

抗黑条矮缩病水稻品种资源的筛选与鉴定

方先文,张云辉,张所兵,林 静,汪迎节

(江苏省农业科学院粮食作物研究所/江苏省农业种质资源保护与利用平台,南京 210014)

摘要:近年来,水稻黑条矮缩病严重影响我国水稻生产,培育高抗黑条矮缩病的水稻新品种迫在眉睫。获得抗性好的水稻资源是育种的基础。本研究通过对保存的 2000 份水稻地方品种连续 2 年设置 2 个试验点的黑条矮缩病抗性鉴定,初步筛选出连续 2 年没有发病的资源 38 份。对这 38 份中农艺性状较好的 6 份粳稻资源进行人工室内接虫鉴定,获得高抗水稻黑条矮缩病的水稻资源 1 份。与感病对照相比,水稻黑条矮缩病毒(RBSDV, rice black-streaked dwarf virus)在抗病品种体内的表达量下降 71.5 倍,表明抗病品种对 RBSDV 在体内的复制有明显的抑制作用。本研究为水稻黑条矮缩病抗病育种和抗性基因的定位、克隆奠定了材料基础。

关键词:水稻;黑条矮缩病;资源筛选

Screening and Evaluation of Rice Resources Resistance to Rice Black-Streaked Dwarf Virus Disease

FANG Xian-wen, ZHANG Yun-hui, ZHANG Suo-bing, LIN Jing, WANG Ying-jie

(Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Science/

The Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014)

Abstract: Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV) disease has seriously affected rice production in China in recent years, giving rise to an imperative of breeding rice new varieties with high resistance to RBSDV. Rice resources highly resistant to RBSDV play key roles in breeding procedure. In this study, 2000 local varieties were evaluated on the resistance to RBSDV for two consecutive years. 38 varieties without disease symptoms were primarily screened, of which 6 *japonica* varieties with preferred agronomic traits were selected to perform artificial inoculation identification. One variety highly resistance to RBSDV was obtained ultimately. The expression of RBSDV decreased 71.5 times compared to the sensitive control, indicating a notable inhibition of RBSDV replication in the disease-resistant variety. This study laid the material foundation for RBSDV resistance breeding procedure and cloning of resistance genes.

Key words: rice; black-streaked dwarf virus; germplasm screening

水稻是我国第一大粮食作物,水稻的稳产直接关系到我国的粮食安全。水稻黑条矮缩病是一种主要由灰飞虱 (*Laodelphax striatellus* Fallen) 充当媒介而传播的病毒病,该病毒为呼肠孤病毒科 (Reoviridae) 斐济病毒属 (*Fijivirus*) 的水稻黑条矮缩病毒 (RBSDV, rice black-streaked dwarf virus)^[1-2]。RBSDV 的基因组为 10 条双链 RNA (dsRNA, double-

stranded RNA) 片段,根据其在 PAGE 胶电泳上的迁移距离由小到大依次命名为 S1 ~ S10^[3]。水稻黑条矮缩病感病植株一般严重矮缩、叶色浓绿、叶片背部叶脉出现短线白色条纹、不能抽穗或包颈穗、穗粒变小甚至畸形而显著影响经济产量^[4]。目前对该病无法治疗,因而被喻为水稻“癌症”。

水稻黑条矮缩病于 20 世纪 60 年代在我国首次

收稿日期:2015-01-08 修回日期:2015-03-02 网络出版日期:2015-10-14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20151014.1430.032.html>

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(2911015);江苏省农业科技自主创新基金(CX(14)2030)

第一作者研究方向为水稻品种资源。E-mail: xianwen_fang@hotmail.com

发生^[5]。近年来,由于耕作制度的变化、暖冬年份的持续出现和越冬寄主增多等因素的影响,导致灰飞虱口密度增大、带毒率升高和越冬地带北移,黑条矮缩病在浙江、江苏的部分地区严重发生而造成巨大危害^[6-7]。其中,2004-2006年在江苏局部地区零星出现,2007-2008年发生范围迅速扩大、发病程度突然加重,重病地区病株率超过50%。2007年江苏发病面积2.05万hm²;2008年发病面积26.04万hm²,严重田块病丛率高达50%~80%,受害田块减产均在60%左右,成为当前江苏省水稻生产上最为严重的病害之一^[8]。目前江苏大面积推广应用的水稻品种绝大多数不抗水稻黑条矮缩病,引起育种家的高度重视^[9-12]。

