

# 两个广谱抗虫基因源抗性背景 DNA 的多样性分析<sup>\*</sup>

彭玉华

李 卫

(中国农科院油料所, 武汉 430062) (湖北大学生物系 武汉 430062)

## 摘 要

利用 8 对抗 - 感大豆叶食性害虫近似等位基因系, 100 个随机引物进行 PCR 扩增, 在 406 个稳定重现的片段中, 有 2 个在近等基因系间表现多态性; 不同抗性来源的两组材料间的多态性 DNA 片段的有 1 个呈相反趋势, 相同抗性来源的材料间的多态性 DNA 片段的有 1 个也存在差异。由此可以认为, 抗性供体 PI171451, PI229358 的抗性背景 DNA 的多样性比较丰富, 遗传背景相差较大, 说明它们的抗性基因来源不同。在进行广谱抗虫育种实践中, 为丰富育成品种, 尤其是回交育成品种在抗性基因和抗性基因背景 DNA 上遗传多样性, 避免其遗传脆弱性, 以维持持久的抗性, 建议同时将上两个广谱抗虫基因源用于大豆广谱抗虫育种计划。

**关键词** 大豆; 叶食性害虫; 近等基因系; RAPDs

叶食性害虫种类多、食性杂。近年, 在我国, 至少在黄淮和长江流域大豆生态区造成严重损失。有的豆田的叶片甚至被蚕食干净。70 年代初期, 人们开始寻找杀虫剂的替代防虫方法, 其中寄主植物本身的抗性引起了极大关注, 并发现了 3 个高抗墨西哥豆瓢虫的抗源 PI171451, PI229687, PI229358<sup>[1]</sup>。随后, 这 3 个抗源被广泛用来进行抗性机制、抗性遗传与育种等领域的研究。大豆对黑西哥豆瓢虫的抗性, 极有可能表明对其它种类的害虫也有相当的抗性。因为大量研究表明对墨西哥豆瓢虫高抗的上述 3 个大豆材料同时对其它大多数害虫具有良好的抗性<sup>[7, 4, 5]</sup>。因而, 目前主要选择墨西哥豆瓢虫进行大豆抗叶食性害虫的遗传育种与抗性研究。

墨西哥豆瓢虫引起的产量损失与为害程度、为害发生时期有关。通常种子充分鼓粒以前的危害对产量有显著的影响。危害程度与产量损失表现显著的线性相关: 至充分鼓粒或鼓粒初期累积的危害程度决定相关线的斜率<sup>[1]</sup>。已知抗虫机制主要是大豆体内有一些抗生物物质致使害虫发育慢、死亡率高。这种抗性的遗传力较低, 通常为 40% 以下, 估计控制位点较少<sup>[6]</sup>。Sisson 在以叶部为害百分数为对象进行的遗传研究中得出广义遗传力为

<sup>\*</sup> 本文于 1996 年 11 月 11 日收到。 This paper was received on Nov. 11, 1996.

44% – 81% ,并指出可能只有 2– 3个位点参与大豆对墨西哥豆瓢虫的抗性控制<sup>[7]</sup>。

本研究从近似等位基因系入手,借助 PCR技术,分析具有相同受体亲本,而供体亲本不同的两组近似等位基因系之间的 DNA多态性,希望借此能对两个目前被广泛利用的抗虫亲本的抗性基因来源有所了解,以帮助指导在抗虫育种中避免抗性基因的单一性和脆弱性,维持抗虫的持久性。

## 材料与方法

### 一、植物材料

包括两组共 8个 Williams82的回交 4代 受体亲本 Williams82和两个供体亲本 PI171451及 PI229358 上述 8个 Williams82的回交 4代材料抗虫性与抗性基因供体 PI171451, PI229358相当,被用来作为 Williams82的抗虫近似等位基因系 材料名称及来源列于表 1

