

导入外源 DNA 获得抗 SMV 大豆品系^{*}

刘德璞 廖林 袁鹰 刘玉芝

(吉林省农业科学院大豆研究所,公主岭 136100)

摘 要

用花粉管通道技术向大豆导入抗 SMV (大豆花叶病毒)的品种间、种间以及属间材料 DNA,结合常规育种程序,培育出抗病丰产品系。抗病性鉴定结果表明,获得的抗性是遗传稳定的。与对照相比,在保证和提高原品种丰产性水平前提下,水平抗性明显提高;同一品系对 SMV 的 I、II、III 不同毒系抗性水平有差异。讨论认为,用外源 DNA 导入技术创造和培育抗 SMV 大豆种质和品种的途径是可取的。

关键词 大豆; SMV; 抗性遗传; 外源 DNA 导入; 花粉管通道

大豆花叶病毒 (SMV) 是东北大豆生产的主要病害。培育抗病品种是抵御此害的重要途径。但由于对大豆花叶病毒的抗性遗传研究历史较短,基因背景不甚清楚^[1,2,4,5,6,7]; 现有大豆资源中可作为理想抗源材料很少,且用常规有性杂交方法转育,需时较长,更无力引用远缘基因,因而育种进度缓慢。为能充分利用我们现掌握的少量抗源,快速创造抗性种质,培育抗病品系,我们在通过花粉管通道技术导入外源 DNA 获得大量变异的基础上,有目的地进行抗 SMV 性状的转移研究,并结合常规的筛选工作,培育抗 SMV 品系,现已获得结果。本文就此做一报告。

材料和方法

材料: DNA 供体 (Donor) 包括农家品种 (FD5114)、半野生大豆 (茶秣食豆) 皂角 (*Gleditsia japonica*)。FD5114 是我所资源室从东北资源中筛选出的对 SMV 具较好抗性的早期农家品种,由于与产量有关的性状不好,如荚小、粒小、秆软、熟期晚等,常规育种未能利用。本研究又重复做了多次鉴定,证明对 SMV I、II、III 确呈抗性。皂角由当地采集,也做了鉴定,表现了对 SMV 的抗性。茶秣食豆也由本所资源室提供。受体 (Receptor) 为现生产用品种吉林 20 号、吉林 21 号、长农 4 号、吉林 25 号、吉林 27 号等。

SMV 毒源,为东北流行的 I、II、III 毒系,由东北农业大学分类,本所育种室抗病育种

* 收稿日期: 1997-06-06

This paper was received on June 6, 1997.

组从东北农业大学引进。

方法:

1 DNA 提取与导入 按以前报道的方法进行^[3]

2 变异后代的鉴定与选择

对实施导入的第一代 (D₁)、第二代 (D₂)① 根据农艺性状差异选择变异株,然后做抗性鉴定,选择抗病株,② 直接接病毒鉴定选择抗株 抗病单株做连续几年的接毒鉴定,结合丰产性选择,培育品系。

3 抗病性鉴定

在九农 9号大豆植株上繁殖毒源。接种前取病叶,加入少量磷酸盐缓冲液研磨,过滤后稀释到一定浓度备用。待植株真叶展开(网室)或第一复叶展开(田间),磨破真叶,涂上病毒磷酸缓冲液,喷上少量水。于7月上旬和8月中旬分两次调查发病情况,计算病情指数。田间和网室对应进行。抗病性按6级记定(表1)较大面积的种植品系,接种中心株,经自然蚜虫传毒,观察群体抗性表现。

表1 大豆抗花叶病分级标准

Table 1 Classification criterion of soybean resistance to soybean mosaic virus

级别 Grade	病情指数 (%) Index	抗性反应 Resistance	级别 Grade	病情指数 (%) Index	抗性反应 Resistance
1	< 20	抗 (R)	4	51- 80	感 (S)
2	21- 35	中抗 (MR)	5, 6	> 80	高感 (HS)
3	36- 50	中感 (MS)			

注: * 0级免疫并入 1级。

结 果

以转移抗病性为目的的组合,从1987年开始至1991年止,共做了12个。截止1996年末,从5个组合得到抗病品系(表2)

D8703组合,获得5个变异株系,丰产性比原受体吉20都有提高,其中D8703-5为抗病株系,变异较大,结荚习性由亚有限变为供体的无限型,叶形由披针变为中、下部圆形,上部披针形,由少分支变为供体式多分支。蛋白质含量由39%提高至44%。对SMV I、II、III毒系都呈抗性。现正在做较大面积的生产试验。

