355.
- [8] Hull, R. The movement of viruses in plants[J]. Annual Review of Phytopathology, 1989, 27(1): 213 - 240.
- [9] V. íp, L. Irlová, J. Chrpová. Screening for barley yellow dwarf virus-resistant barley genotypes by assessment of virus content in inoculated seedlings[J]. Journal of Phytopathology, 2006, 154: 336 - 342.
- [10] Misawa T. Studies on the infection and the movement of plant viruses[J]. Japanese Journal of Phytopathology, 1973, 39(3): 181 - 183.
- [11] Law M D, Moyer J W, Payne G A. Effect of host resistance on pathogenesis of maize dwarf mosaic virus[J]. Phytopathology, 1989, 79: 757 - 761.
- [12] Nono-Womdim R, Marchoux G, Pochard E, et al. Resistance of pepper lines to the movement of cucumber mosaic virus[J]. Journal of Phytopathology, 2008, 132(1): 21 - 32.