表 1 用于本研究的植物材料

Table 1 Plant materials used in this research

材料编号 No.	材料名称 Names	亲本来源 Parents	抗虫性 R/S
1	L94- 1003	Williams82× PI171451	抗
2	L94- 1004	Williams82× PI171451	抗
3	L94- 1005	Williams82× PI171451	抗
4	L94- 1006	Williams82× PI171451	抗
5	L94- 1010	Williams82× PI229358	抗
6	L94- 1011	Williams82× PI229358	抗
7	L94- 1013	Williams82× PI229358	抗
8	L94- 1014	Williams82× PI229358	抗
9	PI171451	Sod endai zu	抗
10	PI229358	Kos amame	抗
11	Williams82		感

### 二、DNA提取

取 20mg新鲜的幼嫩叶片,放入 1.5ml的离心管。每管加入 200μl现配的提取液(0.1 M Tris-HCl-pH8.0,50mM EDTA,0.5M NaCl,10mM 2-巯基乙醇);用电动研磨器磨成糊状(应避免产生高热)后再加入 400μl提取液;离心后将离心管放入 65℃水浴中 10分钟,然后于 4℃条件下离心 15分钟;取上清液于 1新的离心管中;加入 0.1× 体积的 10M N H<sub>4</sub>OAc和 2× 体积的无水乙醇,混匀后置于 - 70℃冰箱中 30分钟;4℃条件下离心 15分钟;去掉上清液,真空干燥 3分钟后加入 200μl TE(10m M Tris-HCl, pH7.5, 1mM EDTA)缓冲液溶解 取 50μl进行琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA质量;用紫外分光光度计检测 DNA样品的浓度后稀释至 10ng μl备用。

### 三、PCR反应

25μl反应池中包括 1× PCR缓冲液,2mM Mg Cl<sub>2</sub>,0.2mM dNTPs,1.25单位 TaqD-NA聚合酶,0.4μM引物和 50ngDNA样品,最后总体积为 25μl PCR扩增过程的热循环为:(94℃,2分钟)→(94℃,1分钟;38℃,5分钟;3分钟升至 72℃;72℃,2分钟),45周期

→ 72℃ , 7分钟→ 4℃ 保存至琼脂糖凝胶电泳 整个试验包括 100个随机引物 (Operon 公司)。

四、PCR扩增产物的分离

采用 1%的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR扩增后的产物。电极缓冲液为 1× TBE (89m M Tris-p H8. 0; 89m M H<sub>2</sub> B O<sub>3</sub>; 2m M E D T A)。样品用量为 20μ l PCR扩增产物。用 100 伏特电压电泳约 2小时后,在 200ml 重蒸水中加 25μ l EB(溴化乙锭)染色 30分钟,漂洗两次后立即紫外照像记录。

结果与讨论

在用 100个引物扩增产生的 406个稳定表现的 DN A片段中,有 2个 DN A片段 A20- c和 H3- d在近等基因系间或轮回亲本与后代间重复表现出多态性 详细情况见图 1 图 2

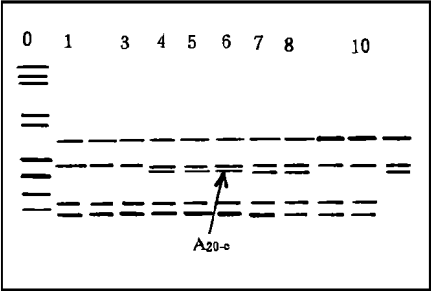


图 1 DN A片段 A20- c在各材料间的多态性  
注:第 0列为标记 DN A,其余同表 1

Fig. 1 Polymorphic performance of segment A20-c  
Note Lane 0= marker DN A, see table 1 for lane 2-12

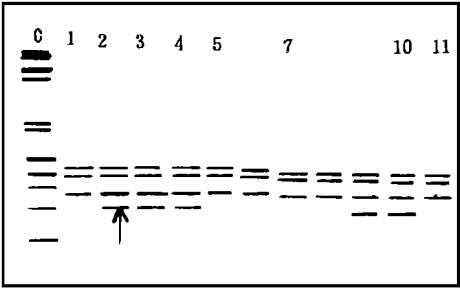


图 2 DN A片段 H3- d在各材料间的多态性  
注:第 0列为标记 DN A,其余同表 1

Fig. 2 Polymorphic performance of segment H3-d  
Note Lane 0= marker DN A see table 1 for lane 2-12

