

药用野生稻抗稻褐飞虱鉴定与利用技术研究

秦学毅¹ 朱汝财¹ 韦素美² 武波³ 黄凤宽² 李道远¹ 唐建淮¹¹广西农业科学院水稻研究所, 广西南宁 530007; ²广西农业科学院植物保护研究所, 广西南宁 530007; ³广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004)Technique for Utilization and Identification of Resistance to Brown Planthopper in *Oryza officinalis*QIN Xue-yi¹, ZHU Ru-cai¹, WEI Su-mei², WU Bo³, HUANG Feng-kuan², LI Dao-yuan¹, TANG Jian-huai¹¹Institute of Crop Genetic Resources, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; ²Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; ³College of Life Science & Technology, Nanning 530004, China)

Abstract: Three immune and 89 highly resistant wild rice materials to brown planthopper were selected from 198 tested collections of *O. officinalis*. Genetic analysis indicated that the inheritance to brown planthopper was conditioned by a pair of dominant gene. When *Oryza officinalis* with high resistance to brown planthopper was crossed with *O. sativa* by routine breeding and biotechnique with different hybridization ways and varieties, F₁ hybrids could be achieved by embryo rescue technique, and the resistance gene of *O. officinalis* was introgressed into *O. sativa* by backcrossing and inbred. Exogenous DNA of the resistance of *O. officinalis* could be also introduced into *O. sativa* by the technique of pollen tube passage way, and some offsprings were obtained.

Key words: *Oryza officinalis*; resistance to insect pest; brown planthopper; inheritance; distant hybridization

摘要: 从 198 份药用野生稻资源中筛选出一批广谱高抗褐飞虱抗源(其中 3 份为免疫级)并对这些抗源进行了抗性遗传研究。研究结果表明其抗性是受一对显性基因控制的。通过离体幼胚培养获得绿苗,经过多代回交和自交,成功地将抗性基因转移到栽培稻中,获得了高世代(B₄F₅)株系。同时利用外源 DNA 花粉管导入法对药用野生稻广谱高抗褐飞虱基因导入栽培稻进行了研究,获得了具有某些性状的后代。

关键词: 药用野生稻; 抗性; 褐飞虱; 遗传; 远缘杂交

中图分类号: S326; S332.3; S511.034

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2004)06-0573-04

稻褐飞虱(*Nilaparvata lugens* Stål)是我国南方水稻产区的最主要害虫之一,由于它具有很强的迁飞能力,适应性很强,广西稻区由原来主要受生物型 I 为害,演变为现在的生物型 II、越南九龙江型、湄公河型等多种混合型的为害。一般的水稻品种很难抵御其毁灭性的威胁,而大量施用农药,不但增加成本,且造成环境污染^[1]。因此,在水稻生产上急需广谱高抗品种,而抗性品种培育又受到抗源的影响。在目前所发现的 14 个抗源基因中,多数不具备广谱高抗能力,且抗性对生物型的专化作用明显,如 *Bph1* 抗生物型 I, *bph2* 抗生物型 II, *Bph5* 抗孟加拉型, *bph9* 抗南印度生物型等,由此可见,具有广谱抗性基因的抗源对培育水稻抗性新品种尤为重要。

药用野生稻(*Oryza officinalis* Wall.)是我国 3 种野生稻之一,主要分布在广东、广西、云南三省,多生长在山冲沿小溪旁的杂草中,由于长期生长在恶劣的自然条件下,经受了各种自然灾害和不良环境的自然选择,抗逆性较强。因此,许多国家都希望从这些野生资源中发掘新的抗源,特别是获得具有广谱抗性的抗源。但是,药用野生稻属 CC 染色体组,与 AA 染色体组的栽培稻不同源,杂交不结实,严重影响了对该资源的利用。本研究是在抗性鉴定的基础上对其抗源进行深入的遗传研究,了解其抗性机制,探讨有效的利

用途径,对今后有效地利用药用野生稻具有重大意义^[2]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收集广西各地的药用野生稻(*Oryza officinalis* Wall.) 198 份,不同生物型的感虫对照种 TN1、抗虫对照种 ASD7 为水稻供试材料。所用的褐飞虱为生物型 II、孟加拉型和越南九龙江生物型。

