

# 大豆抗食叶性害虫相关 QTL 与基因网络研究进展

王 慧, 喻德跃

(南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

**摘 要:**大豆是重要的粮油作物,但其产量和品质受到食叶性害虫的严重影响。总结归纳了近 10 年来大豆抗虫分子遗传研究的成果,包括抗虫 QTL 定位、优异等位基因及载体材料发掘、优异杂交组合预测、抗虫相关基因鉴定及大豆与食叶性害虫交互调控基因网络分析等,并讨论了大豆抗虫研究面临的挑战和发展。

**关键词:**大豆;食叶性害虫;抗虫性;基因网络;QTL

**中图分类号:**S565.1      **文献标识码:**A      **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2016.05.0863

## Development of Soybean Leaf-feeding Insect Resistance QTLs and Gene Network

WANG Hui, YU De-yue

(Soybean Research Institute/National Center for Soybean Improvement/State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Soybean is an important grain and oil crop, however, its yield and quality are seriously reduced due to insect damage. In this paper, we mentioned the genetic research progress in soybean resistance to insect in last decade. It entailed resistance QTLs mapping, elite alleles and their carriers mining, the best crosses predicting, the characterization of resistance genes and gene network caused by the interaction between soybean and leaf-feeding insect. We also discussed the chance and challenge for soybean resistance to leaf-feeding insect.

**Keywords:** Soybean; Leaf-feeding insect; Resistance; Gene network; QTL

由于食叶性害虫危害,全世界主要作物每年减产约 18%<sup>[1]</sup>。大豆(*Glycine max* L. Merr.)是北美、南美和东亚的主要作物之一,早在 3 000 年前就在亚洲种植,是亚洲国家重要的植物营养来源,为人类和其它动物提供蛋白质和脂肪。在大豆整个生育期内受多种食叶性害虫的危害,虫害成为影响产量的一个主要因素。

大豆抗虫性研究始于 20 世纪 60 年代, van Duyn 等<sup>[2]</sup>筛选出 3 个高抗墨西哥豆甲(*Epilachna varivestis* Mulsant)的大豆资源(PI 171451, PI 227687 和 PI 229358),后又发现这些资源对玉米穗螟、烟草夜蛾、黎豆夜蛾、大豆尺夜蛾和甜菜夜蛾等多种害虫都表现出抗性。育种家以这 3 个大豆品种为抗性亲本,通过常规杂交育种释放了近 40 个育种品系,但没有一个品系的产量和抗性超过亲本<sup>[3-4]</sup>。可见,大豆抗虫性状复杂的遗传特性成为运用常规育种方法改良大豆抗虫性的巨大挑战。

通过基因工程手段把外源基因 *Bt* 转入大豆是提高大豆抗虫性的另一个有效手段,但自 *Bt* 基因问世以来,其安全性和抗性持久性一直存在争议<sup>[5]</sup>,使得 *Bt* 基因的应用受到了限制。而大豆内源基因与 *Bt* 基因聚合不仅能提高转 *Bt* 大豆的抗虫性,而

且能提高其它转 *Bt* 作物的抗虫水平<sup>[6-8]</sup>,因此发掘大豆内源抗虫基因对大豆抗虫育种和其它作物抗虫改良都具有重要意义。

随着大豆抗虫研究的深入,在大豆抗虫资源筛选、抗虫鉴定方法改良、抗虫 QTL 定位、功能基因鉴定和基因调控网络等方面都取得了突破性进展。本文将主要针对近 10 年大豆抗虫工作,总结大豆抗虫 QTL 定位、功能基因鉴定和基因网络分析等方面取得的科研成果,以期为加快大豆抗虫基因发掘和 大豆抗虫遗传性解析提供参考。

### 1 大豆抗虫性状的分子标记

#### 1.1 应用连锁分析定位大豆抗虫 QTL

大豆抗虫性状是一个复杂的数量性状,借助分子标记定位抗虫相关基因是鉴定和利用抗虫基因、解析抗虫遗传机制以及抗虫品种分子设计育种的基础,而抗虫位点的定位常伴随优异种质资源的发掘(表 1)。基于 3 个大豆优异抗性资源(PI 171451、PI 227687 和 PI 229358),美国育种家们最先开展了大豆抗虫 QTL 的定位工作。Rector 等<sup>[9-11]</sup>构建了 Cobb 与 PI 171451、PI 229358、PI 227687 分别杂交衍生的 3 个 F<sub>2:3</sub> 群体,定位了 11 个 QTL,分别

收稿日期:2016-04-18  
基金项目:国家自然科学基金(31201230);中央高校基本科研业务费专项资金(Y0201600116);作物遗传与新种质创新国家重点实验室开放课题(ZW2014004)。  
第一作者简介:王慧(1977-),女,博士,副教授,主要从事大豆抗虫性研究。E-mail: wanghui0@njau.edu.cn。  
通讯作者:喻德跃(1965-),男,博士,教授,博导,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: dyyu@njau.edu.cn。

