

转外源凝集素基因棉花对棉蚜的抗性鉴定

肖松华¹, 刘剑光¹, 吴巧娟¹, 狄佳春¹, 许乃银¹, 陈旭升¹, 柏立新²

(1. 江苏省农业科学院经济作物研究所, 南京 210014;

2. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014)

摘要:转外源凝集素基因棉花工程植株在蚜虫发生期稳定地表现出抗蚜性状, 转化一代群体抗、感植株分离比例符合 3 : 1, 抗蚜基因是以单一位点整合到棉花染色体组中。经过 4 个世代的抗蚜鉴定、自交纯合和选择, 获得遗传组成纯合的转基因抗蚜虫棉花新品系。对 3 个转外源凝集素基因棉花品系、2 个形态抗蚜品种(系)和 6 个常规品种(系)进行抗蚜性鉴定。结果表明, 3 个转外源凝集素基因品系对棉蚜的抗性均达到高抗水平; 川抗 77 在生育期内均中抗棉蚜, 川棉 109 在苗蚜期和恢复期感蚜, 而在伏蚜期中抗棉蚜; 6 个常规品种(系)皆高感棉蚜。利用三种接蚜处理对不同类抗蚜品种(系)进行鉴定的结果相同, 繁殖行间自然传播蚜虫省略人工接蚜环节, 是开展转基因棉花抗蚜性鉴定的一种简便、高效的方法。

关键词:棉花; 转基因; 外源凝集素基因; 抗蚜鉴定

中图分类号: S435.622 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2005)02-0072-07

Identification of *Aphis (Aphis gossypii Glover.) Resistant of Cotton (Gossypium hirsutum L.) with Trans-exogenous Agglutinin Gene*

XIAO Song-hua¹, LIU Jian-guang¹, WU Qiao-juan¹, DI Jia-chun¹, XU Nai-yin¹, CHEN Xu-sheng¹, BAI Li-xin²

(1. *Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*; 2. *Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*)

Abstract: During aphid occurring period, aphid-resistant character can express stably in engineering plants of trans-exogenous agglutinin gene cotton. The segregation proportion of the first transformed generation population accords with 3 : 1, the aphid-resistant gene is integrated into cotton genome with single locus. New varieties of transgenic cotton resistant to aphid can be obtained by successive with identification, selfing and selection through four generations. With the experimental materials of three cotton varieties with trans-exogenous agglutinin gene, two morphological aphid-resistant cultivars and six conventional cultivars, identification on transgenic cotton resistant to aphid are dealt with in this study. The results indicated that three transgenic varieties are highly resistant to aphid, Chuan-kang 77 is in the middle level of resistance to aphid during growth and development periods, Chuan-mian 109 is sensitive to aphid in seedling stage and recovery stage, but expresses middle resistance in midsummer stage, six conventional cultivars are highly susceptible. The results are same through three different kinds of aphid transferred pathway using two different kinds of varieties resistant to aphid, one being transgenic, the other being morphological. Identification on transgenic cotton resistance to aphid in net-room overcomes randomness of aphid distribution in field identification and limitation of small acreage in greenhouse identification, with better repeat and higher differentiation than

收稿日期: 2004-06-29 作者简介: 肖松华(1964-), 男, 副研究员, 硕士, njxsh@sina.com

基金项目: 江苏省“十五”农业高技术项目(BG2002305)

others. Natural immigration between its reproductive rows is a convenient and high efficiency pathway for aphid transference in resistance identification, because the program of aphid manual transference was omitted in this pathway.

Key words: cotton(*Gossypium hirsutum* L.); transgene; exogenous agglutinin gene; identification for resistance to aphid

20 世纪 70 年代我国将棉花抗虫育种列入国家攻关计划,育成一批具有形态抗性或生化抗性的品种,并建立了针对棉蚜、棉铃虫、红铃虫和棉叶螨四种靶标害虫的抗虫性鉴定方法。1986 年中国农业科学院棉花研究所等单位根据已有的研究成果,制定了棉花种质资源抗棉蚜鉴定的统一方法^[1]。随后由于耕作栽培措施的演替、气候条件的变化导致棉蚜消长动态发生改变,马丽华等对棉花抗蚜性鉴定方法及分级标准进行了修订^[2]。