D8904组合,供体为FD5114,受体为吉林21号,后代变异较多,株型也不同,从中鉴定出抗病株系,又经多代选择,育出代表不同类型的抗性品系4个。

D9103,供体为皂角,受体为吉林25号,D₁代选出变异株,与受体较明显的差异是,茎秆强度增加,生育后期习性有变,叶形、荚形、荚色有差异,荚形、色似皂角。接毒鉴定,表现出较好抗性。D₃、D₄代抗性及其他表型既已稳定,已成品系。

D9107,吉林20号为受体,FD5114为供体,变异后代株高增加。叶形仍如吉20式披针形,但叶面平整皱折少,如供体。抗性、适应性和丰产性都有明显提高,已成品系,正在生产试验。

同时选择代表性株系分病毒株系鉴定。表3记录了几个品系的连续几年的鉴定情况。

表 4 记录分病毒株系的鉴定结果。

表 2 组合及选择结果

Table 2 Combinations and selecting result

组合		最后获得品系			
Combination		Lines gained finally			
受体	供体	组合号	个数	现处世代 (1996)	抗性
Receptor	Donor	No. of com.	Lines	Generation now (1996)	Resistant
吉林 20号	茶林食豆	D8703	1	D ₉	R
Jilin 20	Chameshidou				
长农 4号	FD5114	D8805	1	D ₈	R
Changnong 4					
长农 4号	FD5114	D8903	0		
Changnong 4					
吉林 21号	FD5114	D8904	4	D ₇	R or M R
Jilin 21					
吉林 21号	L83- 529	D9006	0		
Jilin 21					
吉林 27号	豌豆 Pea	D9005	0		
Jilin 27					
吉林 27号	L83- 529	D9004	0		
Jilin 27					
吉林 27号	皂角①	D9101	0		
Jilin 27	Zhaojiao				
吉林 27号	紫穗槐②	D9102	0		
Jilin 27	Zisuihuai				
吉林 25号	皂角①	D9103	1	D ₅	R
Jilin 25	Zhaojiao				
吉林 20号	FD5114	D9107	1	D ₅	R
Jilin 20					
吉林 20号	皂角①	D9106	待定		M R
Jilin 20	Zhaojiao				

注:①皂角: *Zhaojiao Cleditsia japonica*; ②紫穗槐: *Zisuihuai Amorphia fruticosa*。

表 3 几个品系在 SMV 接种条件下的连续鉴定结果 (1991- 1995)

Table 3 Evaluation of lines resistant to SMV under inoculation

品种 (系)	1991		1992		1993		1994		1995	
	田间 Field	田间 Field	田间 Field	田间 Field	田间 Field	田间 Field	田间 Field	田间 Field	田间 Field	田间 Field
Variety (Line)	(R or S)	(R or S)	(R or S)	(R or S)	(R or S)	(R or S)	(R or S)	(R or S)	(R or S)	(R or S)
FD5114(Donor)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Jinlin 21(Receptor)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D8904- 2	R, M R, M S	分离 R or M R Segregation	M R	R	R	R	M R	R	R	R
Changnong 4(Receptor)	S	S	HS	S	S	S	S	S	S	S
D8805- D1- 8	M S	M R	M S	M R	M R	M R	M R	M R	M R	M R
Jilin 20 (Receptor)			HS	S	S	S	S	S	S	S
D8703- 5			R	R	R	R	M R	R	R	R

1990年,从 D8904组合选出 2个变异单株,1991年将两个单株种成株行,另将未见变异的其余 D₁植株每株取 3个荚混合脱粒后,随机取种子种成 180株的群体,与受体对

表 4 几个大豆株系的分毒系鉴定结果

Table 4 Evaluation of resistance of soybean lines to each of SMV I、II、III strains