与大豆对玉米穗螟的抗选性和抗生性相关。在这些 QTL 中,位于连锁群 E、G、H 和 M 上的位点 (QTL-E、QTL-G、QTL-H 和 QTL-M),由于其对性状的变异解释率较高或者在多个群体中被定位到而倍受关注。QTL-E 是从 Cobb 与 PI 227687 杂交衍生的群体中鉴定的 1 个抗生性 QTL,对性状的变异解释率达 26%,抗性等位基因来自 PI 227687<sup>[11]</sup>。QTL-G 是从 Cobb 与 PI 229358 杂交衍生的群体中鉴定的 1 个抗生性 QTL,对性状的变异解释率达 14%,抗性等位基因来自 PI 229358<sup>[11-12]</sup>。QTL-M 是从 Cobb 与 PI 171451、PI 229358 分别杂交构建的两个 F<sub>2:3</sub> 群体中定位到的位点,与大豆对玉米穗螟和斜纹夜蛾的抗选性和抗生性有关,对抗选性的变异解释率达 37%,对抗生性的变异解释率达 28%,抗性等位基因来自 PI 229358<sup>[9-12]</sup>。在田间条件下, QTL-H 能增加 QTL-G 和 QTL-M 的抗性,4 个位点聚合,特别是 QTL-E 与 QTL-M 聚合对多个害虫表现出较高的抗性, QTL-E、QTL-G 和 QTL-M 分别与 *cry1Ac* 基因聚合能增加转 *Bt* 基因大豆对食叶性害虫的抗性<sup>[6-7, 13-14]</sup>。Zhu 等<sup>[15]</sup>认为 QTL-M 位点是 3 个位点 (QTL-G、QTL-H 和 QTL-M) 中主要的抗性位点,把 QTL-M 定位在 1 个 0.52 cM 的基因组区域 (Sat\_258-Satt702)。Parrott 等<sup>[16]</sup>根据 Willams 82 的基因组序列开发了新的 SSR 标记 Satt729,把 QTL-M 进一步定位到 0.25 cM 区间内。Zhu 等<sup>[17]</sup>构建了 PI 229358 的 BAC 文库,用 Sat\_258 标记侧翼序列作探针杂交该文库,得到 3 个阳性克隆,其中两个克隆确定具有标记 Sat\_258。

在日本, Komatsu 等<sup>[18-19]</sup>对大豆资源进行了抗虫性筛选 (斜纹夜蛾),发现 Himeshirazu 的抗性水平高于 PI 229358,进而构建了 Himeshirazu 和感虫品种 Fukuyutaka 杂交衍生的 F<sub>2</sub> 群体,在该群体内 M 连锁群上除了 QTL-M (*CCW-1*) 外,还定位了 1 个新的 QTL (*CCW-2*),该位点对性状的变异解释率达 15.9%。Okii 等<sup>[20]</sup>又利用该杂交组合衍生的 F<sub>9</sub> 和 F<sub>10</sub> 群体,分别定位了 2 个大豆抗选性相关的 QTL (*qRslx1* 和 *qRslx2*)、2 个茸毛长度相关的 QTL 和 2 个茸毛密度相关的 QTL,其中 *qRslx1* 与 *CCW-1* (QTL-M) 位置相似,但其抗性等位基因来自亲本 Himeshirazu。

在国内,崔章林等<sup>[21]</sup>对 6 724 份国内外栽培大豆种质进行了 6 年的田间食叶性害虫抗性鉴定,筛选出 20 份抗性优异的种质。王慧等<sup>[22]</sup>利用高抗品种通山薄皮黄豆甲与高感品种皖 82-178 杂交衍生的重组自交系群体,定位了 3 个与大豆抗斜纹夜蛾相关的 QTL。刘华等<sup>[23]</sup>利用相同的群体定位

了 2 个与大豆抗斜纹夜蛾相关的 QTL,分别位于 wt-12 (J 连锁群) 及 wt-11 (O 连锁群) 的连锁群上,对性状变异的解释率为 8.60% 和 17.22%。付三雄等<sup>[24]</sup>利用抗虫性材料科丰 1 号与感虫性材料南农 1138-2 杂交衍生的重组自交系群体,在 O 连锁群上定位到 1 个新的抗虫相关 QTL,对性状变异的解释率为 11.74%;在 D1b + W 和 L 连锁群上分别定位到 1 个抗虫相关 QTL,对性状变异的解释率分别为 11.30% 和 6.36%。通过进一步增加标记数量和类型, Kim 等<sup>[25]</sup>在科丰 1 号与南农 1138-2 杂交衍生的重组自交系群体中定位了 13 个抗虫相关 QTL,在先进 2 号与赶泰-2-2 衍生的重组自交系群体中定位了 3 个抗虫相关 QTL。

1.2 应用关联分析定位大豆抗虫 QTL

除连锁分析外,关联分析方法在解析植物数量性状遗传组分上成功应用<sup>[26]</sup>,该方法不仅大大增加了大豆抗虫位点鉴定的数目,而且能够发掘各位点中最优等位基因及其载体种质。应用关联分析方法,在充分考虑地理来源、群体结构和个体间亲缘关系的条件下,王慧等<sup>[27]</sup>从 196 份栽培大豆组成的自然群体内,利用 135 个 SSR 标记,鉴定了 7 个分别与 3 个大豆抗斜纹夜蛾指标性状 (幼虫重、蛹重和单虫食叶量) 显著关联的位点,其中 4 个位点对性状的变异解释率超过了 10%,6 个位点所在的连锁群存在食叶性害虫抗性位点。对各位点等位基因的效应分析发现,幼虫重相关位点的等位基因主要表现为减效作用,等位基因 Sat\_334-A208 减效作用最大,减效率达 43.9%。单虫食叶量和蛹重相关位点的等位基因主要表现为增效作用;等位基因 Satt199-A186 对单虫食叶量增效作用最大,增效率达 36.4%;等位基因 Sat\_320-A286 对蛹重增效作用最大,增效率达 31.4%<sup>[27]</sup>。Wang 等<sup>[28]</sup>利用相同的自然群体,以幼虫重、蛹重和单虫食叶量为抗性指标,株高、主茎分枝数、单株粒数和单株粒重为补偿指标,评价了大豆对斜纹夜蛾的抗性和耐性,7 个表型指标在群体内的表型变异显著。利用来自 EST 或基因的 1 433 个 SNP 标记,通过全基因组关联分析共检测到 51 个位点与 7 个性状显著关联,单个 SNP 对性状变异的解释率为 2.8% ~ 11%。其中在 M 连锁群上的位点 *qSCCW7-1* 与位点 *CCW-2* 紧密连锁<sup>[19, 28]</sup>。位点 *qSCCW18-3* 位于 Rubisco 活化酶基因启动子区,同时与抗性和补偿性指标显著关联,该位点的抗性等位基因阻碍幼虫的发育,促进植株生长高<sup>[28]</sup>。分析优异载体材料的遗传组成,发现高抗性低耐受性的材料携带较多的抗性位点优异等位基因,而高耐受性低抗性的材料携带较多的耐受性

