

稻瘿蚊种群 DNA 指纹及水稻抗稻瘿蚊 分子标记育种技术研究^{*}

黄炳超^{1**} 张 扬¹ 谢振文^{1,2} 张桂权³ 肖汉祥¹
李 宏² J. Bennett⁴ 刘名镇⁵ 周少川² S.K.Katihar^{4,6}
陈伟洲⁷ 黄朝锋³ 谭玉娟¹ 徐炎康¹ 赵丽霞¹

- (1. 广东省农业科学院植物保护研究所 广州 510640 2. 广东省农业科学院水稻研究所 广州 510640
3. 华南农业大学农学院 广州 510642; 4. 国际水稻研究所 马尼拉 菲律宾;
5. 江西省宁都县名林水稻研究所 江西省 宁都 342818; 6. 印度甘地农业大学;
7. 清远市农业局 广东省 清远市 511515)

DNA fingerprinting of the Asian rice gall midge, *Orseolia oryzae*, and breeding for the resistant varieties by marker-assisted selection. HUANG Bing-Chao^{1**}, ZHANG Yang¹, XIE Zhen-Wen^{1,2}, ZHANG Gui-Quan³, XIAO Han-Xiang¹, LI Hong², J. Bennett⁴, LIU Ming-Zhen⁵, ZHOU Shao-Chuan², S. K. Katihar^{4,6}, CHEN Wei-Zhou⁷, HUANG Chao-Feng³, TAN Yu-Juan¹, XU Yan-Kang¹, ZHAO Li-Xia¹ (1. *Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences*, Guangzhou 510640, China; 2. *Rice Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences*, Guangzhou 510640, China; 3. *South China Agricultural University*, Guangzhou 510642, China; 4. *Division of Plant Breeding, Genetics and Biotechnology, International Rice Research Institute*, DAPO 7777, Metro Manila, Philippines; 5. *Rice Research Institute of Ningdu County, Jiangxi Province*, Ningdu 342818, China; 6. *Department of Biotechnology, Indira Gandhi Agricultural University*, Raipu 492006 (C. G.), India; 7. *Agricultural Bureau of Qingyuan City, Qing yuan, Guangdong 511515, China*)

Abstract The present paper summarized the research achievements in identification of the populations of the Asian rice gall midge (GM) *Orseolia oryzae* Wood-Mason using DNA fingerprinting technique and breeding for resistant varieties by marker-assisted selection (MAS) in China during 1996 ~ 2005. The core techniques include (1) first application of DNA fingerprinting and AFLP markers in China and the world on the studies on the biotype identification and biodiversity of GM populations from 5 Asian countries (China, India, Sri Lanka, Nepal and Laos) and from 7 locations of Guangdong province, China; (2) fine mapping of the resistance gene *Gm6* in rice germplasm 'Daqui' from China using RAPD and SSR markers; (3) establishment of the breeding technique for new resistant cultivars using MAS based on the closely-linked STS and SSR markers to the gene *Gm6*; (4) six new GM-resistant rice germplasms were developed including 'Kangwen 18' and 'Kangwen-ruanzhan' using the established MAS; and (5) *Gm6* was incorporated into the restorer line of hybrid rice. New GM-resistant hybrid combinations have been bred in 4 two-line hybrids of Peiai 64S/KG18, Peiai 64S/KI41, Peiai 64S/AK7 and Peiai 64S/03W16 and in 1 three-line of 'Kangwen-boyou'. Two GM-resistant two-line hybrid rice of 'Anliangyou-qingzhan' and 'Peiliangyou-kangzhan' using 'Kangwen-qingzhan' with the gene *Gm6* as the resistance donor were registered as the new varieties in Jiangxi province, China. The present research achievements has provided a new control measure for GM management in South

^{*} 国际水稻研究所亚洲水稻生物技术网项目 (RETA5667, CE2/CE5), 广东省国际合作项目 (9751005), 国家外专局外引推广项目 (Y20044440003), 广东省人大农科议案推广项目和广东省农业科学院项目。本文为《昆虫知识》编委会特邀稿件。

^{**} E-mail: b. c. huang@tom.com

投稿日期: 2006-12-15, 修回日期: 2007-01-25 再修回: 2007-02-15

China. The newly developed GM-resistant rice germplasm and cultivars have been widely used in South China and rice farmers are beneficially profited.