随着转 Bt 基因抗棉铃虫棉花的成功研制,分离外源抗蚜虫基因并导入棉花,已成为目前棉花基因工程研究的主攻方向之一。新疆农业大学^[3]、江苏省农业科学院^[4]、新疆农业科学院^[5]等单位曾先后报道获得转基因抗蚜虫棉花。棉蚜的发生量与气候条件密切相关,在自然状态下鉴定育种材料的抗蚜性时,鉴定结果易受气候条件的影响。为了减少利用自然虫源进行抗蚜鉴定的盲目性,“九五”期间江苏省农业科学院建立并采用了“棉花温室单株抗蚜性鉴定方法”^[6],对转天南星凝集素基因棉花和转半夏凝集素基因棉花工程株及其自交后代进行抗蚜性鉴定,培育出抗蚜

性状稳定遗传的棉花新品系。鉴于冬季温室抗蚜性鉴定存在规模小、虫源繁殖保存困难的缺陷,2002—2003 年在试验田内建立人工网室,根据棉蚜生长习性创造适合其繁殖的环境条件,对转外源凝集素基因棉花品系进行抗蚜性鉴定。并设立三种不同的接蚜方式,研究简便、快速、高效和重复性好的棉花抗蚜性鉴定方法,为转外源抗蚜基因棉花的抗虫性鉴定提供技术支持,现将试验结果总结如下。

1 材料与方 法

1.1 供试材料及特性

试验分两个阶段,第一阶段于 1999—2002 年在江苏省农业科学院温室内进行,供试材料为新陆中 T、苏棉 8 号、徐州 219 和其转外源凝集素基因棉花工程植株及自交后代(表 1)。第二阶段于 2002—2003 年在江苏省农业科学院植物保护研究所试验场进行,供试材料 11 份,其中常规品种(系)6 个,形态抗蚜品种(系)2 个,转基因抗蚜品系 3 个,B8、B86 表示半夏凝集素基因,T7 表示天南星凝集素基因。

表 1 棉花转基因工程植株抗蚜虫鉴定所引用的材料

Table 1 Materials used in the identification

| 品种(系)名称 | 抗蚜特性 | 品种来源 | 提供单位 |
|---------|-------|------------|-------------|
| 新陆中 T | 感 | 常规品种 | 新疆农业大学 |
| 苏抗 201 | 转基因抗性 | 新陆中 T+B8 | 江苏省农科院经作所 |
| 苏棉 8 号 | 感 | 常规品种 | 江苏省太仓棉花原种场 |
| 苏抗 208 | 转基因抗性 | 苏棉 8 号+B86 | 江苏省农科院经作所 |
| 徐州 219 | 感 | 常规品种 | 江苏省徐州市农科所 |
| 苏抗 219 | 转基因抗性 | 徐州 219+T7 | 江苏省农科院经作所 |
| 川棉 109 | 形态抗性 | 常规品种 | 四川省农科院棉花所 |
| 川抗 77 | 形态抗性 | 常规品种 | 四川省农科院棉花所 |
| 华棉 2 号 | 感 | 常规品种 | 江苏农垦大华种子分公司 |
| 渝棉 1 号 | 感 | 常规品种 | 江苏省农林厅科腾公司 |
| 苏 7235 | 感 | 常规品种 | 江苏省农科院经作所 |

1.2 人工网室的建立

在试验田选择排灌方便的地块,建立人工网室。主体为塑钢结构,顶部为半椭圆形,在钢架外侧先罩上尼龙网,防止其它害虫和蚜虫天敌的干扰。在尼龙网的外表覆盖厚度为1 mm的塑料薄膜,在人工网室的两端各设立一个2 m×1 m矩形结构门。夏初遇到较高气温时,通过卷膜装置将两侧的塑料薄膜卷起,形成空气对流通道降低室内温度;盛夏季节将整体的塑料薄膜去除,实现最大限度的降温;秋季重新将塑料薄膜覆盖,增温防雨提高秋蚜发生量。主要原理是通过塑料薄膜的增温、遮雨作用和尼龙网的隔离作用,确保蚜虫的繁殖和抗蚜鉴定不受环境条件的影响。