位点优异等位基因<sup>[28]</sup>,该研究结果在分子水平上支持了植物抗虫性和耐虫性的分类。Kim 等<sup>[29]</sup>利用 526 个材料组成的自然群体,基于两阶段多基因模型的关联分析方法,利用 233 个 SSR 标记定位了 69 个与斜纹夜蛾幼虫重相关的 QTL,其中 10 个位点两年重复定位,不同年份等位基因的效应有很大的差别,并从 526 个材料中选出 10 组有潜力的杂交组合。这些位点优异等位基因、载体材料和优异组合的预测为抗虫基因定位、发掘和利用指明了新的方向。

表 1 大豆抗食叶性害虫相关的 QTL

Table 1 The QTLs related to soybean resistance to leaf-feeding insect											
群体 Population	QTL 数 QTL number	群体类型 Population type	家系数 Line number	图谱标记数 Marker number	标记类型 Marker type	分析方法 Analysis method	试验害虫 Insect pest	评价时期 Evaluation period	评价方法 Evaluation method	评价指标 Evaluation index	参考文献 Reference
Cobb × PI 229358	3	F <sub>2:3</sub>	103	128	RFLP	IM	玉米穗螟卵	V4	网室单一虫种鉴定法	叶面积损失百分率	[9]
Cobb × PI 171451	3	F <sub>2:3</sub>	110	85	RFLP	IM	玉米穗螟卵	V4	网室单一虫种鉴定法	叶面积损失百分率	[10]
Cobb × PI 227687	2	F <sub>2:3</sub>	93	120	RFLP	IM	玉米穗螟	V2	温室单一虫种鉴定法	叶面积损失百分率	[10]
Cobb × PI 229358	3	F <sub>2:3</sub>	103	128	RFLP	GLM	玉米穗螟	V4	室内生物学鉴定	幼虫重	[11]
Cobb × PI 171451	1	F <sub>2:3</sub>	110	85	RFLP	GLM	玉米穗螟	V4	室内生物学鉴定	幼虫重	[11]
Cobb × PI 227687	2	F <sub>2:3</sub>	93	120	RFLP	GLM	玉米穗螟	V4	室内生物学鉴定	幼虫重	[11]
Minsoy × Noir 1	7	RIL	240	500	SSR, RFLP	IM	玉米穗螟 大豆造桥虫	/	室内生物学鉴定	幼虫重、蛹重、发育率 和蛹存活率	[30]
Noir 1 × Archer	3	RIL	233	490	SSR, RFLP	IM	玉米穗螟	/	室内生物学鉴定	幼虫重、蛹重、发育率 和蛹存活率	[31]
Minsoy × Noir 1	8	RIL	240	490	SSR, RFLP	IM	玉米穗螟	/	室内生物学鉴定	幼虫重、蛹重、发育率 和蛹存活率	[31]
Cobb × PI 229358	5	F <sub>2:3</sub>	100	158	RFLP SSR	CIM	玉米穗螟	V4	网室单一虫种鉴定法	叶面积损失百分率、 幼虫重	[12]
Benning (7) × PI 229358	1	RSL(BC <sub>6</sub> F <sub>2,3</sub> )	31	7	SSR	GLM	玉米穗螟 大豆造桥虫	V2	温室单一虫种鉴定法 室内生物学鉴定	叶面积损失百分率、 幼虫重	[15]
Benning (6) × PI 229358	3	NIL(BC <sub>5</sub> F <sub>2</sub> )	8	9	SSR	GLM	玉米穗螟 大豆造桥虫	V2	温室单一虫种鉴定法 室内生物学鉴定	叶面积损失百分率、 幼虫重	[15]
Fukuyutaka × Himeshirazu	2	F <sub>2</sub>	143	147	SSR	CIM	斜纹夜蛾	V14	室内生物学鉴定	幼虫生长系数 S II	[19]
Fukuyutaka × Himeshirazu	2	F <sub>9</sub> , F <sub>10</sub>	145	147	SSR	CIM	斜纹夜蛾	V3 ~4	双向选择试验	目测叶面积损失划分 0 ~10 级	[20]
Fukuyutaka × Himeshirazu	2	F <sub>9</sub> , F <sub>10</sub>	145	203	SSR	CIM	斜纹夜蛾	V3 ~4	显微镜检测	茸毛长度和茸毛密度	[20]
皖 82 - 178 × 通山薄皮黄豆甲	3	RIL	139	103	SSR	单标记 分析	斜纹夜蛾	V6	室内生物学鉴定	幼虫重	[22]
皖 82 - 178 × 通山薄皮黄豆甲	2	RIL	133	59	SSR	CIM	斜纹夜蛾	V6	室内生物学鉴定	幼虫重	[23]
科丰 1 号 × 南农 1138 - 2	3	RIL	201	323	SSR	CIM	斜纹夜蛾	V6	室内生物学鉴定	幼虫重、蛹重	[24]
科丰 1 号 × 南农 1138 - 2	13	RIL	184	692	SSR, RFLP, SV, EST	MCIM	斜纹夜蛾	R2 ~ R3	室内生物学鉴定	幼虫重、蛹重、叶面积 损失百分率	[25]

续表 1

群体 Population	QTL 数 QTL number	群体类型 Population type	家系数 Line number	图谱标记数 Marker number	标记类型 Marker type	分析方法 Analysis method	试验害虫 Insect pest	评价时期 Evaluation period	评价方法 Evaluation method	评价指标 Evaluation index	参考文献 Reference
先进 2 号 × 赶泰 -2-2	3	RIL	147	400	SSR	MCIM	斜纹夜蛾	R2 ~ R3	室内生物学鉴定	幼虫重、蛹重、叶面积 损失百分率	[25]
自然群体	7	自然群体	196	135	SSR	GLM	斜纹夜蛾	V6	室内生物学鉴定	幼虫重、蛹重、单虫食 叶量	[27]
自然群体	51	自然群体	170	1433	SNP	MLM	斜纹夜蛾	V6	室内生物学鉴定	幼虫重、蛹重、单虫食 叶量、主茎分枝数补 偿系数、株高补偿系 数、单株粒数补偿系 数、单株粒重补偿 系数	[28]
自然群体	69	自然群体	526	233	SSR	GLM	斜纹夜蛾	R2 ~ R3	室内生物学鉴定	幼虫重	[29]