由于灰飞虱的迁飞性,很难进行化学防治。目前生产上的防治方法只能作为一种应急策略,选育和推广抗病品种无疑是最为经济有效、环境友好的根本途径。从现有的资源中筛选抗黑条矮缩病品种,是培育抗病品种的基础。但由于人工接种水稻黑条矮缩病的工作量非常大,一般情况下,先将大量的水稻资源种植于黑条矮缩病的重发区,进行初步的筛选,对初步筛选到的少数抗性资源进行室内人工接种的重复鉴定。本研究于2011年、2012年连续2年设置2个试验点对江苏省农业种质资源保护与利用平台保存的2000份水稻地方品种的黑条矮缩病抗性进行鉴定,初步筛选出连续2年没有发病的资源38份,对这38份中农艺性状较好的6份粳稻资源进行人工接虫鉴定,获得高抗水稻黑条矮缩病的水稻资源1份,为抗病育种和抗性基因的定位、克隆奠定了材料基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为来源于江苏省农业种质资源保护与利用平台保存的2000份水稻地方品种。其中籼稻品种758份、粳稻品种1032份、国外品种210份。

1.2 田间自发鉴定

2011年、2012年连续2年将2000份水稻资源分别播种于江苏省农业科学院内和溧水基地,两地播种时间分别为5月8日和5月9日,移栽时间分别为6月8日和6月9日。秧田期不喷洒任何杀虫剂,移栽后每个品种2行,每行15株,于发病盛期调查品种的发病率。田间虫口密度调查参见王宝祥等^[10]的方法。

1.3 人工接虫鉴定

1.3.1 传毒介体灰飞虱的采集与饲养 灰飞虱由江苏省农业科学院植物保护研究所提供,以武育粳3号幼苗进行饲养。

1.3.2 灰飞虱带毒率的检测 病苗采集于江苏省农业科学院试验田黑条矮缩病重病区,参照周彤等^[12]方法对灰飞虱进行饲毒,采用RT-PCR方法检测RBSDV,再结合斑点免疫结合法,确定病株是否携带RSV,得到只携带RBSDV的病株为毒源。将1~2龄无毒灰飞虱若虫在毒源上饲毒2d,而后移入育有武育粳3号秧苗的烧杯中饲养,进入巡回期。13d后随机取出100头灰飞虱,采用DIBA(dot-blot immunoassay)方法^[13]检测单头灰飞虱携带RBSDV的情况,步骤如下:①硝酸纤维素膜用铅笔画0.5cm的正方格。②单头灰飞虱置0.2mL离心管中加2滴包被液,用牙签捣碎,取上清3μL加样,室温晾干。③将干燥的膜浸入1%脱脂奶粉封闭液中,摇床37℃,放置30min。④取4μL纯单抗加入10mL1%脱脂奶粉封闭液中(2500倍),将膜取出浸入,摇床37℃,放置1.5~2h。⑤取出膜,用0.01mol/L PBST洗3次,每次3~5min。⑥取3μL二抗加入10mL1%脱脂奶粉封闭液中(3000倍),将膜取出浸入,摇床37℃,放置1.5h。⑦取出膜用0.01mol/L PBST洗3次,每次3~5min。⑧将膜浸入新配制的底物溶液中(6mg 4-氯-1-萘酚+2mL无水乙醇+10mL 0.02mol/L PBS+7μLH₂O₂),室温至显色(0.5~1h)。⑨显色后,用自来水冲洗,室温晾干。以带毒灰飞虱作为阳性对照,并计算有效接虫量。有效接虫量=接种虫量×带毒率。

1.3.3 室内人工接种鉴定 每个品种取50粒种子催芽,种子露白后播于1000mL装土烧杯中,每杯35粒。待水稻长至1.0~1.5叶龄时淘汰弱苗,留下20株长势一致的幼苗进行抗病性鉴定,重复3次。1.5~2.0叶龄期按有效接种强度5虫/苗接种2~4龄介体灰飞虱,每天赶虫2次,确保幼苗均匀受毒。48h后移走全部灰飞虱,将秧苗移栽至大田。30d后调查田间发病情况,每3d调查1次,连续调查5次。

1.4 抗性鉴定标准

抗性鉴定标准参照卢百关等^[14]的内容。抗:发病率0~5%,中抗:发病率5%~15%,中感:发病率15%~30%,感:发病率30%~50%,高感:发病率50%~100%。

1.5 接虫后发病期水稻体内 RBSDV 定量分析

分别取感病对照武育梗 3 号和抗性表现最好的五月谷病苗各 3 株,使用植物总 RNA 提取试剂盒(北京天根公司)提取每个单株总 RNA。用 Nano-Drop 2000 微量紫外分光光度计(Thermo Fisher Scientific),检测 RNA 的浓度及质量,电泳检测 RNA 的完整性。取 2 μ g RNA 作为模板,使用 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit(Takara 公司),反转录合成第一链 cDNA。使用 RBSDV 的 S1 双链 RNA 特异引物 RBSDV-S1-F1: 5'-ACACTAGGCAAAGTG-GAG-3', RBSDV-S1-R1: 5'-GTCAAGACGCTCAGT-TCA-3',用 SYBR premix Ex TaqTM (TaKaRa 公司)试剂盒,在 ABI 7500 Real-Time PCR 仪(Applied Biosystems)上扩增。程序为:95℃ 30s;95℃ 5s,60℃ 30s,95℃ 15s,60℃ 1min,95℃ 15s,40 个循环。待扩增反应结束后,使用仪器自带的软件分析 CT 值,用水稻 *Ubiquitin* 基因(前后引物分别是 5'-AC-CCTGGCTGACTACAACATC-3', 5'-AGTTGACAGC-CCTAGGGTG-3')的表达量作为内参,计算出目的基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 田间灰飞虱虫口密度及带毒率调查

