

导入外源 DNA 大豆后代的抗虫性鉴定与筛选^{*}

刘德璞 袁 鹰 王成武 周正平 郑培和

(吉林省农业科学院 公主岭 136100)

摘要 大豆食心虫 (*Leguminivora glycinivorella*) 和大豆蚜虫 (*Aphis glycines*) 是东北大豆生产的主要虫害。为拓宽资源的利用, 创造抗虫大豆种质, 用花粉管通道技术向大豆品种吉 20、吉 25、吉 27、吉 30 等导入皂角 (*Gleditsia japonica*)、鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*) 和农家早期品种 DNA, 对从后代中选出的变异系进行了多年抗虫性鉴定和筛选, 得到了抗虫品系 4 个。本文报告了抗虫鉴定筛选结果。

关键词 大豆; DNA 导入; 抗虫育种; 食心虫; 蚜虫

中图分类号 S 565. 103. 53 **文献标识码** A **文章编号** 1000—9841(2002)04—0245—05

大豆食心虫和大豆蚜虫是东北大豆生产的主要虫害。大豆食心虫侵蚀大豆子粒, 不仅造成减产而且影响商品质量, 总损失 5—10%; 大豆蚜虫吸食营养体汁液, 并传播病毒, 危害大豆, 可使大豆减产 20—50%。因此, 培育抗虫大豆已成为育种的重要目标。育种家通过常规育种方法已进行了多年工作, 但进展不大, 其中原因之一是抗源匮乏, 即使是有少数材料也是早期农家品种, 如对食心虫有较好抗性的是早期黑铁英之类; 对蚜虫抗性较好的只有几个无毛裸豆和部分野生材料。采用常规育种方法用这些资源进行转育时, 工作量大, 耗时长。已有人用从大量野生资源中筛选出的几份材料进行转育, 因分离复杂, 而未获得确切遗传背景和育种结果。抗虫育种非常需要引入新技术, 以拓宽资源利用。

现代生物技术为此提供了新途径。在我国 80 年代发展起来的花粉管通道导入外源 DNA 的技术, 通过导入含目标性状植物的总 DNA 将目标性状转至受体作物, 在多种作物上得到应用, 获得了较理想的育种效果。近些年还被基因工程工作者用于转移重组目的基因, 也得到了成功的基因转化^[1, 2]。我们用此技术在大豆上创造了许多变异材料, 并获得了抗花叶病毒病品系^[3, 4]。在应用于大豆抗虫育种的尝试中, 通过导入种间属间材料 DNA, 筛选培育出抗大豆食心虫、抗蚜虫的大豆品系。本文主要报

告对所得导入后代的抗性鉴定结果。

1 材料和方法

1.1 材料

DNA 供体: 属间材料是皂角 (*Gleditsia japonica*)、鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*); 种间材料是野生豆; 品种间材料是国育 100—4、吉林 16 号。皂角是本院内绿化用树, 鹰嘴豆由新疆引入, 国育 100—4 和吉 16 由吉林省农科院大豆所资源室提供。

受体材料: 吉林 25 号, 吉林 27 号, 吉林 20 号, 吉林 30 号。

鉴定用虫: 食心虫, 从本地田间提取成虫; 蚜虫, 由田间收集一代侨蚜。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与导入。按以前的报道^[3]进行。

1.2.2 变异后代筛选。对实施导入的第一代 (D₁) 一般以农艺性状的变异选择为主, 选出农艺性状变异的个体后, 于 D₂ 以后世代进行株系群体的抗性鉴定和丰产性筛选。选出丰产抗虫株系, 再进行连续三年以上的网棚接虫鉴定, 最后培育出抗虫丰产品系。

1.2.3 抗虫性鉴定

本研究对食心虫及蚜虫的鉴定试验, 主要是按照常规育种采用的“1986 年全国大豆病虫害讨论

* 收稿日期: 2001—12—24

课题来源: 吉林省科技发展规划项目。

作者简介: 刘德璞 (1951—), 男, 副研究员, 主要从事大豆生物技术研究。

会”通过的方法^[3]进行网棚内接虫,对食心虫害调查虫食率;对蚜害调查蚜虫繁殖量、受害指数和减产量。

1.2.3.1 食心虫抗性鉴定

春季播种网室内,4.5m 行长,每材料重复 2 次;网外 4.5m 行长,重复 2 次。在食心虫成虫发生期捕捉成虫,以雌蛾为主 20 个/m² 以上,放入棚内,秋收调查虫食粒率。