Key words rice, *Orseolia oryzae*, DAN fingerprinting, marker assisted selection, breeding

摘 要 文章综述经 10 年(1996~2005)研究建立的亚洲稻瘿蚊 *Orseolia oryzae* Wood-Mason 种群 DNA 指纹检测技术和水稻抗稻瘿蚊分子育种技术的研究成果。其核心技术包括 5 点: (1) 在国际和国内首先用 AFLP 方法研究亚洲 5 国(中国、印度、斯里兰卡、尼泊尔和老挝)及广东省 7 个地点亚洲稻瘿蚊种群 DNA 指纹及其生物多样性; (2) 分别用 RAPD 和微卫星 SSR 技术对来源于我国的水稻资源大秋其的抗亚洲稻瘿蚊基因 *Gm6* 进行精细定位; (3) 分别用与 *Gm6* 基因紧密连锁的 STS 分子标记和 SSR 标记, 建立了分子标记辅助选择(MAS)方法选育抗稻瘿蚊新品种的技术体系; (4) 应用建立的分子标记辅助选育新技术选育出一批抗亚洲稻瘿蚊中国种群的新品系, 创造出一批新种质, 包括抗蚊 18 号、抗蚊软占等达国优 3 级的抗稻瘿蚊新品系 6 个; (5) 将 *Gm6* 基因导入杂交稻恢复系, 选育出 4 个抗稻瘿蚊两系杂交稻新组合培矮 64S/KG18、培矮 64S/KI41、培矮 64S/AK7、培矮 64S/03W16(国优 2 级)和 1 个三系杂交稻新组合抗蚊博优。其中江西省宁都市名林水稻研究所应用本研究鉴定出的带有 *Gm6* 基因的品系抗蚊青占作为抗性亲本, 培育出的 2 个抗稻瘿蚊的两系杂交稻组合安两优青占和培两优抗占通过省级品种审定, 率先选育出抗稻瘿蚊种群的杂交稻。该项研究成果为控制华南稻瘿蚊的灾害发生提供新的技术措施, 选育的抗稻瘿蚊品种和新种质, 在华南广为应用, 取得显著的经济效益。

关键词 水稻, 稻瘿蚊, DAN 指纹, 分子标记辅助选择, 育种

亚洲稻瘿蚊 *Orseolia oryzae* Wood-Mason 是亚洲稻区的主要水稻害虫之一, 分布在南纬 10° 至北纬 27° , 包括中国、印度、斯里兰卡、印度尼西亚、马来西亚、老挝、越南、孟加拉国、泰国和也门等国家^[1] (稻瘿蚊有 2 个种—亚洲稻瘿蚊和非洲稻瘿蚊 *Orseolia oryzivora* Harris & Gagn, 本文介绍的是亚洲稻瘿蚊)。在中国, 20 世纪 40 年代至 50 年代初, 稻瘿蚊在我国南方山区、丘陵地区普遍发生, 间歇猖獗; 50 年代中后期至 60 年代危害明显减少; 70 至 80 年代, 杂交稻在我国全面推广, 双季稻、中稻、单季稻等多种稻作在某些地方同时存在, 大面积高产田的建立, 促进了高产栽培技术的推广和应用, 但这种水稻生产格局给稻瘿蚊发生提供了极为有利的生态环境条件, 使该虫由间歇发生发展到常年发生, 发生面积逐渐扩大, 在发生年频率呈增高趋势^[2]。据不完全统计, 1994 年我国稻瘿蚊发生面积 98 万 hm^2 , 损失稻谷 10 多亿 kg。其中江西省发生 40 000 hm^2 , 不防治情况下, 一般标葱率达 30%, 严重绝收。清远市是广东的贫困山区, 又是广东省稻瘿蚊发生最严重的地区, 每年发生面积 6~7 万 hm^2 , 损失稻谷 4 500~5

250 万 kg。为此, 90 年代初, 我国农业部原全国植保总站启动稻瘿蚊综合防治项目, 以控制华南地区稻瘿蚊的灾害发生。广东省农业科学院(以下简称广东农科院)的任务是开展水稻抗稻瘿蚊育种。