1.3 鉴定时期与种植方式

根据危害棉花的时期不同,可将蚜虫分为苗蚜、伏蚜和秋蚜,其中以苗蚜危害最重,对棉株生长发育影响最大,因而鉴定工作以苗蚜期为主,伏蚜期和秋蚜期为辅。于4月中旬在人工网室内采用直播的方式种植常规品种繁殖蚜虫,行距1 m,子叶展平后从温室收集棉蚜均匀接到幼嫩的棉苗上。供试材料于4月中旬采用营养钵育苗,5月中旬将2~3叶期的参试棉苗,移栽到人工网室内,每份材料种12行,分别进行不同的接蚜处理。

1.4 接蚜处理的设置

棉蚜在其生活周期中会出现两种形态:若蚜(无翅蚜)和成蚜(有翅蚜)。“九五”期间就分别接若蚜、成蚜和混合蚜对蚜虫发生量及棉花抗蚜性鉴定结果的影响进行研究,明确这三种接蚜途径的鉴定效果相同,筛选出简便高效的接蚜途径是搭叶接混合蚜^[6]。本研究设立三种接蚜处理:(1)毛笔接混合蚜;(2)搭叶接混合蚜;(3)蚜虫繁殖行间栽种供试材料自然传播棉蚜;其中处理(1)、(2)单株接蚜量40头。每个处理4行区。

1.5 鉴定方法

在对棉花转基因工程植株及其自交后代进行抗蚜鉴定时,采用营养钵育苗,将同一转基因组合通过标记基因如卡那霉素抗性(Km⁺)基因检测,确定为阳性的植株栽入温室同一水泥池内,3叶期实施接蚜处理。分别于5叶期、7叶期统计单株载蚜量,逐叶调查蚜害症状,形成单株蚜害指数。对棉株生长正常,无任何蚜害症状(如无头苗、真叶畸形、新生叶卷曲表现)的植株挂牌编号,花铃期重点调查挂牌植株的抗蚜性。温室棉花抗蚜性鉴定参照肖松华等^[6]介绍的方法。

在对转外源凝集素基因棉花品系进行抗蚜性鉴定时,采用营养钵育苗,供试材料移栽活棵、普遍达到3叶期进行接蚜处理,于5叶期(苗蚜发生高峰期)、7叶期(苗蚜危害恢复期)及伏蚜期调查棉花蚜害级别,鉴定各参试品种(系)对棉蚜的抗性。调查时随机抽样40株,苗蚜期调查以全株受害最重叶片为标准叶,其它时期均以棉株顶部5叶中受害最重叶片为标准叶。以受体品种为对照,计算蚜害指数及其比对照减退率。

蚜害分级标准^[7]为:0级,无蚜虫,叶片平展;Ⅰ级,有蚜虫,叶片无受害;Ⅱ级,有蚜虫,叶片皱缩或微卷,未达半圆;Ⅲ级,有蚜虫,叶片卷曲达半圆或半圆以上,呈瓢形;Ⅳ级,有蚜虫,叶片完全卷曲,呈球型。

蚜害指数及其比对照减退率计算公式为:

$$\text{蚜害指数}(I) = \frac{\sum(\text{各级蚜害株数} \times \text{相应级数})}{\text{调查总株数} \times 4}$$

$$\text{蚜害指数减退率}(D) = \frac{\text{对照品种蚜害指数} - \text{鉴定品系蚜害指数}}{\text{对照品种蚜害指数}}$$

2 结果与分析

2.1 棉花转基因工程植株及其自交后代的抗蚜性鉴定

在棉花抗蚜虫基因工程研究中,以卡那霉素抗性基因作为标记基因,与外源凝集素基因融为一体,通过限制性核酸内切酶酶切位点的互补,将融合基因连接到表达载体上,然后利用转基因技术将融合基因导入棉花,获得转外源凝集素基因棉花工程植株。

经过卡那霉素抗性检测确定为阳性的植株移入温室,同一转基因组合的阳性株栽入同一水泥池内,以受体品种作为对照,采用人工搭叶接混合蚜进行抗蚜鉴定。转基因组合(徐州219+T7)工程植株抗蚜性鉴定结果(表2)表明,同一组合不同阳性株之间在单株蚜虫着生量、蚜害指数、蚜指减退率和抗级方面存在明显差异,一些植株如苏抗219-3、苏抗219-8、苏抗219-10、苏抗219-18、苏抗219-19对棉蚜表现为高抗,另一些植株如苏抗219-4、苏抗219-15、苏抗219-26对棉蚜的抗性仅达到中抗水平,其原因与外源凝集素基因在棉花染色体上的整合位点不同有关。苗蚜期和恢复期鉴定结果的一致,说明外源凝集素基因在棉株体内能够稳定地表现出抗蚜性。