依据遗传分离与自由组合规律,用一个轮回亲本连续回交 4次后,该轮回亲本的遗传物质占后代总遗传物质的 93. 75%。由于在回交过程中唯一选择的标准是大豆对害虫的抗性,因而以 PI171451和 PI229358为供体亲本的两组回交后代材料之间的 DN A差别在一定程度上反映出与这两个供体亲本的抗虫基因有关的 DN A,即抗性基因的背景 DN A之间的区别。

图 1 图 2表明,所发现的两个多态性片段 A20- c H3- d的有无在以 PI229358为抗虫供体亲本的 4个回交后代材料中表现完全一致,而在以 PI171451为抗虫供体亲本的 4个回交后代中则有个别例外,且上述两个多态性 DN A片段在两个供体亲本的回交后代之间的表现呈相反的趋势 如以 PI229358为抗性供体亲本的 4个回交后代材料(第 5~ 8列)都有 DN A片段 A20- c,而在 4个以 PI171451为抗性供体亲本的回交后代中就有 3个不带有 DN A片段 A20- c DN A片段 H3- d在两组不同抗虫供体亲本的回交后代之间也同样存在着类似的相反趋势。说明 PI171451和 PI229358的抗性背景显著不同;抗性基因有不同的来源;PI229358的抗性背景比较单纯,PI171451的抗性背景比较复杂 因

此,在抗食叶性害虫的杂交和回交育种实践中,为利用大豆抗虫基因和其遗传背景 DNA 的多样性,避免遗传上的脆弱性,维持大豆抗虫的持久性,建议尽量同时使用 PI171451和 PI229358两个抗源

## 参 考 文 献

- [1] Steven P Nolting. 1989. Yield response of soybean of defoliation by the Mexican Bean Beetle. J. Entomology 82(4): 1212~ 1218
- [2] Van Duyn JW. 1971. Resistance in soybeans to the Mexican Bean Beetle I. Sources of resistance. Crop Sci 570~ 573
- [3] Hatchett JH. 1976. Leaf-feeding resistance to bollworm and tobacco budworm in three soybean plant introductions. Crop Sci. 16 277~ 280
- [4] Luedders VD 1977. Resistance of selected soybean genotypes and segregating populations to cabbage looper feeding Crop Sci. 17 395~ 396
- [5] Clark. 1972. Resistance of certain soybean cultivars to bean leaf beetle, Striped blister beetle, and bollworm. J. Econ Entomol 65 1669~ 1672
- [6] Rufener. 1989. Genetics of antibiosis resistance to Mexican Bean Beetle in soybean. Crop Science 29 618~ 621
- [7] Sission V A. 1976. Evidence of inheritance of resistance to the Mexican Bean Beetle in Soybeans. Crop Science 16 835~ 837

## RESISTANT BACKGROUND DNA POLYMORPHISM BETWEEN TWO LEAF-FEEDING INSECT RESISTANT SOYBEAN GERMPLASMS

Peng Yuhua

Li Wei

(Oil Crops Research Institute, CAAS, 430062)(Dept. of Life Sci. Hubei Univ. 430062)

### Abstract

8 pairs of leaf-feeding insects resistant/susceptible soybean near isogenic lines (NILs) and 100 randomly selected primers were involved in this RARDs study. Among the 406 repeatable DNA fragments. 2 shew polymorphism between and among the NILs/Parents used in this program. A diverse tendency of the absence/presence of the 2 polymorphic DNA fragments between the two groups of NILs from different doner parents implied the possibility that PI171451 and PI229358 carry different leaf-feeding insects resistance controlling gene(s), and have different DNA background. Therefore, equal integration of leaf-feeding insect resistance from PI171451 and PI229358 into soybean varieties are strongly recommended.

**Key words** Soybean (*G. max*) ; Insect resistance; NILs; RAPDs