2 大豆抗虫基因的克隆与功能验证

尽管有大量大豆抗虫 QTL 已定位或精细定位，但至今没有大豆抗虫基因图位克隆的报道，已报道的大豆抗虫相关基因都是通过同源克隆的方法获得，主要来源于茉莉酸合成与代谢途径，其次是次生代谢物质合成与代谢途径。

2.1 茉莉酸合成与代谢途径的大豆抗虫相关基因

茉莉酸及其衍生物作为信号分子应对各种环境因子，参与植物的发育过程。茉莉酸及其前体 12-氧-植物二烯酸 (12-oxophyto-dienoic acid, 12-OP-DA) 应答生物胁迫和非生物胁迫，一系列茉莉酸响应基因分别编码蛋白酶抑制剂、植物抗毒素合成酶、营养贮存蛋白、硫堇蛋白和防御素类，在植物中这些蛋白多具有防御作用。茉莉酸在植物体内的这些生物学功能提升了人们对其合成和代谢过程中关键酶的关注。丙二烯氧化物合酶 (allene oxide synthase, AOS) 是茉莉酸合成途径中第一个关键酶，属 P450 超级家族，大豆基因组上有 3 个编码丙二烯氧化物合酶的基因<sup>[32]</sup>。大豆 *GmAOS* 基因全长 1 789 bp，没有内含子，编码 519 个氨基酸，具有典型叶绿体定位信号肽，启动子区具有多个响应赤霉素 (TAACAA)、茉莉酸 (G-box)、防御 (Wbox) 和非生物胁迫 (GAAAAA) 等顺式作用元件<sup>[33-34]</sup>。该基因在大豆根、茎、叶和茎尖中都有表达，在高抗材料中的表达量高于高感材料，快速响应斜纹夜蛾诱导。*GmAOS* 在高抗材料中的酶活性约为高感材料中的 4 倍。转大豆 *GmAOS* 基因的烟草获得了相对较高的抗虫性，具体表现在对斜纹夜蛾的排驱性增强，强迫喂养的斜纹夜蛾幼虫相对增长率降低；转基因烟草叶片损失面积减少，叶片上的平均茸毛数增加

了 5 倍，茸毛更加圆润、饱满、坚硬；转基因植株体内 AOS 酶、过氧化物酶 (peroxidase, POD) 和糜蛋白酶抑制剂 (chymotrypsin inhibitor, CI) 酶的活性提高，茉莉酸含量、脱落酸含量、赤霉素含量提高<sup>[34]</sup>。同源基因 *GmAOS1* 同样快速响应斜纹夜蛾取食诱导，在高抗材料叶片中表达量高于高感材料，其启动子区在 184 个材料中存在 43 个 SNP/Indel，27 个等位基因的变异，候选基因关联分析证明大豆 *GmAOS1* 基因启动子多态性与 3 个防御指标显著关联。两个序列差异最大的等位基因，表达水平差异达到显著水平，对斜纹夜蛾的抗性也达到极显著水平<sup>[32]</sup>。这些研究结果说明大豆丙二烯氧化物合酶基因在大豆对斜纹夜蛾的抗性中发挥重要作用。同源基因 *GmAOS3* 还没有功能研究的报道。

丙二烯氧化物环化酶 (allene oxide cyclase, AOC) 也是茉莉酸合成途径中的关键酶，位于丙二烯氧化物合酶之后，在大豆中有 6 个同源基因<sup>[35]</sup>，其中 *GmAOC3* 基因快速响应斜纹夜蛾的取食诱导。与对照相比，转 *GmAOC3* 基因烟草提高了植株中茉莉酸和酚类物质的含量、腐胺 N-甲基转移酶 (putrescine N-methyltransferase, PMT) 基因和蛋白酶抑制剂基因的表达量以及苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 的活性，增加了挥发性物质中抗性组分的含量。这些生理生化和代谢水平上的改变可能是转 *GmAOC3* 基因烟草排驱性和抗生性增强的原因<sup>[36]</sup>。

MYC2 蛋白是一类 HLH-Leu 锌指转录因子，能调控多个茉莉酸合成途径和信号途径中的基因<sup>[37]</sup>。在大豆中有 22 个 MYC 类转录因子，7 个基因属 MYC2 类转录因子，具有转录激活活性，除 *GmMYC3* 外，其它 6 个基因在根、茎、叶、花和种皮中表达，在

发育的种子中不表达,受害虫取食诱导,其中 *Gm-MYC1* 基因在叶片中的表达量最高,响应斜纹夜蛾的诱导最强,且转 *GmMYC1* 基因烟草获得了较高的排驱性和抗生性<sup>[38]</sup>。两个茉莉酸应答基因 *GmVSPβ* 和 *GmN: IFR* 也通过在烟草中异源表达证明了其抗虫作用<sup>[39]</sup>。

## 2.2 次生代谢途径的大豆抗虫相关基因

萜类物质 (terpenoids 或 isoprenoids) 是一大类植物天然次生代谢物质,在抗虫大豆材料叶片中鉴定到反式罗勒烯 (trans-ocimene) 和芳樟醇单贴物质 (linalool monoterpenes)<sup>[40]</sup>,在食叶性害虫危害的大豆植株挥发性物质中金合欢烯 [(E, E)- $\alpha$ -farnesene] 含量增加,受机械损伤的大豆植株顶部释放出大量的单贴类物质 (如芳樟醇, linalool) 和倍半萜 (如蛇麻烯,  $\alpha$ -humulene) 等<sup>[41-42]</sup>。大豆中有 23 个萜类合酶基因 (*GmTPS*), 分布在 20 条染色体上, 有 6 种不同的遗传结构和序列变异类型, 多数 *GmTPS* 蛋白具有精氨酸丰富的 DDX2D 基序, 有 2 个亚家族 (TPSa 和 TPSb) 的蛋白具有 RRX8W 结构域<sup>[43]</sup>。其中萜类合酶基因 *GmTPS3* 在叶片和花中特异表达, 快速响应机械损伤诱导, 表达 *GmTPS3* 基因的烟草植株对斜纹夜蛾的抗性增强, 挥发物质中香叶醇的含量提高, 证明了大豆 *GmTPS3* 基因是 1 个具有抗虫功能的香叶醇合酶基因<sup>[43]</sup>。