表 2 转基因组合不同阳性植株抗蚜性鉴定结果

Table 2 Identification of resistance to aphid from various positive plants in the same transgenic combination

| 单株代码 | 苗蚜期 | | | | 恢复期 | | | |
|-----------|--------|-------|-----------|----|--------|-------|-----------|----|
| | 单株蚜量/头 | 蚜指 | 减退率 /% | 抗级 | 单株蚜量/头 | 蚜指 | 减退率 /% | 抗级 |
| 苏抗 219-3 | 64.3 | 8.64 | 87.47 | HR | 36.5 | 6.88 | 88.48 | HR |
| 苏抗 219-4 | 126.7 | 53.29 | 22.74 | MR | 89.7 | 40.37 | 32.40 | MR |
| 苏抗 219-8 | 75.0 | 10.55 | 84.70 | HR | 42.3 | 8.61 | 85.58 | HR |
| 苏抗 219-10 | 82.9 | 12.35 | 82.09 | HR | 39.2 | 9.34 | 84.36 | HR |
| 苏抗 219-15 | 119.6 | 49.68 | 27.97 | MR | 75.4 | 35.92 | 39.85 | MR |
| 苏抗 219-18 | 86.6 | 13.06 | 81.06 | HR | 45.8 | 9.97 | 83.31 | HR |
| 苏抗 219-19 | 57.5 | 7.20 | 89.56 | HR | 28.6 | 6.05 | 89.87 | HR |
| 苏抗 219-26 | 123.2 | 51.53 | 25.29 | MR | 68.0 | 32.40 | 45.75 | MR |
| 徐州 219 | 245.2 | 68.97 | - | - | 189.5 | 59.72 | - | - |

注:苗蚜期、恢复期的单株蚜量和蚜指分别是该时期连续三次调查的平均值。

对每个转基因组合中鉴定出的高抗蚜虫工程植株(T_0)进行自交,获得转化一代(T_1)。在 T_1 代苗期群体中,通过标记基因检测和抗蚜鉴定,发现两个方面的试验结果高度一致,即卡那霉素反应的阳性株就是转凝集素基因抗蚜虫植株,阴性

株就是感蚜虫植株。群体中抗蚜植株与感蚜植株的分离比例接近 3:1(表 3),表明在大多数情况下,外源凝集素基因是以单一位点整合到棉花染色体组中。

表 3 转凝集素基因棉花工程植株自交一代群体分离情况

Table 3 Segregation of the first selfing generation from exogenous agglutinin transgenic plant in cotton

| 自交群体 | 抗蚜植株 | 感蚜植株 | χ^2 | 概率 |
|------------|------|------|-----------|-----------|
| 苏抗 201-6⊗ | 125 | 46 | 0.25(3:1) | 0.75~0.50 |
| 苏抗 201-13⊗ | 132 | 35 | 1.25(3:1) | 0.25~0.10 |
| 苏抗 201-19⊗ | 193 | 62 | 0.03(3:1) | 0.90~0.75 |
| 苏抗 208-4⊗ | 147 | 50 | 0.00(3:1) | >0.90 |
| 苏抗 208-10⊗ | 99 | 31 | 0.04(3:1) | 0.90~0.75 |
| 苏抗 208-18⊗ | 126 | 38 | 0.20(3:1) | 0.75~0.50 |
| 苏抗 219-3⊗ | 221 | 69 | 0.17(3:1) | 0.75~0.50 |
| 苏抗 219-8⊗ | 152 | 58 | 0.64(3:1) | 0.50~0.25 |
| 苏抗 219-10⊗ | 243 | 79 | 0.02(3:1) | 0.90~0.75 |
| 苏抗 219-19⊗ | 189 | 67 | 0.13(3:1) | 0.75~0.50 |
| 总计 | 1627 | 535 | 0.06(3:1) | 0.90~0.75 |

由于外源凝集素基因在棉株体内表现为单基因显性遗传,转基因工程植株(T_0)具有杂合的抗蚜基因型(Rr),转化一代(T_1)群体抗、感蚜表现型的分离比例符合 3:1,其中基因型 RR:Rr:rr 的分离比例为 1:2:1。在 T_1 群体中分株收获高抗蚜虫植株的自交种子,获得转化二代(T_2)。

