

罗布麻 DNA 导入棉花选育抗虫种质系

沈法富¹, 于元杰¹, 张学坤², 刘风珍¹, 尹承岱¹

(1 山东农业大学农学系, 泰安 271018; 2 山东省棉花研究中心, 济南 250100)

摘要: 鲁棉 6 号自花授粉 24 h 后, 利用微注射技术, 将多酚和单宁含量较高的罗布麻 DNA 导入其子房中。在高选择压力下, 利用自然虫源, 选育出了兼抗棉铃虫和棉蚜的棉花种质系 115。对 115 和亲本鲁棉 6 号进行了室内生物学测定和食物利用试验检测, 结果表明, 抗虫种质系 115 严重阻碍了棉铃虫的食物利用, 显著降低了初孵棉铃虫的存活、生长和发育。而鲁棉 6 号对棉铃虫影响较小。115 幼叶棉酚和单宁的含量分别比鲁棉 6 号增加了 90.9% 和 136.7%。

关键词: 棉花; 罗布麻; DNA; 转育; 抗虫性

中图分类号: S562.034 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(1999)04-0034-05

自 1987 年美国首次报道转 Bt 基因棉花以来, 通过改变 Bt 基因的密码子等方法, 使 Bt 毒蛋白在转基因棉株的表达量由最初占组织可溶蛋白的 0.001% 提高到 0.05%~0.10%^[1,2], 从而使转基因抗虫棉可大面积商品化种植。转 Bt 基因抗虫棉属显性单基因控制的, 仅对鳞翅目的害虫有效, 而对棉蚜和棉叶螨等其它害虫没有直接作用。另外, 单毒素基因在时间和空间上连续表达, 使棉铃虫产生抗性远比 Bt 制剂更容易。形态与生化抗虫棉是多基因控制的, 抗虫性稳定, 棉铃虫不易产生抗性。因而, 在选育 Bt 基因抗虫棉的同时, 选育形态与生化抗虫棉, 能减少棉铃虫对 Bt 产生抗毒性的机率, 使抗虫棉长期用于棉花生产。外源 DNA 直接导入植物的技术, 由于操作方便且不受植物亲缘关系的限制, 在多种植物中实现了目标性状的转移^[3~6,7,8]。Dew et 利用该技术转育了抗叶斑病的玉米^[9]。黄骏麒等将抗枯萎病的棉花导入感病棉花品种中, 实现了棉花抗枯萎病的转移^[5]。沈法富等将抗盐碱罗布麻 DNA 导入棉花, 从变异后代筛选出二个高抗盐碱的棉花新品系^[9], 并且这两个品系的抗盐性在孢子体和配子体水平上同时表达^[10]。抗盐品系 91-15 在试种过程中除表现抗盐性外, 还表现一定的抗虫性^[7]。在此基础上, 本研究继续将罗布麻的 DNA 导入鲁棉 6 号, 并设计了一套筛选抗虫棉的方案, 旨在验证罗布麻 DNA 导入鲁棉 6 号产生的抗虫变异是否可重复, 探讨选育生化抗虫棉的新方法。

1 材料和方法

受体材料为陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 品种鲁棉 6 号, 供体为罗布麻 (*Apocynum venetum* L.) 抗棉铃虫对照为 HG-BR-8, 抗蚜虫对照为非洲 E-40。

罗布麻 DNA 的提取: 参照前文的方法^[5]提取。

收稿日期: 1998-07-22

作者简介: 沈法富, 男, 1965 年生, 副教授, 硕士, 主要从事棉花遗传育种研究与遗传学教学工作。

酶解罗布麻 DNA 的制备: 将纯化罗布麻 DNA, 在其 $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 时, 用 DNA 酶解液进行酶解形成单核苷酸或寡核苷酸, 酶解后的溶液 $A_{260}/A_{280} < 1.00$, 取该溶液进行 DNA 导入。

罗布麻 DNA 的导入: 参照周光宇等的方法^[8], 将罗布麻的 DNA 导入鲁棉 6 号中, 同时导入酶解罗布麻的 DNA 和缓冲液作为对照。注射铃吐絮后以铃为单位进行收获。1991 年按处理形成 D_1 铃行植株。以单株为单位收获 D_1 种子。