抗级:以抗感标准品种平均虫食粒率为依据,分 5 级:1 级为高抗 HR;2 级为抗 R;3 级为中抗 M;4 级为感 S;5 级为高感 HS。本研究所用标准抗性品种为吉 16,感虫参照品种为吉 27。为了解食心虫对子粒的危害程度及好嗜性,增设了另一参考数——虫食量:每百克子粒被食心虫吃去的量(%)即

$$\frac{\text{完好粒百粒重}-\text{虫食粒百粒重}}{\text{完好粒百粒重}}\times 100\%$$

1.2.3.2 蚜虫抗性鉴定

网内接蚜鉴定分析抗虫程度:6 月上旬,于田间采集侨蚜接种于 3—4 复叶期的幼苗端部叶片上,每品系接 10 株—20 株(年度不同),每株接 5—15 头蚜(年度不同),1996 年每株 5 头,1997 年为 10 头,1998 年为 15 头。接后每隔 10 天调查一次蚜口数,共 3 次,计算增殖倍数。第三次调查后揭去网罩调查危害指数,再隔 10 天第二次调查危害指数。以第二次调查的指数为主,参考第一次决定抗性程度。

危害指数计算公式:

$$\text{危害指数}=\frac{\sum(\text{各级有蚜株数}\times\text{相应级数})}{\text{调查总数}\times 4}\times 100$$

被害程度分为 5 级:0 级为全株无蚜;1 级株上有零星蚜;2 级心叶及嫩茎有较多蚜虫但未卷叶;3 级心叶及嫩茎布满蚜虫心叶卷曲;4 级全株蚜量较多,较多叶片卷曲,植株矮小。

抗级分级标准:按危害指数分 5 级:1 级高抗(HR);2 级为抗(R);3 级为低抗(LR);4 级为感(S);5 级为高感(HS)。

秋后分析减产量:收获扣罩人工接种的大豆植株,同数量收获相邻株行的不接蚜植株,分别脱粒计算平均单株产量。以不接蚜产量与接蚜产量之差除以不接蚜产量计算百分比。

2 结果与讨论

2.1 变异的筛选

以获得抗虫种质为目的的组合是:

组合号 (No. of com)	受体 (Receptor)	供体 (Donor)
D8804	吉 20	鹰嘴豆
D8803	铁丰 18	鹰嘴豆
D9003	吉 27	国育 100—4
D9005	吉 27	公野 85—32
D9006	吉 20	皂角
D9101	吉 27	皂角
D9104	吉 25	皂角
D9106	吉 27	吉 16
D9202	吉 30	皂角

这些组合中,除 D8803, D9101, D9106 表型变异较小外,其它几个组合都有较大的变异幅度。变异较明显的是以皂角、鹰嘴豆为供体以吉 20、吉 25、吉 30 为受体的组合。从这些组合中选出多个变异株系,其变异范围表现在株型、株高、叶型、荚型、茎秆强度等性状上。如以吉林 25 为受体以皂角为供体的后代不仅植株增高,而且荚皮变黑,荚形变宽、变硬,粗糙,明显表现出皂角荚的特征,从中得到抗食心虫和抗蚜虫的株系各一个。

以野生豆公野 85—32 为供体,选择方向是抗蚜。85—32 是从东北大量野生资源中鉴定筛选出的仅有的 2 份材料之一,常规育种者试图利用其向栽培品种转育抗蚜性,同时研究其抗性遗传基础,结果由于分离严重,无力对抗性进行跟踪,也未能获得育种结果。本试验以其为 DNA 供体,以吉 27 为受体,结果获得了在叶型和株型上有变异的后代,但经过 2 年的抗蚜性鉴定,未见抗性提高,茎秆反而变软,失去利用价值。以鹰嘴豆为供体的组合,获得一变异株,比原受体吉 20 叶片变小,厚度增加,蜡质增强,株型收敛,在品系培育过程中,发现其有较好的耐蚜性。1995 年后被纳入抗蚜性材料进行连续鉴定。

国育 100—4 是前人从大量栽培资源中鉴定筛选出的抗蚜材料之一,其特点是无茸毛,对其抗蚜机制的解释是因无茸毛而影响了蚜虫附着繁殖。本研究以此为供体目的也在于探讨其抗蚜机制。结果在以吉 27 为受体的组合中得到了一株系,经田间接蚜鉴定认定其抗蚜性后进入扣棚鉴定三年,证明了其抗蚜性。

对这几个株系,连续进行了三年以上的抗虫和

遗传稳定性观察, 获得了 2 个抗食心虫的品系和 3 个抗(耐)蚜的品系。

2.2 抗蚜性鉴定结果

1996—1999 年, 对以下几个品系进行了接蚜鉴定:

- NY—1(94—181, 吉 27+ 国育 100—4);
- NY—2(94—164, 吉 20+ 皂角);
- NY—3(94—277, 吉 20+ 皂角);
- NY—4(D2011, 吉 20+ 鹰嘴豆);
- NY—5 (94—593, 吉 25 + 皂角);
- 以 吉 20、吉 25 、吉 27 为对照。

2.2.1 蚜虫增殖速度

蚜量增殖调查分三次, 自接种 10 天开始每 10 天调查一次。在头 10 天, 除 94—593 外蚜量增殖速度差不多, 但至 20 天时差距拉大, 94—593 最慢。第三次调查, 蚜口数已过千。考虑到为避免、植株生长差异、蚜虫迁飞等因素造成调查的误差, 采用以第二次调查数为基础进行评价。通观 96、97、98、99 四年的结果, 可以看出 94—181, 94—593 蚜口增殖量比对照明显少, 有抑制蚜虫增殖的作用。

表 1 1996 年—1999 年不同品种(系)蚜口增殖量

Table 1 The number of aphids reproduction(1996~1999)

品种(系) Varieties	1996 年	1997 年	1998 年	1999 年
NY—1(94—181)	80.6	6.2	63.6	206
CK 吉 27	144	26.2	34.8	342.2
NY—2(94—164)	113	553.1	35.8	309.2
NY—3(94—277)	136	152.3	55.4	109
NY—4(D2011)	143	14.3	46.6	187.3
CK 吉 20	170	91.8	50	259
NY—5(94—593)	97	9.2	17.3	164.5
CK 吉 25	131	38	109.1	304.8

2.2.2 危害指数

危害指数是对蚜虫虫害研究的基本估计参数和衡量抗感尺度, 是最终决定材料对蚜虫反应的依据。两次调查, 第一次是在第三次蚜量调查揭开网罩后, 分析耐蚜性表现。可见 D2011 蚜口数虽多但危害指数并不高, 说明植株对蚜虫的抗感反应还表现在耐性方面。特别是 10 天后的第二次调查表现更为明显。打开罩以后生长限制解除了, 耐性强的很快恢复, 而耐性弱的恢复慢, 有的则无力恢复。从表 2 可见, 较耐蚜的由 77.5% 以上降到 50% 以下, 而对照都在 60% 以上, 这个结果与对产量影响的结果相吻合。

2.2.3 减产比率

秋收时, 同一品系收获接蚜和不接蚜的等量株数, 测其平均单株产量, 计算减产百分率(结果见表 3)。94—181 第一次危害指数为 77.5%, 第二次下降至 25%, 减产幅度也小。D2011 的表现是虽然有相对较多蚜量, 但植株生长也快, 基本未受影响, 揭开罩时其高度与未接蚜的一样, 之后很快恢复生长, 产量影响很小。最好的是 94—593, 前期蚜虫繁殖受限, 后期虽然有所增殖但植株已长大长壮, 减产量非常低。

表 2 1996 年—1999 年不同品种(系)的危害指数

Table 2 The suffering index of different varieties

(1996~1999)

品种(系) Varieties	1996 年	1998 年		1999 年	
		I	II	I	II
NY—1(94—181)	47	77.5	25	91.7	11.0
NY—2(94—164)	55	85	27	100	52.8
NY—3(94—277)	72.5	85	35	97.5	62.5
NY—4(D2011)	50	77.5	25	95.0	10.0
NY—5(94—593)	64	77.5	50	93.8	18.8
CK 吉 25	85.3	97.5	75	97.4	40.8
CK 吉 27	82.0	88.2	69.7	97.5	67.5
CK 吉 20	90	94.7	72.4	77.5	75.0

根据上述结果, 可认为 94—181、94T593、2011 对蚜虫是有抗(耐)性的, 可以作为抗性材料利用。94—181 是吉 27 导入无毛裸豆得到的后代, 是有毛的, 看来它的抗性与毛的有无无关, 可能还有其它化学原因。94 T593 也可能是化学原因, 有待进一步研究。而 D2011, 由于其叶片厚有蜡质, 虽然有蚜虫危害但不卷叶, 因其耐密性好, 通过密植栽培不仅可大幅度增产, 而且由于群体密度增加, 又相对稀释了蚜口密度, 从而提高了群体耐蚜效果。

表 3 1996 年—1999 年不同品种(系)接蚜后对产量的影响

Table 3 Percent of reduced yield of different varieties under inoculating in 1996~1999