经调查,在水稻秧苗期,江苏省农业科学院内、溧水基地 2 年平均虫口密度分别为 852 万头/hm² 和 720 万头/hm²,单年 2 点的虫口密度均在 700 万头/hm² 以上(图 1)。灰飞虱带毒率检测结果表明,江苏省农业科学院内灰飞虱 2 年的带毒率均为 3%,溧水基地的灰飞虱带毒率分别为 3% 和 2%。



图 1 秧苗期田间灰飞虱虫口密度

Fig.1 Population density of *Laodelphax striatellus* Fallen at seedling stage

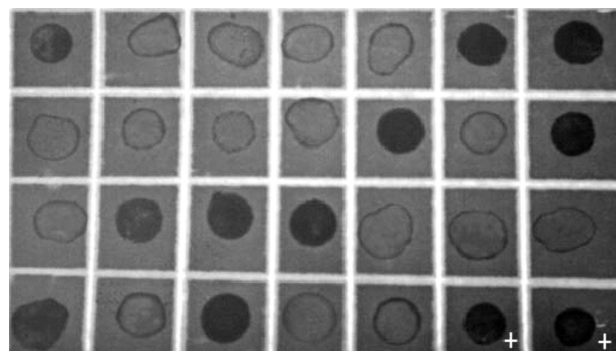
2.2 抗黑条矮缩病水稻资源的初步筛选

对 2000 份水稻资源分两地进行自发条件下抗

黑条矮缩病鉴定,筛选出连续 2 年均没有发病的水稻品种资源 38 份,占参试材料的 1.9%;发病率在 1%~20% 的资源有 928 份,占参试材料的 46.4%;发病率在 20%~40% 的资源有 886 份,占参试材料的 44.3%;发病率在 40%~60% 的资源有 144 份,占参试材料的 7.2%;发病率大于 60% 的资源有 4 份,占参试材料的 0.2%,其中小白梗的受害率达 76.2%。

2.3 部分水稻资源抗黑条矮缩病人工接虫鉴定

2.3.1 接种用灰飞虱带毒率检测 获得的接种用灰飞虱 RBSDV 带毒率为 35.8% (图 2),转换为有效接虫量后将获毒灰飞虱用于人工接虫鉴定。



+ 表示阳性对照 + indicates positive control

图 2 饲毒后灰飞虱 RBSDV 带毒率检测(部分结果)

Fig.2 Determination of virus carried rate of *Laodelphax striatellus* Fallen after infective feed (partial results)

2.3.2 抗性调查结果 人工接种 30 d 后调查发病率(图 3)。鉴定出高抗水稻黑条矮缩病材料 1 份(五月谷,发病率为 5%),中抗水稻黑条矮缩病材料 2 份(花谷、小红谷,发病率分别为 28.33% 和 25%)。感病对照武育梗 3 号发病率达到 55%,表明室内接种结果可靠。



图 3 饲毒后 30 d 水稻黑条矮缩病发病率调查

Fig.3 Incidence survey of rice black-streaked dwarf virus disease 30 days after infective feed

表 1 人工接虫鉴定水稻黑条矮缩病发病率调查

Table 1 Incidence survey of rice black-streaked dwarf virus disease by artificial inoculation

材料名称 Name	类型 Type	发病率(%) Incidence			平均发病率(%) Mean of incidence
		重复 1	重复 2	重复 3	
五月谷	粳	0	10	5	5.0
牛尾红	粳	60	65	60	61.7
白吊谷	粳	35	35	35	35.0
花谷	粳	25	30	30	28.3
红镰刀	粳	35	35	35	35.0
小红谷	粳	25	25	25	25.0
武育梗 3 号	粳	55	60	50	55.0

2.3.3 接虫后病株 RBSDV 表达量分析 接虫 30d 后,感病对照武育梗 3 号的病株体内 RBSDV 表达量是抗病品种五月谷病株体内 RBSDV 表达量的 71.5 倍,表明五月谷对 RBSDV 在体内的复制有明显的抑制作用,这可能是其整体抗病性增强的主要原因。