抗虫变异体的田间筛选: 1992 年, 选择肥力中等, 无枯黄萎病的地块。在全生育期根据抗虫对照受虫危害情况, 进行适当化学防治。各处理 D_1 株行、亲本和抗蚜、抗棉铃虫对照均按行种植。每隔 10 行设一亲本和抗虫对照行。以自然虫源进行鉴定。分别于苗期调查苗蚜、伏期调查伏蚜。苗期以全株受虫害最重的叶片作为标准叶片, 伏期以顶部 5 叶中受害最重的叶片作为标准叶片。按方昌源等^[11]的方法划分棉花受害级别, 并计算蚜害指数减退率。二代棉铃虫调查生长点被害率, 三四代棉铃虫调查蕾铃被害率。计算顶端生长点减退率和蕾铃被害减退率。苗蚜指数减退率大于 5% 和伏蚜指数减退率大于 10% 的株行入选为抗蚜虫株行, 蕾铃受害减退率和顶端生长点减退率大于 10% 的株行入选为抗棉铃虫株行。在入选株行中, 选择虫害最轻的单株, 按株收获形成下一代鉴定株行, 重复鉴定 3 年。

抗虫种质系 115 的复测鉴定: 经过 4 年的选择, 筛选到了一个兼抗棉蚜和棉铃虫的种质系 115。在此基础上, 我们进行了室内组织饲养测定。从田间采取幼叶、茎尖、蕾和铃 4 种器官。在这些器官的基部用湿润棉球包住, 外封一层保鲜膜, 然后置于 250 mL 烧杯中, 每个烧杯接初孵幼虫 15 头, 烧杯口用封口膜封住, 并针刺小孔进行通气, 接虫 5 d 后, 调查幼虫成活数、幼虫体重以及幼虫龄数。棉铃虫营养效应的测定, 按 waldbauer 的方法^[12], 设幼叶和幼蕾两个处理, 供试棉铃虫为 4 龄幼虫, 大小基本一致。按上述方法饲养棉铃虫, 3 d 后调查食物利用率、食物转化率和近消化率。

抗虫种质系 115 的次生代谢物质测定: 单宁的测定方法为, 取同一部位的鲜叶, 烘干后, 用蒸馏水抽取, 用 Folir-Denis 的方法测定^[13]。棉酚含量的测定方法为, 在盛花期取幼叶和幼蕾, 烘干后, 研磨, 用 Smith 的方法提取, 并测定其含量^[14]。

2 结果与分析

2.1 棉花抗虫变异体的田间筛选

鲁棉 6 号自交 24 h 后, 利用微注射技术, 将罗布麻 DNA、酶解罗布麻 DNA 和缓冲液分别导入鲁棉 6 号的子房, 子房经处理后大多数发育正常, 但吐絮不畅。注射罗布麻 DNA、酶解罗布麻 DNA 和缓冲液的后代出苗率分别为 46.5%、47.8% 和 51.2%。它们比自交铃出苗率低, 但注射不同物质的铃出苗率无差异。注射罗布麻 DNA 的 D_1 收获了 874 个单株, 注射酶解罗布麻 DNA 收获了 322 个单株, 注射缓冲液的后代收获了 296 个单株, 同时选择鲁棉 6 号 120 个自交单株作为对照, 用于 D_2 田间抗虫选择。

1992 年, 收获的上述单株和抗蚜对照、抗棉铃虫对照随机排列按行种植。利用自然虫源, 按照规定的选择压力, 选择结果(表 1)表明, 在导入罗布麻 DNA 的 874 个株行中, 选择出了 5 个抗蚜株行, 4 个抗棉铃虫株行, 3 个兼抗棉铃虫和蚜虫株行, 其抗虫变异率为 1.37%。在导

入酶解罗布麻 DNA 的 322 个株行中, 仅选择出两个抗蚜株行, 抗虫变异率为 0. 62%。在注射缓冲液的 296 个株行和鲁棉 6 号自交的 120 个株行中, 均没筛选到抗虫单株。入选株行于 1993 年重复筛选, 在 1992 年导入罗布麻 DNA 选择到的 12 个抗虫株行中, 鉴定到抗蚜株行 3 个、抗棉铃虫株行 4 个, 兼抗棉铃虫和棉蚜株行 2 个、抗虫株行入选率为 75%, 比上一代显著提高, 这表明罗布麻 DNA 导入鲁棉 6 号产生的抗虫变异株是可以遗传的。导入酶解罗布麻 DNA 筛选到的 2 个抗虫单株, 在 D₂ 没有遗传, 这说明酶解罗布麻的 DNA 不能使鲁棉 6 号产生可遗传的抗虫变异。1994 年的伏蚜和 1995 年的苗蚜较轻, 没有进行抗蚜选择。1994 年棉铃虫危害较重没有进行选择。在连续 4 a 的高选择压力下, 选择出了一个兼抗棉铃虫和棉蚜的种质 115。