品种(系) Varieties	1996 年		1998 年		1999 年	
	减产量 (g/株)	减产 (%)	减产量 (g/株)	减产 (%)	减产量 (g/株)	减产 (%)
NY—1(94—181)	4.08	26	3.5	17	1.1	7.1
NY—2(94—164)	3.4	22	7	40	9.7	56.4
NY—3(94—277)	6.1	21	11.3	34	5.3	34.6
NY—4(D2011)	6.72	24	2.7	11	2.8	16.6
NY—5(94—593)	0.85	4.2	1.5	5	1.7	9.5
CK 吉 25	8.17	39	11.7	49	8.3	37.4
CK 吉 27		61	6.7	28.8	3	24.4
CK 吉 20		48	4.3	23.9	7.1	41.5
D2011 密植					0.21	2.1

2.3 食心虫抗性鉴定结果

1995年前对13个株系进行了抗虫性鉴定,1995年后对仅留下的3个株系即KCD-2(吉25+皂角)、KCD-3(吉27+皂角)、KCD-8(吉20+皂角)及另

外几个高产品系D9202-1(吉30+皂角)、D9006-1(吉20+皂角)、92-34-37(吉20+灌水铁荚青)、92-251-254(吉21+灌水铁荚青)做进一步接虫鉴定。

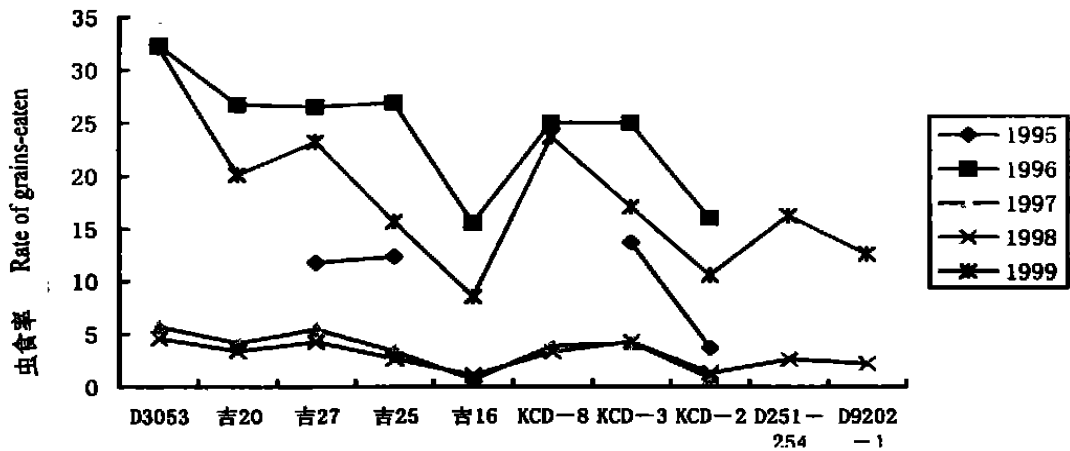


图1 1995年—1999年各品种(系)虫食率比较

Fig 1 The rate of grains-eaten of different varieties from 1995 to 1999

表4 1995年—1999年抗食心虫性鉴定结果与评价

Table 4 Evaluation of lines resistance to glycinivorella (1995~1999)

品种(系)	1995 年		1996 年		1997 年		1998 年		1999 年		总评价
Varieties	虫食率%	评价	虫食率%	评价	虫食率%	评价	虫食率%	评价	虫食率%	评价	
D3053 CK			32.3	HS	5.7	HS	4.6	HS	32.15	HS	HS
吉 20 CK			26.7	S	4.2	S	3.4	S	20.1	S	S
吉 27 CK	11.8	HS	26.5	S	5.5	HS	4.3	HS	23.2	S	S
吉 25 CK	12.4	HS	26.9	S	3.4	M	2.7	M	15.7	R	M
吉 16			15.6	R	0.7	HR	1.1	HR	8.6	HR	HR
KCD-8			25.0	M	3.9	M	3.3	S	23.7	S	M
KCD-3	13.7	HS	25.0	M	4.2	S	4.3	HS			S
KCD-2	3.7	HR	16.0	R	0.8	HR	1.3	HR	10.6	HR	HR
D251-254							2.6	M	16.2	R	R
D9202-1							2.2	R	12.6	R	R