1.2 研究方法

1.2.1 药用野生稻广谱抗源的筛选

对来源于广西各地的 198 份药用野生稻资源进行苗期初筛,每份资源取种子 100 粒,催芽后条播于盘内,待 20 d 后,进行成株期大量接虫鉴定,接入 2~3 龄若虫,保证每株苗 5 头,在感虫对照品种 TN1 死亡 7 d 后进行调查。鉴定评级标准为广西农业科学院植物保护研究所修订的标准,0 级为免疫,1 级为高抗(HR),3 级为抗(R),5 级为中抗(MR),7 级为中感(MS),9 级为高感(HS),对初筛得到的抗源材料再用不同生物型进行复筛。

收稿日期: 2003-11-25; 修改稿收到日期: 2004-05-14。

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(0144004)。

第一作者简介: 秦学毅(1956-),男,副研究员,室主任。

1.2.2 药用野生稻抗性遗传研究

以复筛获得的药用野生稻高抗材料作为父本,感虫的药用野生稻材料作母本进行有性杂交,同时利用广谱高抗药用野生稻材料作父本与感虫的栽培稻品种进行杂交。

1.2.3 药用野生稻抗源利用技术研究

1.2.3.1 常规育种与生物技术相结合。以药用野生稻抗源作父本,选择汕A、桂99、西乡糯等不同类型的水稻品种作母本进行有性杂交,通过幼胚培养技术,即母本去雄后,上午6:00~8:00时用药用野生稻花粉授粉,连续授粉2d,待10d左右,将获得的胚发育不完全种子除去内外颖,消毒后置于(1/2)MS+0.1%蔗糖、pH值为5.5的固体培养基上进行培养^[1],当幼苗长至2~3叶时移入盆内进行抗稻褐飞虱鉴定,采用此方法连续多代回交鉴定。

1.2.3.2 外源DNA导入栽培稻品种。以药用野生稻抗源为供体,参照中国科学院上海生物化学研究所的提取方法,并略加改进^[4]。所获DNA样品纯度 $A_{260}/A_{230} > 2.30$, $A_{260}/A_{280} > 1.85$,导入DNA溶液浓度为450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在受体栽培稻品种桂软占自花授粉2~3h后,剪去柱头,用微量注射器将药用野生稻DNA溶液滴于剪口内,随即套上黑色纸袋。

2 结果与分析

2.1 抗源的鉴定与筛选

通过对药用野生稻种子苗期初筛和复筛鉴定,来源于广西各地的药用野生稻抗性鉴定结果如表1。

结果表明药用野生稻对稻褐飞虱具有很强的抗性,在198份材料中,抗性表现为0级(免疫)的有3份,即YD.2-1665、YD.2-1694、YD.2-1738;1级(高抗)的有89份,如YD.2-1594、YD.2-1597、YD.2-1608、YD.2-1611、YD.2-1616、YD.2-1623;3级(抗)的有89份;5级(中抗)的有14份;7级(中感)2份;9级(感)1份,抗性材料占总鉴定数的98.5%,这些高抗材料经自交遗传鉴定,野生性

状没有出现分离,其抗性水平、抗性强度无分离或下降现象,说明其抗源是高度纯合的。从原生地分布情况看,梧州市的藤县、苍梧两县的药用野生稻抗性水平和强度均比其他县高。在第二次考察收集时,对它们进行了补充收集,经鉴定均为广谱高抗材料。

2.2 抗性遗传分析

以药用野生稻抗源中挑选出最抗的YD.2-1665作父本,与编号为YD.2-1789的感虫材料进行杂交,由于药用野生稻种子小、落粒性强,种子尚未成熟即提前落粒,造成种子发芽率低,仅为28%,只有13粒种子发芽,但还是建立了 F_1 和 F_2 抗感分离群体,其抗性鉴定结果列于表2。从结果可知, F_1 表现为1级高抗,说明药用野生稻的抗性基因为显性, F_2 产生了抗感分离,抗虫株和感虫株分离比例为3:1,表明广西药用野生稻对稻褐飞虱的抗性受单基因控制。