表 1 罗布麻 DNA 导入棉花后代的田间抗虫筛选结果

材料来源	导入罗布麻 DNA				导入酶解罗布麻 DNA		导入 缓冲液	自交铃
	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₁	D ₂		
供试株行数	874	12	9	9	322	2	296	120
苗蚜指数大于— 5% 的株行数	4	3	3	—	2	0	0	0
伏蚜指数大于— 10% 的株行数	1	0	—	1	0	0	0	0
抗二代棉铃虫株行数	1	1	—	1	0	0	0	0
抗三、四代棉铃虫株行数	3	3	—	3	0	0	0	0
兼抗棉蚜和抗棉铃虫株行数	3	2	—	1	0	0	0	0
总计抗性株行数	12	9	3	7	0	0	0	0
所占百分率(%)	1. 37	75	—	—	0. 62	0	0	0

2. 2 抗虫种质系 115 的室内复测鉴定

2. 2. 1 室内组织饲养 用鲁棉 6 号和抗虫种质系 115 的不同组织器官进行室内生物学测定。结果(表 2)表明, 抗虫种质系各器官对棉铃虫均显示出良好的抗虫性, 而受体鲁棉 6 号的各器官则比较敏感。抗虫种质系影响棉铃虫的存活、生长和发育等各个方面, 但各器官之间对棉铃虫的影响存在着显著的差异, 抗性由强到弱依次为蕾、幼铃、茎尖和嫩叶。

表 2 抗虫种质系 115 和鲁棉 6 号对棉铃虫初孵幼虫的影响

器官	品种(系)	幼虫成活率(%)	幼虫体重(mg)	幼虫龄期(龄)
嫩叶	115	67. 7±3. 5	80. 7±6. 5	3. 56±0. 22
	鲁棉 6 号	87. 5±4. 6	234. 8±18. 4	4. 88±0. 10
茎尖	115	30. 4±7. 2	6. 5±2. 7	2. 32±0. 51
	鲁棉 6 号	76. 5±7. 4	68. 5±12. 4	3. 67±0. 15
幼蕾	115	1. 7±0. 4	0. 5±0. 1	2. 01±0. 20
	鲁棉 6 号	23. 5±2. 2	14. 3±3. 5	2. 68±0. 24
幼铃	115	26. 7±4. 2	6. 7±1. 5	2. 43±0. 21
	鲁棉 6 号	67. 2±6. 7	189. 2±16. 4	3. 87±0. 15

2. 2. 2 棉铃虫营养指标测定 利用抗虫种质系 115 和鲁棉 6 号对棉铃虫的营养效应进行测定, 结果(表 3)表明, 抗虫种质系跟鲁棉 6 号相比, 降低了棉铃虫的食物近视消化率, 提高了棉铃虫的食物转化率, 而对棉铃虫的食物利用率没有影响。这表明抗虫种质系阻碍了棉铃虫的营养代谢, 而鲁棉 6 号影响较小。与幼叶相比, 幼蕾对棉铃虫营养代谢的影响显著增大。这一结果跟组织测定一致。

2 3 抗虫种质系 115 的次生物质含量

对抗虫种质系 115、鲁棉 6 号和 HG—BR—8 的棉酚和单宁含量测定结果(表 4)表明, 在

表 3 抗虫种质系对棉铃虫食物利用的影响

器官	品种(系)	食物利用率(%)	近视消化率(%)	食物转化率(%)
幼叶	115	26.75±2.35	31.07±2.14	78.15±4.12
	鲁棉 6 号	28.12±3.75	38.86±3.37	67.82±3.49
幼蕾	115	30.46±2.70	28.45±1.58	84.92±3.75
	鲁棉 6 号	31.15±2.44	35.49±1.67	76.74±3.89

相同的组织器官中, 抗虫种质系 115 棉酚的含量比鲁棉 6 号增加了 2 倍, 单宁含量增加了近 1 倍, 抗虫种质系 115 棉酚和单宁的含量比抗虫对照 HG—BR—8 还高。对于同一品系, 幼蕾棉酚和单宁含量高于幼叶。这可能是幼蕾抗虫性高于幼叶的原因。