使用抗虫品种是经济、有效、安全的措施。但亚洲稻瘿蚊种群有对不同抗性基因的品种致害力不同的生物型。印度已发现有 6 个稻瘿蚊生物型^[3]。黎国涛等认为在华南地区至少有 4 个稻瘿蚊生物型, 其中生物型 4(清远阳山种群)致害力最强^[4]。大多数国外引进的抗性品种对其缺乏抗性, 不同基因型的水稻品种对不同生物型的稻瘿蚊种群有不同的抗性反应。深入研究亚洲稻瘿蚊种群的分子特点, 是水稻抗稻瘿蚊育种和抗性品种的基础。因此, 本项目首先用扩增片段长度多态性(AFLP)技术分析稻瘿蚊 DNA 指纹, 研究稻瘿蚊不同生物型种群的分子特点和生物多样性, 为抗稻瘿蚊品种的选育和推广应用提供依据。

由于稻瘿蚊抗虫表型鉴定受到气候和生产条件的限制, 使得通过常规育种方法选育稻瘿蚊抗性品种非常困难。利用分子标记辅助选择

(marker aided selection, MAS)方法选育抗虫基因品种(系), 避开繁杂的表型抗性鉴定, 直接选择基因型, 加快抗虫品种的选育过程。本课题组在前期的研究中, 发现来源于中国稻种资源大秋其的抗稻瘰蚊基因是一个显性单基因, 该基因抗中国 4 个稻瘰蚊生物型, 命名为 *Gm6(t)*, 并将该基因初定位在水稻第 4 染色体上, 位于 RG214 和 RG163 2 个标记之间^[5, 6]。抗性遗传研究表明 *Gm6* 基因与国际上报道的 *Gm1*, *Gm2*, *Gm3* 和 *Gm4(t)* 不等位, 与 *Gm5(t)* 和羊山占的抗稻瘰蚊基因也不同, 是一个新的抗稻瘰蚊基因^[7]。本项目在这些研究的基础上, 对 *Gm6* 基因进行精细定位, 并用分子标记辅助选择方法, 将 *Gm6* 基因导入常规优质水稻和杂交稻恢复系, 为广东省和华南稻瘰蚊区提供抗稻瘰蚊的环保型常规优质水稻和杂交稻组合, 达到不使用农药, 能控制稻瘰蚊灾害发生的目的, 对于节约成本, 提高水稻种植效益具有重要的意义。

目前, 国际上已鉴定了 9 个亚洲抗稻瘰蚊基因^[8~14]。已报道 *Gm1* 基因抗中国生物型 1 和 3, 抗印度生物型 1, 3 和 5; *Gm2* 基因抗中国生物型 1 和 2, 抗印度生物型 1, 2 和 5; *Gm3* 基因抗印度生物型 1 和 4; *Gm4* 基因抗印度生物型 1, 2 和 4; *Gm5* 基因抗中国生物型 1, 抗印度生物型 1 和 5; *Gm6* 基因抗中国生物型 1, 2, 3 和 4(上述); *Gm7* 基因抗印度生物型 1, 2, 3 和 4。这 9 个抗稻瘰蚊基因已有 4 个被分子定位, *Gm2*, *Gm6* 和 *Gm7* 定位在第 4 染色体的长臂上, 而 *Gm4* 位于第 8 染色体上^[5, 6, 15~19]。但未有 MAS 方法选育抗亚洲稻瘰蚊中国种群的常规新品种和杂交稻的报道。

本文综述本课题组经 10 年(1996~2005)研究建立了亚洲稻瘰蚊种群 DNA 指纹检测技术和水稻抗稻瘰蚊分子育种技术的研究成果。

1 亚洲稻瘰蚊种群 DNA 指纹及其生物多样性分析

利用 AFLP 技术分析了印度、中国、斯里兰卡、尼泊尔、老挝 5 个国家 15 个亚洲稻瘰蚊

DNA 样本, AFLP 数据的聚类分析表明这几个地点的稻瘰蚊样本可分为 2 组, 中国与老挝和东印度组及印度其它样本和斯里兰卡、尼泊尔组, 这 2 组明显有地理位置关系。研究结果还在印度东部发现了一个新的生物型, 使印度稻瘰蚊的生物型由原来的 5 个增至 6 个。AFLP 指纹还能鉴别稻瘰蚊成虫的性别二态性, 并能将稻瘰蚊与其主要寄生蜂 *Platygaster oryzae* 区分。1997 年首先在马来西亚国际水稻生物大会发表有关研究结果, 为国际领先^[20]。1998 年记录在国际水稻研究所年度项目报告中^[21], 2000 年在《Genome》全文正式发表^[22]。