将转化二代种植成小区,苗期进行卡那霉素抗性检测和抗蚜性鉴定,一部分小区 T_2 代所有植株兼抗卡那霉素和棉蚜,整齐一致,无卡那霉素阴性反应和感蚜植株出现,表明这些转基因后代在抗蚜基因位点上已经纯合,可应用于抗蚜育种

实践;另一部分小区出现抗、感蚜植株的分离,比例接近 3:1,但卡那霉素显色反应与抗蚜性鉴定结果相吻合,表明这部分转基因后代抗蚜基因仍然是杂合的,对抗蚜植株进行自交、分株收获留种,获得并种植转化三代(T_3),进入新一轮标记基因检测和抗蚜性鉴定。经过 4 个世代($T_0 \sim T_3$)的抗蚜鉴定、自交纯合和选择,获得遗传组成纯合的转基因抗蚜虫棉花新品系。

2.2 三种接蚜处理的抗棉蚜鉴定结果分析

以 6 个感蚜品种平均蚜指作为形态抗蚜品种的对照品种蚜指,受体品种蚜指作为相应转基因品系的对照品种蚜指。苗蚜发生高峰期(简称苗

蚜期)调查结果(表4)表明,常规品种利用行间自然传蚜的蚜害指数皆高于其它两种接蚜方式,说明经过棉苗3叶期到5叶期这段时间繁殖行蚜虫向鉴定品种(系)行的自然传播和繁殖,虫口压力完全能够满足鉴定工作的要求。转基因抗蚜虫品系利用行间自然传蚜的蚜指高于其它两种接蚜方

式的平均值,蚜指减退率介于毛笔接混合蚜和搭叶接混合蚜之间,表明苗蚜期利用行间自然传蚜能够取代人工接蚜,成为人工网室转外源凝集素基因棉花品系抗蚜性鉴定的简便、快速和高效的接虫方法。

表4 苗蚜期三种接蚜处理的抗棉蚜鉴定结果

Table 4 Identification of variety resistance to aphid in seedling stage

| 品种 | 毛笔接混合蚜 | | | 搭叶接混合蚜 | | | 行间自然传蚜 | | |
|--------|--------|-----------|----|--------|-----------|----|--------|-----------|----|
| | 蚜指 | 减退率 /% | 抗级 | 蚜指 | 减退率 /% | 抗级 | 蚜指 | 减退率 /% | 抗级 |
| 苏棉8号 | 73.51 | - | - | 72.48 | - | - | 75.60 | - | - |
| 苏抗208 | 10.28 | 86.02 | HR | 12.33 | 82.99 | HR | 11.64 | 84.60 | HR |
| 新陆中T | 68.15 | - | - | 70.67 | - | - | 72.81 | - | - |
| 苏抗201 | 12.08 | 82.27 | HR | 13.54 | 80.84 | HR | 12.77 | 82.46 | HR |
| 徐州219 | 66.34 | - | - | 69.06 | - | - | 71.92 | - | - |
| 苏抗219 | 9.70 | 85.38 | HR | 10.75 | 84.43 | HR | 11.53 | 83.97 | HR |
| 川棉109 | 57.62 | 17.82 | S | 58.96 | 16.39 | S | 59.78 | 18.36 | S |
| 川抗77 | 53.45 | 23.76 | MR | 55.48 | 21.33 | MR | 55.06 | 24.80 | MR |
| 华棉2号 | 71.53 | - | - | 69.73 | - | - | 74.52 | - | - |
| 渝棉1号 | 67.96 | - | - | 68.66 | - | - | 70.33 | - | - |
| 苏7235 | 73.14 | - | - | 72.54 | - | - | 74.14 | - | - |
| 感蚜品种平均 | 70.11 | - | - | 70.52 | - | - | 73.22 | - | - |

苗蚜危害恢复期(简称恢复期)调查结果(表5)表明,三种接蚜处理对两类抗蚜品种(系)的抗蚜性鉴定结果相同。除蚜害指数普遍下降外,抗蚜品种(系)的蚜指减退率和抗级未发生无序波动,与苗蚜期鉴定结果一致。