表 4 抗虫种质系棉酚和单宁含量

器官	品(种)系	单宁(%)	棉酚(%)
幼叶	115	1.674±0.25	0.187±0.01
	鲁棉 6 号	0.877±0.13	0.079±0.01
	HG—BR—8	1.424±0.16	0.175±0.03
幼蕾	115	1.721±0.22	0.426±0.04
	鲁棉 6 号	0.931±0.07	0.201±0.03
	HG—BR—8	1.534±0.24	0.382±0.05

3 讨论

本研究将多酚、单宁含量较高的罗布麻 DNA 导入陆地棉品种鲁棉 6 号中, 在其后代中筛选出了稳定遗传的抗虫种质系 115, 它的棉酚和单宁的含量比鲁棉 6 号显著提高, 而鲁棉 6 号的自交铃以及注射酶解罗布麻 DNA 和缓冲液的棉株, 均未筛选到可遗传的抗虫变异株。这说明抗虫种质系的获得, 既不是鲁棉 6 号自身基因突变的结果, 也不是核苷酸和缓冲液的诱变作用。本研究是以前在罗布麻 DNA 导入鲁棉 6 号产生抗虫变异基础上进行的, 结果说明罗布麻 DNA 导入鲁棉 6 号产生抗虫性变异可以重复。

参考文献:

[1] Fishhoff D A, *et al.* Insect resis tant cotton plant [J]. Biotechnology, 1987, 5: 807—813.

[2] Perlark F J. *et al.* Modification of the coding sequence enhance plant expression of insect protein gene[J]. Proc. Natl. Acad. Sci(USA), 1991, 88: 3324—3328.

[3] 周光宇, 等. 农业分子育种——授粉后外源 DNA 导入植物的技术[J]. 中国农业科学, 1988, 21(3): 1—6

[4] 谢道昕, 等. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得的转基因植株 [J]. 中国科学(B), 1991, (4): 367—373

[5] 黄骏麒, 等. 外源抗枯萎病棉花 DNA 导入感病棉花的抗性转移[J]. 中国农业科学, 1986, 19(3): 32—

36.

- [6] 沈法富, 等. 抗盐碱罗布麻 DNA 导入棉花的研究[J]. 棉花学报, 1995, 7(1): 18—21.
- [7] 尹承伦. 麦棉分子育种[M]. 成都: 四川科技出版社, 1994.
- [8] Zhou G Y. *et al*. Introduction of exogenous DNA into cotton embryo[J]. Method in Enzymology, 1992 (101): 433—488.
- [9] Dewet J I M. The experimental manipulation of ovules tissue[M]. published by longman Inc, NY, 1983.
- [10] 沈法富, 等. 棉花植株和花粉耐盐鉴定[J]. 作物学报, 1997, 23(5): 620—625.
- [11] 方昌源, 等. 棉花品种对棉蚜和棉铃虫的抗性鉴定[J]. 棉花学报, 1991, 3(2): 77—84.
- [12] Waldbauer G P. The consumption and utilization of food by insects[J]. Adv. Insect physiology 1968, 5: 229—288.
- [13] 严国光. 农业仪器分析[M]. 北京: 农业出版社, 1982, 319—320.
- [14] Smith F H. Determination of gossypol in leaves and flower buds of *Gossypium*[J]. J Am Oil Chem Soc. 1967, (4): 267—269.

Insect Resistant Stock Selected by Introducing Dogbane DNA into Cotton

SHEN Fa-fu¹, YU Yuan-jie², ZHANG Xue-kun², LIU Feng-zhen¹, YIN Cheng-yi¹

(1 Department of Agronomy, Shangdong Agricultural University, Taian, 271018;

2 Cotton Research Center of Shangdong, Jinan)

Abstract: After self-pollination twenty four hours, the exogenous dogbane (*A. Venetum* L.) DNA was introduced into ovaries of variety lumian 6 (*G. hirsutum*) by injection method. In high selection stress, the second generation was screened for insect resistant by using natural insect. The stock 115 with resistance to bollworm and aphid was selected. Laboratory bioassay and food utilization of bollworm were used to test 115 and lumian 6. The results showed that leaf square and small boll of 115 highly inhibited food utilization of cotton bollworm, and significantly reduced larval survival, growth and development, whereas the effect was small in lumian 6. Contents of gossypol and tani in leaf of 115 were 90.9% and 136.7% as much as that of Lumian 6.

Key words: Cotton; Dogbane; DNA; Gene transfer; Insect resistant