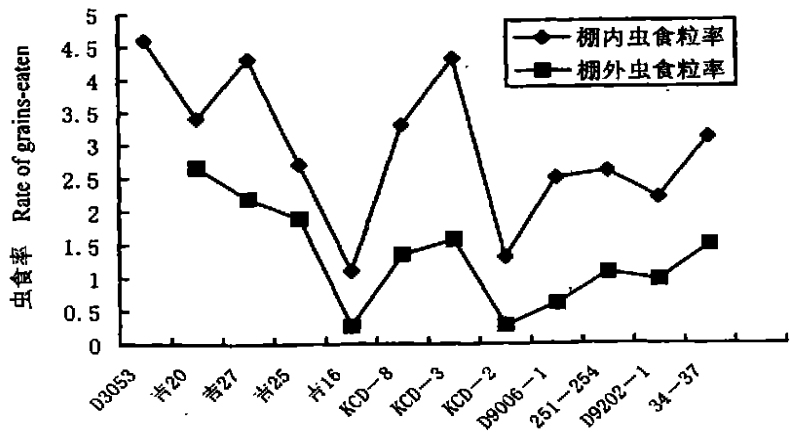


图2 棚内棚外抗性鉴定结果比较

Fig. 2 Comparison between appraising test results in shed and out shed

从虫食粒率上看, 通过 5 年的连续鉴定可肯定 KCD-2(吉 25+皂角)的高抗虫性。从表 4、图 1 可见, 尽管由于年份不同虫害发生程度不同, 但各品系(品种)在虫食粒率方面的抗感比较稳定, 图线趋势 5 年一致。感虫对照 D3053 和吉 27 总是位居高感, 而抗虫对照吉 16 和抗虫品系 KCD-2 总是在 HR(高抗)水平, 说明鉴定结果和抗感水平的评价是可重复的、可信的。KCD-2 的变异特点是植株比受体吉 25 高大, 荚皮粗糙(像皂角), 可能是抗虫原因之一。D9202-1 经过省级区域试验和生产试验, 表现出抗虫性和丰产性, 已通过品种审定。为测棚内接虫鉴定效果, 在棚外设自然感虫对照, 结果是吻合的(图 2)。

从虫食量方面考察并不一致于虫食粒率, 有的品系虫食粒率高而虫食量低, (KCD-8), 抗性对照吉 16 虫食粒率低而虫食量高, 肉眼感观上子粒危害程度不一样, 吉 27 和吉 16 子粒被虫大块吃掉, 而 KCD-8 的危害是小孔道, 说明对食心虫的抗性可表现在不同器官组织部位, 有的在荚皮上有的在子粒上。

3 结语

本研究是采用外源 DNA 导入技术进行抗虫性育种的一个尝试, 虽然作物抗虫机制和遗传比较复杂, 但上述试验结果我们认为有效的。尽管它们的抗性表现类型不同, 但正是这一点显现出外源总 DNA 导入技术的优越之处, 它可从抗虫性类型——排趋性、抗生素性、耐害性的各个特性方面发挥作用达到抗虫目的。因此, 我们认为在今后的抗性育种工作中, 采用此技术是可行地有效地。有关对所获抗性种质、品系的生化分析、分子鉴定工作另文报道。

参 考 文 献

1 曾君祉, 王东江, 吴有强, 等. 用花粉管途径获得小麦转基因植株 [J]. 中国科学(B), 1993, 24 (6): 596—601.
2 曾君祉, 吴有强, 王东江, 等. 花粉管通道(或运载)法转化的植株后代遗传表现及转化机理的探讨 [J]. 科学通报, 1998, 43(6): 561—566.
3 刘德璞, 袁鹰. 外源 DNA 导入大豆变异后代的 SOD 同工酶分析 [J]. 大豆科学 1991, 10(3): 194—199.
4 刘德璞, 廖林, 袁鹰, 等. 导入外源 DNA 获得抗 SMV 大豆品系 [J]. 大豆科学, 1997, 16(4): 277—282
5 周明祥. 作物抗虫性原理及应用 [M]. 北京, 北京农业大学出版社, 1992 329—337.

SELECTING AND EVALUATION OF MUTANT LINES RESISTANT TO INSECT PEST
BY INDRODUCING EXOGENOUS DNA INTO SOYBEAN

Liu Depu Yuan Ying Wang Chengwu Zhou Zhengping Zheng Peihe

(Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100)

Abstract *Leguminivora glycinivorella* and *aphid glycines* are major insect pest of soybean in northeastern area of China. In order to broaden applying of gemplasm resource and create new variety resisting to insect pest, exogenous DNA form *Gleditisia japonica*, *cicer arietinum* and land race were introduced into soybean cultivars of Jilin 20, Jilin 25, Jilin 27 and Jilin 30 by pollen tube pathway technique.

Four lines resistant to the insects (*leguminivora glycinivorella* or *aphid glycines*) were gained from the mutants through appraising test for 3—6 years. This paper report the results of selecting and appraising test.

Key words Soybean; DNA introduction; Breeding of resistance to insect; *Leguminivora glgcinivorella*; *Aphid glycines*