伏蚜期温度高,棉蚜发生量呈大幅度下降趋势。由于蚜虫取食的选择性,转基因抗蚜虫棉花植株上仅存极少量的有翅蚜和蜕皮留下的空壳,蚜害最高级为Ⅰ级;形态抗蚜品种(系)、常规品种(系)棉株顶部5叶中受害最重叶片上的蚜虫着生量不到苗蚜期的一半,蚜害最高级Ⅲ级。伏蚜期鉴定结果(表6),3个转基因抗蚜虫棉花品系对棉蚜的抗性均达到高抗水平,三种接蚜方式的鉴定结论相同;两个形态抗蚜品种对棉蚜的抗性与苗蚜期和恢复期的表现有所不同,川棉109利用三种不同接蚜方式均表现为中抗,说明随着棉株营养体的扩大以及蚜量的减少,多毛性状所发挥的抗蚜作用较苗期明显,从三个鉴定时期形态抗性品种蚜害指数和蚜指减退率的动态变化中得到体现(表4、表5、表6)。在人工网室内进行抗蚜性

鉴定,由于增温防雨作用,棉花苗期蚜虫的繁殖和扩散不受外界环境条件的影响,虫口压力远大于大田抗蚜鉴定,从而使得川棉109在苗期表现感蚜。三种接蚜方式伏蚜期对川抗77的抗蚜性鉴定结果有所不同,搭叶接混合蚜的蚜指显著低于其它两种接蚜方式,蚜指减退率明显高于其它两种接蚜方式,其原因与蚜虫的随机迁飞有关^[8]。综合苗蚜期、恢复期和伏蚜期调查结果,行间自然传蚜对不同类型抗蚜品种(系)抗蚜性鉴定的结论与其它两种方式相同,可以取代人工接蚜,用于转基因抗蚜虫棉花的抗蚜性检测。川棉109在苗蚜期和恢复期表现感蚜,伏蚜期对蚜虫的抗性达到中抗水平,而川抗77在三个鉴定时期均表现中抗蚜虫,说明两个品种对蚜虫的抗性水平存在差异。川棉109是以川抗77和江苏棉1号为亲本通过杂交育种选育而成,其茸毛密度明显低于川抗77,从而导致其抗蚜性不及川抗77。

2.3 抗级评定

根据鉴定结果,对照转基因抗蚜虫棉花对棉蚜抗性的分级标准^[6],对具有不同抗蚜特性的品

表 5 恢复期三种接蚜处理的抗棉蚜鉴定结果

Table 5 Identification of variety resistance to aphid in recovery stage

| 品种 | 毛笔接混合蚜 | | | 搭叶接混合蚜 | | | 行间自然传蚜 | | |
|--------|--------|-----------|----|--------|-----------|----|--------|-----------|----|
| | 蚜指 | 减退率 /% | 抗级 | 蚜指 | 减退率 /% | 抗级 | 蚜指 | 减退率 /% | 抗级 |
| 苏棉 8 号 | 58.62 | - | - | 62.54 | - | - | 64.82 | - | - |
| 苏抗 208 | 8.44 | 85.60 | HR | 9.83 | 84.28 | HR | 10.75 | 83.42 | HR |
| 新陆中 T | 53.78 | - | - | 59.98 | - | - | 57.76 | - | - |
| 苏抗 201 | 10.31 | 80.81 | HR | 8.66 | 85.56 | HR | 9.89 | 82.88 | HR |
| 徐州 219 | 50.96 | - | - | 57.70 | - | - | 62.80 | - | - |
| 苏抗 219 | 7.59 | 85.11 | HR | 9.02 | 84.37 | HR | 9.54 | 84.81 | HR |
| 川棉 109 | 45.03 | 18.66 | S | 48.49 | 17.73 | S | 52.38 | 14.77 | S |
| 川抗 77 | 36.26 | 34.50 | MR | 40.56 | 31.18 | MR | 38.67 | 37.08 | MR |
| 华棉 2 号 | 56.85 | - | - | 60.85 | - | - | 62.63 | - | - |
| 渝棉 1 号 | 52.64 | - | - | 56.70 | - | - | 58.02 | - | - |
| 苏 7235 | 59.32 | - | - | 55.86 | - | - | 62.75 | - | - |
| 感蚜品种平均 | 55.36 | - | - | 58.94 | - | - | 61.46 | - | - |