## 2.3 转基因技术推进大豆抗虫基因的功能鉴定

在已报道的大豆内源抗虫相关基因中, 5 个基因的功能是通过在模式植物烟草中异源表达验证, 直接在大豆上验证功能的报道很少。大豆转化效率较低是限制大豆内源基因在大豆上验证功能的主要因素。随着转基因技术的发展, 研究者尝试在大豆上验证其内源抗虫基因的功能。例如, 宁爱玲等<sup>[44-45]</sup> 构建了携带 *bar* 基因的重组载体 pBA002-*GmAOC3*, 通过根癌农杆菌介导的子叶节转化获得过量表达 *GmAOC3* 基因的大豆, 转基因株系具有较好的抗虫性。该转基因大豆株系的获得能有效的评价 *GmAOC3* 基因在大豆抗虫育种中的利用价值, 对其它大豆内源抗虫基因的功能评价具有借鉴意义。

## 3 大豆与食叶性害虫交互的基因调控网络

诱导抗性指植物受到病虫害危害或者环境影响而产生的应激反应, 与组成抗性相比, 诱导抗性更经济, 参与防御的基因只有在受到危害时才激活表达, 正常状态下表达水平很低或者不存在。诱导抗性减少害虫对植物防御适应的风险, 在自然界中普遍存在<sup>[16]</sup>。大豆对食叶性害虫的抗性也可以被

昆虫取食或者伤害等行为诱导产生或者加强, 从而获得对下一次昆虫袭击的防御能力。在大豆抗虫研究中, 很多食叶性害虫都可以诱导大豆植株对一系列大豆主要害虫产生抗性, 例如, 墨西哥豆瓢虫诱导后的大豆植株会阻碍该害虫进一步的取食损害<sup>[46]</sup>, 棉叶螨取食之后的大豆植株该害虫种群数目减少<sup>[47]</sup>, 机械损伤处理后的大豆植株增加其对大豆尺蠖和墨西哥豆瓢虫的抗性<sup>[48]</sup>。斜纹夜蛾作为杂食性害虫, 对植物诱导抗性防御较为敏感, 是研究植物对昆虫诱导抗性较好的模式昆虫<sup>[49]</sup>, 同时也是一种主要的大豆食叶性害虫。

在大豆上, 无论感虫材料还是抗虫材料都受斜纹夜蛾的诱导而产生抗虫性, 已诱导植株叶片对斜纹夜蛾的排驱性增强, 强迫条件下喂养的斜纹夜蛾幼虫发育迟缓, 体重显著低于非诱导植株叶片喂养的幼虫<sup>[50]</sup>。但抗虫材料和感虫材料诱导产生的抗虫反应存在差别, 感虫材料受到诱导后快速产生抗性反应, 1 d 达到顶点, 3 d 后开始下降, 在 5~7 d 时转变为感虫, 抗虫材料则诱导后抗性缓慢上升, 第 5 d 达到高峰, 7 d 后诱导抗性丧失<sup>[51]</sup>。对大豆蛋白表达谱的分析发现, 11 个大豆蛋白在斜纹夜蛾取食前后发生了改变, 包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶大亚基、营养贮存蛋白 A、磷酸甘油酸激酶、ATP 合酶  $\beta$  亚基、苹果酸脱氢酶、苯丙氨酸解氨酶、S-腺苷甲硫氨酸合成酶、抗坏血酸过氧化物酶、20S 蛋白酶体  $\alpha$  亚基, 涉及 3 个生理过程, 即活性氧离子清除、防御信号转导和代谢调控<sup>[50]</sup>。这些蛋白编码基因的转录水平也受斜纹夜蛾诱导而上调表达<sup>[50]</sup>, 因此可作为大豆抗虫候选基因进一步深入研究。

大规模筛选技术的应用推动了大豆与食叶性害虫交互作用的研究。Wang 等<sup>[39, 51]</sup> 分别利用基因芯片技术和 RNA-Seq 技术, 获得了虫诱导处理后的大豆抗、感虫品种中差异表达谱。对转录谱的分析发现, 抗虫品种中 827 个基因上调表达, 感虫品种中 249 个基因上调表达, 100 个基因下调表达。其中 80 个基因在抗感品种中表达调控重叠, 73 个基因方向一致, 7 个基因在抗虫品种中上调表达, 在感虫品种中下调表达。差异表达基因涉及防御胁迫应答、次生代谢、细胞壁修饰、生长与发育、信号转导、基础代谢和转录调控等生物学过程。在抗、感材料同向差异表达基因中, 19% 的基因是防御胁迫相关的基因; 在抗虫品种中, 14% 的上调表达基因是转录调控相关基因; 在感性品种中, 12% 的上调差异表达基因是防御胁迫相关的基因, 13% 的下调表达基因是参与初生代谢反应的基因<sup>[51]</sup>。同样通过 RNA-Seq

技术,在抗、感材料中分别鉴定了1 004和1 580个基因,其中除大部分是参与胁迫和防御反应的基因外,还包括多种编码转录因子的基因<sup>[39,51-52]</sup>。三个防御基因(*GmVSPα*、*GmVSPβ*和*GmN:IFR*)的启动子序列中具有丰富的防御胁迫相关的顺式作用元件,基因上调表达的12个转录因子,包括MYB类、WRKY类、NAC类、bZIP类和DREB类,都能转录激活*GmVSPβ*和*GmN:IFR*基因的表达,2个转录因子(*GmbZIP110*和*GmWRKY39*)能调控这3个防御基因的表达<sup>[52]</sup>。可见,大豆诱导抗虫性是个多个基因协调互作的结果。