药用野生稻YD.2-1665与栽培稻桂99杂交属远缘杂交,由于染色体不配对,后代很难正常结实,经幼胚离体培养的绿苗 F_1 和 F_2 代仍不能结实,也就无法像同源染色体之间那样依靠 F_2 分离群体来分析其抗性基因数目,必须通过回交使其结实,经抗性鉴定,最后产生有抗感分离群体的自交系(表2),从表2中的结果可以看出 F_1 的9株幼胚绿苗全部表现为1级高抗,说明药用野生稻的抗虫性是受显性基因控制的^[3]。虽然没有表现出父本的免疫抗性级别,但其抗性水平在水稻品种中是罕见的。从 B_2F_3 所产生的抗感分离结果可以看出,3级(抗)苗占总数的76%,5级(中抗)苗占4.7%,感虫苗占19%,基本符合3:1分离比例。

从两种研究结果分析认为,药用野生稻对稻褐飞虱的抗性表面上是受一对显性基因所控制的。但抗性水平随回交代数增加而下降,表明抗性基因可能还受到某些微效基因的影响,在我们利用其抗性基因时也证实了这一点。

表1 不同原生地的药用野生稻对稻褐飞虱的抗性表现

Table 1. Resistance to brown planthopper of *Oryza officinalis* from different original places.

原生地 Origin	鉴定份数 No. of tested materials	抗性级别 Grade					
		0	1	3	5	7	9
灵山 Lingshan	3	0	1	2	0	0	0
邕宁 Yongning	3	0	1	2	0	0	0
横县 Hengxian	19	0	6	10	3	0	0
玉林 Yulin	15	0	5	9	1	0	0
北流 Beiliu	5	0	2	2	1	0	0
容县 Rongxian	5	0	0	2	2	1	0
贵县 Guixian	3	0	0	3	0	0	0
桂平 Guiping	16	0	11	4	1	0	0
岑溪 Cenxi	11	0	3	8	0	0	0
平南 Pingnan	5	1	1	2	1	0	0
藤县 Tengxian	22	1	9	11	1	0	0
苍梧 Cangwu	48	1	24	22	1	0	0
昭平 Zhaoping	3	0	1	2	0	0	0
贺县 Hexian	3	0	2	1	0	0	0
梧州 Wuzhou	18	0	13	4	1	0	0
武宣 Wuxuan	19	0	10	5	2	1	1
合计 Total	198	3	89	89	14	2	1

表2 供试亲本及其杂交后代对稻褐飞虱抗性反应

Table 2. Resistance reaction of parents and their crosses to brown planthopper.

杂交组合 Cross	苗数 No. of plants	级别 Grade							抗虫株数 Resistant plants	感虫株数 Susceptible plants	χ^2 (3:1)
		0	1	3	5	7	9				
YD. 2-1665×YD. 2-1789	F ₁	13	0	13	0	0	0	0	13	0	0.01
	F ₂	144	0	106	0	0	8	30	106	38	
YD. 2-1665×桂 99	F ₁	9	0	9	0	0	0	0	9	0	—
YD. 2-1665×Gui 99	B ₁ F ₁	16	0	0	16	0	0	0	16	0	—
	B ₂ F ₂	4	0	0	0	4	0	0	4	0	—
	B ₂ F ₃	21	0	0	16	1	1	3	17	4	0.05
YD. 2-1665		20	0	20	0	0	0	0	20	0	—
YD. 2-1789		20	0	0	0	0	0	20	0	20	—
桂 99 Gui 99		20	0	0	0	0	0	20	0	20	—
ASD7(抗性对照)(Resistant CK)		20	0	0	12	0	0	8	12	8	—

表3 药用野生稻与不同表现型水稻材料杂交及回交后代的性状表现

Table 3. Characters of cross and backcross of *O. officinalis* with different types rice.