表 6 伏蚜期三种接蚜处理的抗棉蚜鉴定结果

Table 6 Identification of variety resistance to aphid in midsummer stage

| 品种 | 毛笔接混合蚜 | | | 搭叶接混合蚜 | | | 行间自然传蚜 | | |
|--------|--------|-----------|----|--------|-----------|----|--------|-----------|----|
| | 蚜指 | 减退率 /% | 抗级 | 蚜指 | 减退率 /% | 抗级 | 蚜指 | 减退率 /% | 抗级 |
| 苏棉 8 号 | 28.32 | - | - | 32.60 | - | - | 35.67 | - | - |
| 苏抗 208 | 3.61 | 87.25 | HR | 4.75 | 85.43 | HR | 5.02 | 85.93 | HR |
| 新陆中 T | 35.08 | - | - | 37.28 | - | - | 42.61 | - | - |
| 苏抗 201 | 7.75 | 77.91 | R | 6.56 | 82.40 | HR | 8.43 | 80.22 | HR |
| 徐州 219 | 30.84 | - | - | 27.82 | - | - | 35.88 | - | - |
| 苏抗 219 | 2.97 | 90.34 | HR | 3.19 | 88.53 | HR | 4.52 | 87.40 | HR |
| 川棉 109 | 23.45 | 25.96 | MR | 25.81 | 20.27 | MR | 28.50 | 24.78 | MR |
| 川抗 77 | 18.68 | 41.02 | MR | 15.75 | 51.34 | R | 20.69 | 45.39 | MR |
| 华棉 2 号 | 33.54 | - | - | 28.96 | - | - | 37.53 | - | - |
| 渝棉 1 号 | 29.52 | - | - | 32.34 | - | - | 34.78 | - | - |
| 苏 7235 | 32.70 | - | - | 35.22 | - | - | 40.84 | - | - |
| 感蚜品种平均 | 31.67 | - | - | 32.37 | - | - | 37.89 | - | - |

种(系)进行抗级评定。结果表明,3个转基因品系在三个鉴定时期均表现为高抗棉蚜(表4、表5、表6),其中以苏抗208和苏抗219的抗性表现突出,随着棉花生长发育进程的延续,蚜指减退率逐步提高。形态抗蚜品种(系)川抗77稳定表现中抗棉蚜,川棉109苗蚜期、恢复期表现感蚜、伏蚜期中抗棉蚜,表明我国现有的形态抗蚜品种(系)对棉蚜的抗性仅达到中、低抗水平,这一结论与以往的研究基本一致^[7]。利用转外源凝集素基因抗蚜虫棉花品系作为亲本,开展杂交育种将是今后棉花抗虫育种的主攻方向之一。

2.4 抗蚜品种(系)人工网室鉴定的抗性表现

使用人工网室进行抗蚜鉴定,棉蚜的发生不受降雨过程的影响,虫口压力远高于大田鉴定,因而能够真实地反映供试品种的抗性水平。转外源凝集素基因棉花品系苏抗201、苏抗208和苏抗

219在棉蚜发生的主要时期均稳定表现高抗棉蚜,充分显示出转基因抗性的优势。形态抗蚜品种川棉109在人工网室鉴定过程中,苗蚜期、恢复期都表现感蚜,而在伏蚜期中抗棉蚜。在以前的大田鉴定过程中,对照传统的棉花抗蚜性鉴定方法及分级标准,川棉109对棉蚜的抗性在苗蚜期为Ⅱ级(抗),恢复期为Ⅲ级(中抗),伏蚜期为Ⅰ级(高抗)^[7],说明传统的抗蚜分级标准低于转基因抗蚜虫棉花对棉蚜抗性的分级标准^[6],该品种的抗性水平随着蚜虫发生量的减少而逐步提高,采用人工网室鉴定和大田鉴定所得到的结果基本一致。川抗77由于叶片上所着生的茸毛密度高,整个生育期稳定表现中抗棉蚜,表明我国所培育的形态抗性品种(系)已经不适应棉蚜发生量逐渐增大的趋势,将被转外源凝集素基因抗蚜虫棉花品种所取代。