利用 AFLP 技术对采自广东省的 7 个不同地点、不同稻瘰蚊生物型样本进行 DNA 指纹分析, 为鉴别稻瘰蚊生物型及揭示其所在的遗传进化关系探索方法和积累资料。生物型测定结果来看, 花都与高州、新会与五华、阳山与封开分别属于生物型 1, 2, 4; 清远则属于生物型 3, 同阳山的反应比较接近, 差别在于 W1263, 前者为抗后者为感。所用的 4 对引物组合对稻瘰蚊 DNA 都能扩增丰富的 DNA 带。根据读取的数据, 用 DPS 软件进行的聚类分析结果表明, 不同引物所对稻瘰蚊 DNA 扩增的指纹的聚类结果有所不同, *Pst* I(91)与 *Mse* I(F10)引物组合的聚类结果, 无论是在同一地点的生物型种群内或是不同地点同一种生物型种群内与生物型的划分归类基本一致。其它引物组合的聚类结果则与生物型的划分归类不完全一致。本研究应用 4 对引物分析广东稻瘰蚊不同生物型种群表明, 不同引物组合间对不同稻瘰蚊生物型种群的聚类分析结果不一致, 只有 1 个组合引物所扩增的广东 7 个地点 4 个稻瘰蚊生物型 DNA 指纹可以进行较清晰聚类, 也就是说鉴定稻瘰蚊生物需要找到适合的引物组合, 这一结论和对亚洲五国稻瘰蚊 DNA 指纹分析的研究结果类似^[23]。

亚洲稻瘰蚊种群 DNA 指纹及其生物多样性分析 2 项结果, 使我们从分子水平认识防治对象的生物多样性和遗传特点, 中国的稻瘰蚊种群和南亚地区稻瘰蚊种群是不同的^[24~26], 一

个侧面认识大多数国外引进的抗性品种对中国稻瘿蚊种群缺乏抗性的原因,不同基因型的水稻品种对不同生物型的稻瘿蚊种群有不同的抗性反应,与亚洲稻瘿蚊种群生物多样性有关。我们必须研究和开发我国抗稻瘿蚊的水稻资源。同时这些研究结果为抗稻瘿蚊品种的选育和推广应用提供依据。

2 抗稻瘿蚊基因 *Gm6* 的分子精细定位

用随机扩增多态性(random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术将中国农家品种大秋其的抗中国 4 个稻瘿蚊生物型的 *Gm6* 基因定位于水稻第 4 染色体上,位于 RG214(1.0 cM)和 RG476(2.3 cM)2 个 RFLP 标记之间^[17]。中国水稻栽培品种多抗 1 号(大秋其的衍生品系)携带一个能抗中国 4 个稻瘿蚊生物型的显性单基因 *Gm-6(t)*。应用随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术,我们对多抗 1 号和感虫品种丰良占的杂交后代进行分析, RAPD 标记 OPM-06(1400)扩增出一个座位与 *Gm-6(t)* 连锁,这个座位随后被定位在水稻第 4 染色体上,位于 RFLP 标记 RG214 和 RG476 之间,其遗传距离分别为 1.0 和 2.3 cM。通过多抗 1 号和含 *Gm-2* 基因的印度栽培稻 Phalguna 杂交后代的分离群体分析, *Gm-2* 基因也被定位在水稻第 4 染色体上,与 *Gm-6(t)* 间的遗传距离约为 16 cM。为了将 *Gm-6(t)* 基因转到中国杂交稻亲本明恢 63 和 IR50404 中,我们发展了一个以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)为基础分子辅助选择试剂盒。这个试剂盒包含了以克隆 RG214 和 RG476 末端序列而设计的 PCR 引物。PCR 产物经特殊的限制性内切酶酶切后,能在多抗 1 号和杂交稻亲本间显示出多态性。这个试剂盒将会加速将稻瘿蚊抗性基因转到中国的杂交稻中^[27]。

利用 2 个简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)标记(RM348 和 RM255)和一个序列标签位点(sequence tagged site, STS)标记(RG476/*Sca* I)将 *Gm6* 基因初定位在第 4 染色体的长臂上,然后利用网上公布的序列信息在

附近设计高密度的位置特异微卫星标记,对 *Gm6* 基因作精细定位,将其定位在 PSM112 和 PSM114 两标记之间,遗传距离为 0.4 cM 的区域内,另有 PSM101, PSM106 和 PSM115 3 个标记与 *Gm6* 基因完全连锁。筛选出 2 个 BAC 重叠克隆 AL606645 和 AL606660 用于 *Gm6* 基因的物理作图,利用这 2 个克隆上有多态的位置特异微卫星标记将该基因限定在大约 158 kb 的物理区域内^[28, 29]。