组合 Cross or its parents	株高 Plant height /cm	芒性 Awn	落粒性 Seed shedding	种皮颜色 Color of seed coat	结实率 Seed setting rate/%	褐飞虱抗性 Resistance to brown planthopper
YD. 2-1665×汕 A	F ₁	102	部分芒 Partly awned	—	0	HR
YD. 2-1665×Shan A	B ₁ F ₁	93	部分芒 Partly awned	—	0	HR
	B ₂ F ₁	90	无芒 Awnless	—	15	HR
	B ₃ F ₁	88	无芒 Awnless	不易 Uneasy	47	R
	B ₄ F ₁	84	无芒 Awnless	不易 Uneasy	56	R
	B ₄ F ₂	81	无芒 Awnless	不易 Uneasy	65	R
YD. 2-1665×桂 99	F ₁	125	部分芒 Partly awned	—	0	HR
YD. 2-1665×Gui 99	B ₁ F ₁	120	部分芒 Partly awned	易 Easy	2	HR
	B ₂ F ₁	112	部分芒 Partly awned	易 Easy	26	HR
	B ₃ F ₁	95	无芒 Awnless	不易 Uneasy	62	R
	B ₄ F ₁	88	无芒 Awnless	不易 Uneasy	78	R
	B ₄ F ₂	89	无芒 Awnless	不易 Uneasy	81	R
YD. 2-1665×西乡糯	F ₁	131	部分芒 Partly awned	—	0	HR
YD. 2-1665×Xixiangnuo	B ₁ F ₁	128	部分芒 Partly awned	易 Easy	5	HR
	B ₂ F ₁	114	部分芒 Partly awned	易 Easy	41	HR
	B ₃ F ₁	105	无芒 Awnless	不易 Uneasy	67	R
	B ₄ F ₁	92	无芒 Awnless	不易 Uneasy	70	R
	B ₄ F ₂	92	无芒 Awnless	不易 Uneasy	71	R
汕 A Shan A		52	无芒 Awnless	—	0	HS
桂 99 Gui 99		84	无芒 Awnless	不易 Uneasy	93	HS
西乡糯 Xixiangnuo		90	无芒 Awnless	不易 Uneasy	90	HS
药用野生稻 <i>O. officinalis</i>		175	无芒 Awnless	易 Easy	71	HR

HR, Highly resistant; R, Resistant; HS, Highly susceptible. The same as tables below.

3 药用野生稻抗源利用技术研究

药用野生稻属 CC 染色体组,与 AA 染色体组的栽培稻杂交,其最大障碍是染色体不配对,杂交不结实,从 1990 年初我们就开始了这方面研究,获得了 B₁F₁,在此基础上我们进行深入研究,开展了如下工作。

3.1 不同品种间的远缘杂交

选择不同类型的栽培稻品种与药用野生稻杂交,采用常规育种与生物技术相结合, F₀ 和 B₁F₁ 通过幼胚离体培养获得绿苗,再用栽培稻亲本进行连续多代回交,研究不同的品种与药用野生稻抗源杂交的成功率及主要农艺性状的差异,结果表明,不育系与药用野生稻之间杂交, F₀ 容易获得幼胚种子,幼胚成形率为 21%;糯稻与药用野生稻杂交次之,幼胚成形率为 16%;籼稻品种与药用野生稻杂交,其幼胚成形率仅有 11%;说明不同 AA 型染色体的栽培稻与药用野生稻之间杂交,其幼胚成形率差异很大,以不育系作母本为最高,这

可能与不育系柱头外露有关。

3.2 野生性状的改良

药用野生稻是生长在丘陵山冲之中的野生稻属种,株高 1.7~2.8 m,叶片宽、穗颈长、穗形散,这些性状都不是育种时所希望的,在利用时,目的是把有利基因转育到栽培稻中,通过基因重组去除其他不良的野生性状。研究结果(表 3)表明,用 AA 染色体组的栽培稻回交一代,除 YD. 2-1665×汕 A (不育系)组合外, YD. 2-1665×西乡糯(糯稻)及 YD. 2-1665×桂 99(籼稻)两组合均有少量种子结实,回交 2 代后,结实率上升到 15%~41%,而且株高、穗形、粒形趋向回交种,结实率以与糯稻的组合最高,其次为籼稻,不育系组合最低。但叶片仍与药用野生稻相似。连续回交 4 代后,其结实率达到 56%~78%,以籼稻组合最高,达到 78%,糯稻组合次之为 70%,不育系组合为 56%,说明采用不同的材料作亲本对后代结实影响较大。但其他农艺性状如株高、穗形、粒形、叶片均与回交种相似,回交代数越多,后代出现栽培稻类型的