品种(系)	SMV	1993	1994	1995	名称	SMV	1993	1994	1995
Variety(Line)	Strains	Index	Index	Index	Name	Strains	Index	Index	Index
FD5114 (Donor)	I	12.93	15.2		8904- 2- 4	I		33.3	17.9
	II	22.38	23.3			II		33.3	38.4
	III	24.39	25.5			III		40.0	40.0
吉林 21号 Jilin 21 (Receptor)	I	46.93	53.6	100	8703- 5	I	18.2		19.2
	II	55.29	61.2	66.6		II	30.5		26.1
	III	60.34	70.0	80.7		III	24.7		25.3
D8904- 2- 1	I	25.59			9103- 1	I			29.2
	II	38.07				II			19.2
	III	46.3				III			24.7
D8904- 2- 2	I	17.27	16.7	19.4	吉林 25 Jilin 25 (Receptor control of D9103)	I			87.7
	II	39.32	26.8	41.1		II			71.6
	III	38.15	33.3	45.8		III			77.9
D8904- 2- 3	I	33.89				I			
	II	54.63				II			
	III	45.49				III			

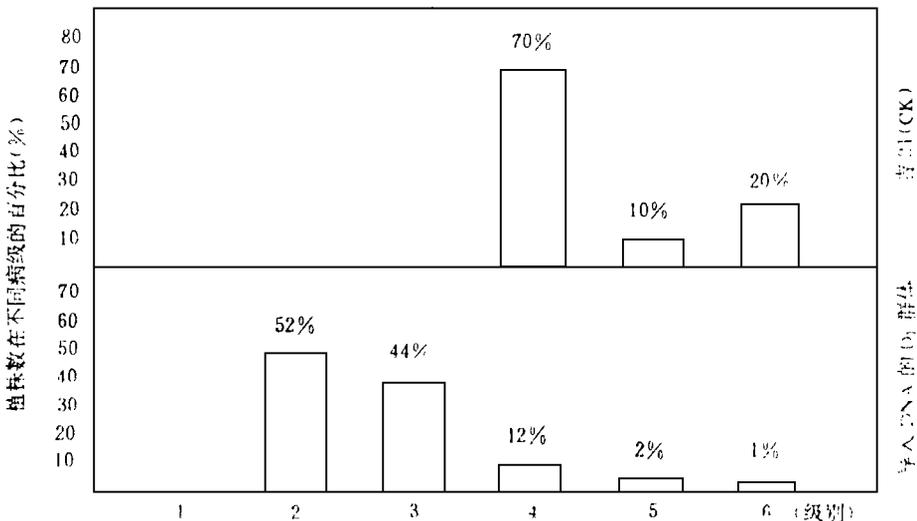


图 1 D8904组合导入群体的抗性水平

Fig. 1 Percentage of plants with different level of resistance in D8904 combination

照吉 21和供体 FD5114一起接种鉴定。从病情指数可见抗性差异明显。供体 FD5114为

18.24,受体吉 21 为 75,而变异株 D8904D₁-1 和 D8904D₁-2 在供受体之间为 56.5 和 45.1,这两株之间的差异在后来的世代中保持着,即 2 比 1 抗性强,从 2 中选出最后确定的品系,1 被淘汰。180 株的群体的病情指数也比对照低,反映出群体内仍有可选择的抗性株(图 1)。1992 年,将上述两个抗病单行再分为单株种植株行,同时接毒鉴定,选出既抗病又丰产的株行和单株。当年结果抗病株行的平均单株产量比对照高 50%。1993 年,将抗病株行中的最好单株每株分三部分种子,一部分于棚内种植分病毒株系鉴定,一部分平行混合毒系鉴定,一部分无毒繁殖观察丰产性,三者合一,经 1994-1995 年小区测产,获得代表不同株型的 4 个抗病丰产品系。

东北流行的大豆花叶病毒分为 I、II、III 3 个株系,它们的特点和致病力不同,同一大豆品种对它们的抗感表现也不同,已有工作者对此做了许多工作,提出了一些观点^[1,2,4,5]。本研究为较细掌握所得抗性变异对 SMV 不同株系的抗性表现,做分毒系连续鉴定。结果,如表 4 所示,变异品系对 I、II、III 株系的抗性是有差异的,但与对照相比,都有较大提高,而且是遗传的。1995 年的鉴定,为确认对东北地区毒源抗性的一致性,重新从哈尔滨东北农业大学引入近年他们所用 SMV I、II、III 号毒源进行再次鉴定,结果与往基本一致。对照吉林 21 号对新用毒源 I 号株表现顶枯严重,而抗性变异株(品)系 D8904-2-2 和 D8904-2-4 表现出相对更好的抗性结果。D8703-5,1992 年即已成品系,以点式接毒,自然蚜传的方法,观察其群体抗病性,结果,与其相邻种植的品种(长农 4 号等)大面积严重感病,叶片皱缩,植株萎蔫,而此品系几乎没有症状,叶片平整,生长正常。1993 年在棚内分毒系鉴定,对 I 号的病情指数为 18.8,对 II 号为 38.35,对 III 号为 32.8;而它的原受体对照对 I 为 81.25,对 II 为 100,对 III 为 95.84 可见明显提高了抗性。田间试验,1993-1994-1995 年都表现出较强抗性,1996 年由日本病毒专家在公主岭用酶联免疫(ELISA)方法鉴定,未见 I 号株系的阳性反应。此品系根系发达,较耐旱,SOD 电泳结果比受体增加了供体具有的 b₁b₂ 两条带。以皂角为供体的 D9103-1 变异株系,对 3 个株系的抗性也都有明显提高。这是很有意义的,它为利用远缘材料的基因改造大豆提供了可行性依据。