这些研究结果对理解大豆不同品种诱导抗性的分子机理、调控信号网络以及发掘大豆诱导抗虫基因具有重要价值。

4 大豆抗虫研究面临的挑战与展望

经过大量研究者几十年不懈的努力,大豆抗虫性研究得以迅猛发展,筛选了一批大豆抗性资源,定位了大量的QTL,克隆并验证了多个大豆抗虫相关基因。但与模式植物相比,大豆抗虫性的研究还有很多科学问题有待解决。

首先,大豆抗虫QTL的应用和图位克隆研究进展缓慢。除大豆抗虫性本身的特点外,在大豆抗虫QTL定位中使用随机标记是QTL利用和候选基因鉴定的限制因素之一。随机标记来自基因组的任意区域,定位的QTL与控制抗虫性的基因不存在一致性,因此,从位点到基因还有很大距离。随着大量的EST序列的出现和多个植物基因组测序的完成,开发了基于EST或基因的基因标记,与随机标记相比,基因标记与期望性状的基因完全连锁,不受遗传背景的限制<sup>[53]</sup>。大豆基因组测序已完成<sup>[54]</sup>,为开发基因标记提供了新的契机,这将有助于大豆抗虫QTL定位和抗虫位点克隆。

其次,大豆耐害性QTL的研究还非常有限。大豆抗虫的机制包括抗生性、抗选性和耐害性,抗生性和抗选性统称为抗性,它代表了植物产生有毒、有害物质抵御害虫伤害的能力,而耐害性指植物通过规避或补偿性生长而减轻伤害的能力<sup>[16]</sup>。耐虫品种对害虫危害具有较大的补偿效应,能够忍受比感虫品种更多的虫量,而产量损失较少。充分利用植物本身的耐虫特性,放宽植物对害虫危害的经济阈值,提高害虫在植株上的虫口密度,也可以减少化学农药的防治次数,减轻对环境的污染<sup>[55]</sup>。因此,在大豆抗虫育种过程中,育种家在选育高抗性大豆品种的同时,还要积极开发和利用耐虫性好又高产的良种。本课题组在大豆耐虫性方面做了一

些有益的尝试,筛选了一批耐害性大豆资源和定位了23个大豆耐害性相关的位点<sup>[28]</sup>。

另外,野生大豆资源在抗虫性研究中利用不足。中国是大豆的起源地,不仅具有大量的栽培大豆类型,而且囊括了丰富多样的野生资源,除青海、新疆和海南外,其它省份都发现有一年生野生大豆的分布,现发现的野生大豆资源占世界野生大豆资源的90%以上<sup>[56]</sup>。野生大豆、大豆地方品种和育成品种重测序结果的比较发现,野生大豆具有较多的特异序列,地方品种次之,育成品种最少,其中野生大豆中一半的抗性相关序列已在地方品种和育成品种中丢失<sup>[57]</sup>。野生大豆与大豆地方品种的遗传多样性比较,也发现野生大豆中等位基因的变异高于大豆地方品种,仅有51%的等位基因在大豆地方品种中保留下来<sup>[58]</sup>。可见,经过多次驯化和人工选择,野生大豆中大量优异的遗传变异没有保留在栽培大豆中。尽管已有野生大豆抗虫性研究的报道<sup>[59]</sup>,但与其它作物、甚至大豆其它性状上野生资源研究利用的现状相比差距还很大。

大豆基因组研究在最近10年取得了突飞猛进的发展,组装完成了多个栽培大豆和野生大豆基因组序列<sup>[54, 57, 60-61]</sup>,构建完成了种间杂交群体的高密度遗传图谱<sup>[62]</sup>,这些研究结果将有助于发掘和利用野生大豆资源、鉴定大豆抗虫基因、解析大豆抗虫性的遗传基础。“减肥减药”是作物育种的新趋势,可以预见大豆抗虫育种研究将进入一个全新的阶段。

参考文献

[1] Oerke E C. Crop losses to pests[J]. Journal of Agricultural Science, 2006, 144:31-43.

[2] van Duyn J W, Turnipseed S G, Maxwell J D. Resistance in soybean to the Mexican bean beetle[J]. Crop Science, 1971, 11: 572-573.

[3] Boethel D J. Assessment of soybean germplasm for multiple insect resistance[M]//Clement S L, Quisenberry S S. Global plant genetic resources for insect-resistant crops. Boca Raton, FL: CRC Press, 1999: 101-129.

[4] Lambert L, Tyler J. Appraisal of insect-resistant soybeans Economic[M]//Webster J A, Webster B R. Environmental, and social benefits of insect resistance in field crops. Lanham, M D: Thomas Say Publications, Entomological Society of America, 1999: 131-148.

[5] Christou P, Capell T, Kohli A, et al. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(6): 302-308.

[6] Walker D R, Boerma H R, All J N, et al. Combining *cry1Ac* with QTL alleles from PI 229358 to improve soybean resistance to lepidopteran pests[J]. Molecular Breeding, 2002, 9:43-51.