表4 不同的回交方式和鉴定时期的褐飞虱抗性选育效果

Table 4. Effect of backcrossing times and evaluating stage on brown planthopper resistant breeding.

杂交组合 Cross	回交代数 Backcrossing times	鉴定时期 Evaluating time	获得的优良 株系数 No. of superior lines	抗性株数 No. of resistant lines	抗性频率 Frequency of resistant plants /%	抗性水平 Resistance level
YD. 2-1655×汕A	2	B ₁ F ₁ ~B ₂ F ₃ 连续鉴定	7	7	100	HR
YD. 2-1665×Shan A	4	B ₂ F ₁ 、B ₃ F ₁ 、B ₄ F ₂	16	6	38	R
YD. 2-1665×桂99	2	B ₂ F ₂ 、B ₂ F ₃	19	8	89	HR
YD. 2-1665×Gui 99	4	B ₂ F ₂ 、B ₃ F ₃ 、B ₄ F ₄	25	23	92	R
YD. 2-1665×西乡糯	2	B ₂ F ₂ 、B ₂ F ₃	11	8	72	HR
YD. 2-1665×Xixiangnuo	4	B ₁ F ₁ 、B ₄ F ₃	12	2	16	R

频率就越高。

3.3 远缘杂交后代的抗性鉴定及选育

远缘杂交很难通过 F₂ 的抗感分离群体进行选育, 由于 F₁ 不结实, 无法产生 F₂ 的分离群体, 给后代抗性选育带来了一定困难。本研究采用不同的回交代数及不同时期的抗性鉴定, 研究其抗性选育效果, 结果表明, 回交 2 代出现的优良株系其抗性水平为高抗, 回交 4 代其抗性水平为抗, 明显低于回交 2 代。这可能是由于大量的回交, 导致抗性基因被置换(表 4)。但从培育优良性状而言, 回交代数越高, 所出现的优良性状就越多, 结果还揭示, 采用间隙回交法, 即回交 2 代后让其自交, 经过抗性鉴定, 选择高抗株系再与回交种回交, 优良抗性株系出现的频率明显比连续回交高。研究结果还表明, 只在 B₁F₁ 和 B₄F₃ 进行抗性鉴定, 后代的优良抗性株系出现频率很低, 只有 16%, 连续鉴定的出现频率为 100%, 相比之下, 在 B₂F₁、B₃F₁、B₄F₂ 进行 3 次鉴定的为 38%, 而同样在 B₂F₂、B₃F₃、B₄F₄ 进行 3 次鉴定的, 其出现的频率为 92%, 说明不同的回交方法和选择鉴定时期对抗性选育至关重要, 虽然连续多代鉴定要比间隙鉴定所出现的抗性株频率高, 但其工作量是后者的几倍。

3.4 外源 DNA 导入栽培稻研究

以抗源 YD. 2-1665 为供体, 选择谷粒长、柱头为紫色的栽培稻品种为受体, 将纯化后的 DNA 滴入自花授粉 2 h 后去掉柱头的受体颖壳内^[4]。本试验总计处理颖花 2450 个, 结实 1645 粒, 当代结实率为 67%, 在 D₁ 代中发现 5 个变异单株, 变异率为 0.03%, 其变异主要表现在芒性、叶片、穗颈、抗性上, D₂ 代这些性状均产生分离, 受体为无芒、叶片窄、剑叶垂直、不抗稻褐飞虱, 而 5 个变异株系的叶片均似供体, 其中有 4 个株系出现短芒, 3 个株系的抗性达到抗级水平(5 级), 但没有达到供体的抗性强度, 说明药用野生稻部分基因已转入到栽培稻中, 可以通过花粉管导入技术将药用野生稻的外源 DNA 导入栽培稻。