3 讨论

由于水稻黑条矮缩病受灰飞虱虫口密度和带毒率影响较大,王宝祥等^[10]对江苏省正在推广的 24 个主栽粳稻品种和曾经推广的 287 份粳稻品种进行抗黑条矮缩病鉴定,结果表明,所有品种发病率在 10%~30% 之间,没有发现发病率在 10% 以下的品种。李爱宏等^[11]对不育系、中粳稻恢系、粳稻恢系、常规粳稻等不同类型的 175 份水稻资源进行田间自发鉴定,发现绝大多数的中粳稻恢系抗病性优于粳稻。卢百关等^[14]对 896 份江苏省不同年代主栽品种(系)进行黑条矮缩病田间自然诱发鉴定,未发现对黑条矮缩病免疫的品种,抗性品种仅占 1.8%,中感以上品种占 81.1%。田间自发鉴定存在许多难以控制的不确定因素,不同研究者试验结果存在一定的差异。因此,如需获得准确的鉴定结果,需经过多年、多点的试验。本研究对 2000 份保存的水稻资源进行连续 2 年、两地的自发鉴定,在虫源充足的情况下,筛选出 2 年均没有发病的水稻资源 38 份,占参试材料的 1.9%。

水稻资源对黑条矮缩病的抗性分为抗虫性和抗病性。自发鉴定的条件下,由于灰飞虱的偏食性,造成一些水稻品种表现出抗黑条矮缩病;而在人工接虫鉴定的条件下,灰飞虱无选择性,造成自发鉴定条件下表现高抗的品种在接种鉴定的情况下表现出高感。因此田间自发鉴定需与人工室内鉴定相结合。

本研究所选用的 6 个在自发条件下均没有发病的水稻资源进行人工接种鉴定,结果这 6 个品种的抗性出现较大的差异,牛尾红抗性甚至比感病品种武育梗 3 号差,而五月谷仍然表现出稳定的抗性。通过基因定量结果发现,与感病对照武育梗 3 号相比,五月谷体内 RBSDV 的复制量减少 71.5 倍,抑制病毒的复制可能是其抗病性增强的主要原因。

由于缺乏稳定的抗源和黑条矮缩病鉴定的不稳定性,关于水稻黑条矮缩病抗性基因或 QTL 的报道还较少。潘存红等^[15]利用珍汕 97B/明恢 63 重组自交系群体,采用自然发病鉴定的方法,对黑条矮缩病抗性 QTL 进行分析,共检测到 6 个 QTL,这些位点的抗性等位基因来自抗病亲本明恢 63 (发病率 \approx 6.2%),其中第 6 染色体的 2 个 QTL 具有 LOD 值大、效应显著等特点,是主效 QTL,能在分子标记辅助育种中加以利用。李爱宏等^[4]针对这 2 个抗性 QTL,开展了抗性资源的创新工作,以江苏省主栽品种淮稻 5 号为轮回亲本,抗性亲本明恢 63 为供体,通过标记辅助选择,构建了携带目标抗性 QTL 的系列近等基因系。自然接种和人工接种鉴定表明新培育的近等基因系在不改变淮稻 5 号优良特性的前提下,抗性得到显著增强,发病率下降了 25% 左右。王宝祥等^[11]通过越光/桂朝 2 号的重组自交系群体,在第 3 染色体上定位了一个水稻黑条矮缩病抗性 QTL,源自日本的粳稻品种越光(发病率 \approx 7.5%)的等位基因增强了水稻黑条矮缩病的抗性。王英^[16]利用 Tetep/淮稻 5 号 F₂ 群体构建分子连锁图谱,利用 138 个 F_{2,3} 家系进行黑条矮缩病的人工接虫鉴定,检测到 4 个抗病性 QTL,其中第 5 染色体的 QTL 贡献率最高,达 24.58%。目前,虽然黑条矮缩病毒的全基因组序列已完全测定,但由于缺乏稳定的抗病资源,对此病的研究尚处于起步阶段。本研究获得了 1 份农艺性状优良的高抗黑条矮缩病的水稻资源,将为水稻黑条矮缩病的抗病基因定位、克隆和育种利用提供材料保证。

参考文献

- [1] Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, et al. Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. Pittsburgh: Academic Press, 2005
- [2] 阮义理, 金登迪, 许如银. 水稻黑条矮缩病的研究[J]. 浙江农业科学, 1984(4): 185-192
- [3] Azuhata F, Uyeda I, Kimura I, et al. Close similarity between genome structures of rice black-streaked dwarf and maize rough dwarf viruses[J]. J Gen Virol, 1993, 74(7): 1227-1232
- [4] 李爱宏, 潘存红, 戴正元, 等. 以标记辅助选择改良江苏主栽品种“淮稻 5 号”黑条矮缩病抗性[J]. 作物学报, 2012, 38(10): 1775-1781