- [7] Walker D R, Narvel J M, Boerma H R, et al. A QTL that enhances and broadens *Bt* insect resistance in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109:1051-1057.
- [8] 卫剑文, 许新萍, 陈金婷, 等. 应用 *Bt* 和 *SBTi* 基因提高水稻抗虫性的研究[J]. 生物工程学报, 2000, 16(5):603-608. (Wei J W, Xu X P, Chen J P, et al. Research on improving rice resistance to the pest by *Bt* and *SBTi* genes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2000, 16(5):603-608.)
- [9] Rector B G, All J N, Parrott W A, et al. Identification of molecular markers linked to quantitative trait loci for soybean resistance to corn earworm[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 96: 786-790.
- [10] Rector B G, All J N, Parrott W A, et al. Quantitative trait loci for antixenosis resistance to corn earworm in soybean[J]. Crop Science, 1999, 39: 531-538.
- [11] Rector B G, All J N, Parrott W A, et al. Quantitative trait loci for antibiosis resistance to corn earworm in soybean[J]. Crop Science, 2000, 40:233-238.
- [12] Narvel J M, Walker D R, Rector B G, et al. A retrospective DNA marker assessment of the development of insect resistant soybean [J]. Crop Science, 2001, 41:1931-1939.
- [13] Ortega M A, All J N, Boerma H R, et al. Pyramids of QTLs enhance host-plant resistance and *Bt* mediated resistance to leaf chewing insects in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2016, 129:703-715.
- [14] Zhu S, Walker D R, Boerma H R, et al. Effects of defoliating insect resistance QTLs and a *cryIac* transgene in soybean near-isogenic lines[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 116: 455-463.
- [15] Zhu S, Walker D R, Boerma H R, et al. Fine mapping of a major insect resistance QTL in soybean and its interaction with minor resistance QTLs[J]. Crop Science, 2006, 46:1094-1099.
- [16] Parrott W, Walker D, Zhu S, et al. Genomics of insect-soybean interactions[M]//Stacey G. Genetics and genomics of soybean. New York: Springer Science + Business Media, LLC, 2008: 269-291.
- [17] Zhu S, Saski C A, Boerma H R, et al. Construction of a BAC library for a defoliating insect-resistant soybean and identification of candidate clones using a novel approach[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2009, 27:229-235.
- [18] Komatsu K, Okuda S, Takahashi M, et al. Antibiotic effect of insect-resistant soybean on common cutworm (*Spodoptera litura*) and its inheritance[J]. Breeding Science, 2004, 54: 27-32.
- [19] Komatsu K, Okuda S, Takahashi M, et al. QTL mapping of antibiosis to common cutworm (*Spodoptera litura* Fabricius) in soybean [J]. Crop Science, 2005, 45:2044-2048.
- [20] Oki N, Komatsu K, Sayama T, et al. Genetic analysis of antixenosis resistance to the common cutworm and its relationship with pubescence characteristics in soybean[J]. Breeding Science, 2012, 61: 608-617.
- [21] 崔章林, 盖钧铨, 吉东风, 等. 大豆种质资源对食叶性害虫抗性的鉴定[J]. 大豆科学, 1997, 16(2):93-102. (Cui Z L, Gai J Y, Ji D F, et al. Evaluation of soybean germplasm for resistance to leaf-feeding insects [J]. Soybean Science, 1997, 16(2): 93-102.)
- [22] 王慧, 喻德跃, 吴巧娟, 等. 大豆对斜纹夜蛾抗生性基因的卫星标记 (SSR) 的研究[J]. 大豆科学, 2004, 23(2): 91-95. (Wang H, Yu D J, Wu Q J, et al. Characterization of resistance genes to cotton cutworm with SSR markers in soybean [J]. Soybean Science, 2004, 23(2):91-95.)
- [23] 刘华, 王慧, 李群, 等. 大豆对斜纹夜蛾抗性的遗传分析及相关 QTL 的定位[J]. 中国农业科学, 2005, 38(7): 1369-1372. (Liu H, Wang H, Li Q, et al. Inheritance analysis and mapping QTLs related to cotton worm resistance in soybeans [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(7): 1369-1372.)
- [24] 付三雄, 王慧, 吴娟娟, 等. 应用重组自交系群体定位大豆抗虫 QTL[J]. 遗传, 2007, 29(9): 1139-1143. (Fu S X, Wang H, Wu J J, et al. Mapping insect resistance QTLs of soybean with RIL population[J]. Hereditas, 2007, 29(9): 1139-1143.)
- [25] Kim H, Xing G N, Wang Y F, et al. Constitution of resistance to common cutworm in terms of antibiosis and antixenosis in soybean RIL populations[J]. Euphytica, 2014, 196:137-154.
- [26] Thornsberry J M, Goodman M M, Doebley J, et al. *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time[J]. Nature Genetics, 2001, 28:286-289.
- [27] 王慧, 高中杰, 张丹, 等. 应用关联分析鉴定大豆对斜纹夜蛾的抗性基因[J]. 植物学报, 2011, 46(5): 514-524. (Wang H, Gao Z J, Zhang D, et al. Identification of genes with soybean resistance to common cutworm by association analysis[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2011, 46(5):514-524.)
- [28] Wang H, Yan H L, Du H P, et al. Mapping quantitative trait loci associated with soybean resistance to common cutworm and soybean compensatory growth after defoliation using SNP marker-based genome wide association analysis [J]. Molecular Breeding, 2015, 35:168.
- [29] Kim H, Xing G N, He J B, et al. An environmental differential association analysis of antibiosis to common cutworm in a Chinese soybean germplasm population and optimization of the cross design [J]. Molecular Breeding, 2015, 35:76.
- [30] Terry L I, Chase K, Jarvik T, et al. Soybean quantitative trait loci for resistance to insects[J]. Crop Science, 2000, 40: 375-382.
- [31] Terry L I, Chase K, Orf J, et al. Insect resistance in recombinant inbred soybean lines derived from non-resistant parents[J]. Entomologia Experimentalis and Applicata, 1999, 91:465-476.
- [32] Wang H, Gao Z J, Liu H L, et al. Variation in *GmAOS1* promoter is associated with soybean defense against insect attack[J]. Euphytica, 2014, 196:365-374.
- [33] 吴娟娟, 吴倩, 喻德跃. 大豆丙二烯氧化物合酶基因 (*GmAOS*) 及其启动子的克隆与分析[J]. 作物学报, 2011, 37(2): 216-223. (Wu J J, Wu Q, Yu D Y. Cloning and characterization of *GmAOS* gene and its promoter in soybean (*Glycine max*) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2011, 37(2): 216-223.)
- [34] Wu J J, Wu Q, Wu Q J, et al. Constitutive overexpression of *AOS*-like gene from soybean enhanced tolerance to insect attack in transgenic tobacco[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30:1693-1698.
- [35] Wu Q, Wu J, Sun H, et al. Sequence and expression divergence of the *AOC* gene family in soybean: Insights into functional diversity for stress responses[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33:1351-1359.
- [36] Wu Q, Wang H, Wu J J, et al. Soybean *GmAOC3* promotes plant