4 讨论

药用野生稻是当今稻属远缘种中具有对稻褐飞虱最强的抗性, 且抗谱广的宝贵水稻种质资源, 但是到目前为止, 世界各国科学家仍无法利用这一抗源培育出新品种, 究其原因, 一是药用野生稻属 CC 染色体组, 栽培稻为 AA 染色体组, 常规育种很难获得后代, 二是抗性鉴定受到限制, 饲养各种褐飞虱生物型需要一定的条件和设备, 一般的育种单位很难具备这些条件。常规育种结合幼胚离体培养可以有效地解决远缘杂交不结实难题。

广西药用野生稻资源极为丰富, 研究表明, 它对褐飞虱的抗性受一对显性基因控制, 这一发现有助于今后利用该抗源基因进行分子育种以及抗性鉴定和选育。

利用药用野生稻抗源是一项长期而复杂的工作, 它含有许多不良基因, 连续回交虽可以克服这些不利基因, 但也会造成抗性基因丢失。研究结果证明, 采用间隙回交法, 即每回交一代让其自交鉴定后再回交, 可以既保持抗性基因, 又改良药用野生稻不良性状。

利用药用野生稻抗源的外源 DNA 导入栽培稻是一项值得探索的利用途径, 国内许多科研人员利用此途径在棉花、水稻、小麦和大豆等作物上取得了成功, 获得许多变异的后代, 从中培育出一批新品种(系), 有些品种正在生产上推广应用^[4]。我们利用此方法也获得了一些变异后代, 但是其目的基因没有完全被导入, 相反一些不良基因反而出现在变异后代中。因此, 笔者认为该途径带有一定的盲目性, 它的成功与否还取决于供、受体间 DNA 分子的相容性, 但是该途径如能在远缘种之间进行, 可以克服远缘杂交不结实的障碍, 大批量导入药用野生稻的外源 DNA, 有望在变异后代中获得目的基因, 可以缩短育种年限, 因此笔者认为外源 DNA 导入途径在水稻远缘种之间利用是可行的。

参考文献:

- 1 Tan Y J(谭玉娟), Zhang Y(张 扬), Huang B C(黄炳超), *et al.* Monitoring the variation dynamics of brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) biotypes and recommending the resistant rice cultivars and resources. *Acta Entomol Sin* (昆虫学报), 1997, 40: 32-39. (in Chinese with English abstract)
- 2 Wu M S(吴妙荣), Li D Y(李道远), Shu L H(舒理慧), *et al.* Studies on Utilization Technique of Wild Rice Resources(野生稻资源研究论文选编). Beijing: Chinese Scientific and Technical Publishers(中国科学技术出版社), 1990. 103-107. (in Chinese)
- 3 Qin X Y(秦学毅), Wei S M(韦素美), Wu B(武 波), *et al.* Inheritance to brown planthopper in *Oryza officinalis* Wall. *Southwest China J Agric Sin*(西南农业学报), 2002, 15(4): 62-64. (in Chinese with English abstract)
- 4 Zhou G Y(周光宇), Huang J Q(黄骏麒), Chen S B(陈善葆), *et al.* Molecular breeding of agriculture-a technique for introducing exogenous DNA into plants after self pollination. *In: Advances in Molecular Breeding Research of Agriculture*(农业分子育种研究进展). Beijing: Chinese Agricultural Scientific and Technical Publishing House(中国农业科技出版社), 1992. 13-18. (in Chinese)
- 5 Xu Q G(徐庆国), Fu J(伏 军), Luo H(罗 弘), *et al.* Study on method and variation of exogenous DNA introducing into rice. *In: Advances in Molecular Breeding Research of Agriculture*(农业分子育种研究进展). Beijing: Chinese Agricultural Scientific and Technical Publishing House(中国农业科技出版社), 1992. 47-52. (in Chinese)