讨 论

本试验从 1987 年开始,获得的结果,1993 年经省级成果鉴定,尔后又经 3 年观察,抗性是真的,遗传稳定的。说明用花粉管通道技术导入一些对 SMV 呈抗性的材料的 DNA,培育抗 SMV 大豆的途径是可行的。而且,如前所述,常规方法在 F₂ 和 F₆ 只做两次接种鉴定,经过 F₃ F₄ F₅ 的分离筛选, F₆ 确定品系后再做第二次鉴定,抗性后代容易遗失。而逐代做鉴定,群体大,工作量大,无力进行。用外源 DNA 导入技术获得抗性单株,抗性及农艺性状很快稳定,再结合丰产性连续鉴定选择,可在较短时间内培育出抗病丰产品系,效率高,速度快。

大豆对 SMV 的抗性遗传研究历史尚短,而且现有文献对抗性遗传研究都是就当地抗源、毒源进行的,不免存在区域性,结果的参比性差,使得到的抗性遗传规律结论模糊而无从遵循。这又反过来限制了遗传研究的进展。因此对 SMV 的抗性研究有必要进入分子

水平,即采用分子生物学方法从 DNA分子考察遗传基因背景,与经典遗传学研究方法相结合,有助于对抗性机制的阐明。用外源 DNA导入方法转移来自植物的抗性基因,获得类似等位基因系抗性材料,可为这方面研究提供素材。我们用获得的抗性变异株系为父本,以感病品系做母本,做杂交试验,获得了 3:1的抗感分离结果,说明变异株得到了抗性基因。这一结果,为进一步用 RAPD技术分析 DNA差异与抗病性差异的关系,研究基因背景提供了基础。

参 考 文 献

- [1] 孙志强等, 1990,《大豆育种应用基础和技术研究进展》,江苏科学技术出版社, 161~ 165
- [2] 刘显华等, 1987,《吉林农业科学》,(2) 11~ 13
- [3] 刘德璞等, 1991,《大豆科学》, 10(3): 194~ 199
- [4] 廖林等, 1993,《农业科学集刊》, 1(1): 164~ 167
- [5] 廖林等, 1995,《作物学报》, 21(6): 707~ 710
- [6] Bowers, G. R., Jr., E. H. Paschal III, R. L. Bernard, et al., 1992, *Crop Sci.*, 32, 67~ 72
- [7] Buzzell, R. I., and J. C. Tu, 1989, *J. Hered.*, 80, 400~ 401

GAINING OF SOYBEAN LINES RESISTANT TO SMV BY INTRODUCING EXOGENOUS DNA

Liu Depu Liao Lin Yuan Ying Liu Yuzhi

(*Soybean Institute, Jilin Acad. of Agric. Sci. Gongzhuling, 136100*)

Abstract

Using the technique of pollen tube pathway exogenous DNA introduction, genetic materials from different variety, species, and genus was introduced to soybean varieties and 8 high-yielding superior lines resistant to SMV were gained from 5 of 12 combinations following by conventional selection. The evaluation of the lines resistant to SMV over three years it showed that the resistance was genetically stable. Compared with control variety the level of resistance was obviously improved to be similar to the donor or between donor and receptor. It was found that lines showed difference in resistance level to SMV strains I, II and III. It is recommended that exogenous DNA introducing technique can be adopted in creating and breeding soybean lines resistant to SMV.

Key words Soybean; SMV; Resistance; Exogenous DNA; Introduce