- resistance to the common cutworm by increasing the expression of genes involved in resistance and volatile substance emission in transgenic tobaccos [J]. Journal of Plant Biology, 2015, 58: 242-251.
- [37] Lorenzo O, Chico J M, Sanchez-Serrano J J, et al. *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2004, 16:1938-1950.
- [38] Wang H, Ding C W, Du H P, et al. Identification of soybean MYC2-like transcription factors and overexpression of *GmMYC1* could stimulate defense mechanism against common cutworm in transgenic tobacco [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36: 1881-1892.
- [39] Wang Y L, Wang H, Ma Y J, et al. Identification of soybean herbivory-regulated genes and a transgenic investigation of their potential in insect resistance [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2015, 123: 321-340.
- [40] Liu S H. Volatiles from the foliage of soybean, *Glycine max*, and lima bean, *Phaseolus lunatus*: Their behavioral effects on the insects *Trichoplusia ni* and *Epilachna varivestis* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1989, 37:496-501.
- [41] Michereff M F F, Laumann R A, Borges M, et al. Volatiles mediating a plant-herbivore-natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivars [J]. Journal of Chemical Ecology, 2011, 37:273-285.
- [42] Winter T R, Rostás M. Nitrogen deficiency affects bottom-up cascade without disrupting indirect plant defense [J]. Journal of Chemical Ecology, 2010, 36:642-651.
- [43] Liu J Y, Huang F, Wang X, et al. Genome-wide analysis of terpene synthases in soybean: Functional characterization of *GmTPS3* [J]. Gene, 2014, 544:83-92
- [44] 宁爱玲, 杜海平, 喻德跃, 等. *GmAOC3* 基因转化载体构建及转化大豆的初步研究 [J]. 大豆科学, 2015, 34:588-596. (Ning A L, Du H P, Yu D Y, et al. Construction of transformation vector of *GmAOC3* gene and preliminary study on the transformation of soybean [J]. Soybean Science, 2015, 34: 588-596. )
- [45] 宁爱玲. *GmAOC3* 和 *GmMYC5* 转化大豆的初步研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014. (Ning A L. The preliminary research on transferring *GmAOC3* and *GmMYC5* into soybean [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014. )
- [46] Chiang H S, Norris D M, Ciepiela A, et al. Inducible versus constitutive PI 227687 soybean resistance to Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* [J]. Journal of Chemical Ecology, 1987, 13 (4):741-749.
- [47] Hildebrand D F, Rodriguez J G, Brown G C, et al. Peroxidative responses of leaves in two soybean genotypes injured by two spotted spider mites (*Acari: Tetranychidae*) [J]. Journal of Economic Entomology, 1986, 79(6):1459-1465.
- [48] Lin H, Kogan M, Fischer D. Induced resistance in soybean to the Mexican bean beetle (*Coleoptera: Coccinellidae*): Comparisons of inducing factors [J]. Environmental Entomology, 1990, 19(6): 1852-1857.
- [49] Stotz H U, Koch T, Biedermann A, et al. Evidence for regulation of resistance in *Arabidopsis* to Egyptian cotton worm by salicylic and jasmonic acid signaling pathways [J]. Planta, 2002, 214: 648-652.
- [50] Fan R, Wang H, Wang Y L, et al. Proteomic analysis of soybean defense response induced by cotton worm (*Prodenia litura*, Fabricius) feeding [J]. Proteome Science, 2012, 10:16.
- [51] Wang Y, Wang H, Fan R, et al. Transcriptome analysis of soybean lines reveals transcript diversity and genes involved in the response to common cutworm (*Spodoptera litura* Fabricius) feeding [J]. Plant, Cell & Environment, 2014, 37:2086-2101.
- [52] Wang Y, Wang H, Ma Y, et al. Identification of transcriptional regulatory nodes in soybean defense networks using transient co-transactivation assays [J]. Frontiers in Plant Science, 2015. 6:915.
- [53] Varshney R K, Graner A, Sorrells M E. Genomics-assisted breeding for crop improvement [J]. Trends in Plant Science, 2005, 10 (12): 621-630.
- [54] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. Nature, 2010, 463:178-183.
- [55] 陈建明, 俞晓平, 程家安, 等. 植物耐虫性研究进展 [J]. 昆虫学报, 2005, 48(2): 262-272. (Chen J M, Yu X P, Chen J A, et al. Plant tolerance against insect pests and its mechanisms [J]. Acta Entomologica Sinica, 2005, 48(2): 262-272. )
- [56] 董英山. 中国野生大豆研究进展 [J]. 吉林农业大学学报, 2008, 30(4): 394-400. (Dong Y S. Advances of research on wild soybean in China [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2008, 30(4): 394-400. )
- [57] Zhou Z K, Jiang Y, Wang Z, et al. Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33: 408-414.
- [58] Wen Z X, Ding Y L, Zhao T J, et al. Genetic diversity and peculiarity of annual wild soybean (*G. soja* Sieb. et Zucc.) from various eco-regions in China [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 119: 371-381.
- [59] Wang X Y, Chen H F, Sha A H, et al. Laboratory testing and molecular analysis of the resistance of wild and cultivated soybeans to cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) [J]. Crop Journal, 2015, 3:19-28.
- [60] Kim M Y, Lee S, Van K, et al. Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107: 22032-22037.
- [61] Li Y H, Zhou G, Ma J, et al. De novo assembly of soybean wild relatives for pan-genome analysis of diversity and agronomic traits [J]. Nature Biotechnology, 2014, 32:1045-1052.
- [62] Song Q J, Jenkins J, Jia G F, et al. Construction of high resolution genetic linkage maps to improve the soybean genome sequence assembly Glyma1.01 [J]. BMC Genomics, 2016, 17:33.