3 讨论

3.1 提高重复性是建立转外源凝集素基因棉花抗蚜虫鉴定技术的前提

传统的抗虫育种在进行抗蚜鉴定时,以田间自然虫源鉴定为主,室内饲喂蚜虫接虫鉴定为辅,抗蚜鉴定结果易受环境条件的影响。遇到苗期多雨的年份,蚜虫发生量少,无法鉴别抗蚜和感蚜材料。利用外源基因导入改良棉花抗蚜性状,必须在传统抗蚜鉴定方法的基础上,建立一种年份间重复性好的方法。只有这样才能在转化当代将高抗蚜虫的转基因工程植株鉴定出来。由于在大多数情况下,外源抗蚜基因是以单一位点整合到棉花染色体组中,T1代及后续世代群体中的抗蚜基因尚未纯合,必须借助标记基因检测和抗蚜性鉴定甄别抗蚜植株。与大田鉴定相比,网(温)室鉴定受外界环境条件的影响小,重复性高。然而温室面积小,鉴定工作只能在冬季和春季内进行,棉花生长季节较短,种子成熟度不够;若将鉴定的抗蚜株移入钵钵,棉苗不易成活,且栽培管理工作比较繁琐。使用人工网室进行抗蚜鉴定比较灵活,可根据试验规模确定网室制作的规格和数量,利用塑料薄膜的调温、防雨作用和尼龙纱网的隔离作用,确保抗蚜鉴定工作不受环境条件的影响。

3.2 简便高效的接蚜途径是建立转外源凝集素基因棉花抗蚜虫鉴定技术的关键

蚜虫个体小,繁殖速度快,迁飞活动频繁。传统抗蚜鉴定利用田间自然虫源,由于蚜虫发生的随机性,各供试品种(系)所承受的虫口压力不同,导致鉴定结果与真实情况不符。针对上述缺陷,“九五”期间我们在温室进行棉花单株抗蚜性鉴定时,采用搭叶接混合蚜的方式^[9],对少量的转基因组合而言,这种方法能够将相同数量的蚜虫均匀

地接种到每一棵待鉴定的棉苗上,在相同的虫口压力下检验供试材料的抗虫性。当需要鉴定的棉苗数量较多时,人工统计蚜虫数量剪叶接虫,工作量繁重,无法在短时间内实现处理的一致性,人工接蚜的方法凸现其不足之处。本研究利用人工网室进行转外源凝集素基因棉花的抗蚜虫鉴定,保证繁殖行蚜虫发生量的均匀性,利用蚜虫趋近迁飞的习性,实现鉴定行植株间蚜虫着生量的一致性。该方法省去人工接蚜的繁琐过程,大幅度地提高鉴定工作效率,经实践检验繁殖行自然传蚜是一种简便高效的接蚜途径。在鉴定工作开始前,对繁殖行植株间和行间蚜虫发生量进行均匀性调节,事关鉴定工作的成效,差异系数要求控制在10%以下。

参考文献:

- [1] 棉花种质资源抗虫鉴定协作组. 棉花种质资源抗虫鉴定方法[J]. 中国棉花, 1987, 14(2): 39-41.
- [2] 马丽华, 董双林, 吴同礼, 等. 棉花抗蚜性鉴定方法及分级标准修订[J]. 棉花学报, 1994, 6(增刊): 86.
- [3] 孟玲, 王莉萍, 何薇, 等. 转基因抗虫棉的初选和抗虫鉴定(II)[J]. 新疆农业大学学报, 2000, 23(4): 52-55.
- [4] 肖松华, 刘剑光, 黄骏麒, 等. 转基因抗蚜虫棉花新种质的培育[J]. 中国棉花, 2001, 28(3): 19-20.
- [5] 王冬梅, 孙严, 孟庆玉, 等. 新疆抗棉铃虫、蚜虫转基因棉花的初步筛选[J]. 新疆农业科学, 2001, 38(3): 153.
- [6] 肖松华, 李胜, 黄骏麒, 等. 棉花温室内单株抗蚜性鉴定方法研究[J]. 江苏农业科学, 1998, 26(3): 36-39.
- [7] 方昌源, 张慧英, 梁世珍, 等. 棉花品系对棉蚜、棉铃虫的抗性鉴定[J]. 棉花学报, 1991, 3(2): 77-84.
- [8] 于江南, 张新浩, 扬果, 等. 棉花蕾铃期棉蚜的分布型和抽样技术[J]. 中国棉花, 1997, 24(8): 17-18. ●