抗稻瘿蚊基因 *Gm6* 的分子精细定位为水稻抗稻瘿蚊分子育种打下了基础,也是分子育种的重要技术组成部分。

3 水稻抗稻瘿蚊分子育种技术的建立

稻瘿蚊抗性的分子标记辅助选择,分别用 RFLP, RAPD, STS 和 SSR 标记对 6 个抗稻瘿蚊基因(*Gm1*, *Gm2*, *gm3*, *Gm4*, *Gm5(t)* 和 *Gm6(t)*)进行标记和定位,其中 4 个基因(*Gm2*, *Gm4*, *Gm5(t)* 和 *Gm6(t)*),已经分别定位在水稻基因组的第 4, 8, 12 和 4 染色体上。对紧密连锁的 RAPD 标记进行了克隆、测序,构建了用于分子标记辅助选择的 STS 标记和内切酶。开发了供育种家用于分子标记辅助选择的试剂盒,试剂盒含有能识别抗性供体和受体亲本品系多态性的适当的 STS 标记和内切酶。这些试剂盒已在印度和中国用于将不同的抗稻瘿蚊基因转育导入商业性的品种中,和通过分子标记选择将多个抗性基因聚合以培育广谱和长久抗性的品种^[30]。

在中国,这一技术分别用与 *Gm6* 基因紧密连锁的 STS 分子标记和 SSR 标记,建立了 MAS 方法选育抗稻瘿蚊新品种。首先对育种亲本进行多态性分析,能快捷地从基因型角度鉴定出高代材料是否含有 *Gm6* 基因,从 F₂ ~ F₆ 代等育种群体中筛选出含有 *Gm6* 基因的株系,从杂交稻的 F₁ 代种群鉴定出真假含有 *Gm6* 基因的株系,然后通过大田农业性状的观察,筛选出抗稻瘿蚊新品种(系)。比传统直接单从抗性表现型方法选育抗稻瘿蚊新品种更准确和快捷^[31]。

4 分子标记辅助选育抗稻瘰蚊优质稻新品系

1999 ~ 2002 年用与抗稻瘰蚊的基因 *Gm6* 紧密连锁的分子标记, 探索用 MAS 的方法, 成功地选育抗稻瘰蚊的品系。首先用 RAPD OPM06 标记鉴别和确认出大秋其及其衍生品系抗蚊青占、抗蚊 2 号、抗蚊 3 号、抗蚊 5 号、多抗早占等 10 个品系含有 *Gm6* 基因; 分别用 RG476/*Alu1* 和 RG476/*ScaI* 标记确定了育种亲本的多态性; 1999 年用 OPM06 标记, 从丰银占/大秋其 F3 家系中, 鉴定出 15 个抗稻瘰蚊的株系; 2000 ~ 2001 年用 RG476/*Alu1* 标记从抗蚊青占/桂 99 的 F4 和 F6 家系中分别鉴定出 21 个和 7 个抗稻瘰蚊株系, 成功地将 *Gm6* 基因转入到杂交稻的恢复系中去。2001 ~ 2002 年用 RG214/*HhaI* 和 RG214/*ScaI* 分别从抗蚊青占/IR56 和矮小占/抗蚊青占 F3 家系中筛选出 11 个和 5 个抗稻瘰蚊株系。所筛选出的抗性品系的抗性表现型与基因型的结果一致^[32~35]。

2003 ~ 2005 年利用与 *Gm6* 紧密连锁的位置特异性微卫星 (position-specific microsatellite, PSM) 标记进行分子标记辅助抗性育种。利用 PSM101 标记对 3 个抗稻瘰蚊新品系 KG18, KI41 和 AK7 的 F10 代进行了分析, 其带型均与抗性亲本一致; 利用 PSM101 标记从巴太香占/KG18 的 197 个 F2 家系中鉴定出 47 个抗稻瘰蚊株系, 经抗性表型鉴定, 筛选出的抗稻瘰蚊株系的抗性表现与基因型一致; 利用 PSM101 标记, 对抗稻瘰蚊两系杂交稻的 F1 真假杂交进行测定, 结果表明为真杂^[37, 38]。

1996 ~ 1997 年, 鉴定选育出带有基因 *Gm6* 的抗蚊青占^[39~41], 抗蚊青占参加 1999 年和 2000 年广东省水稻新品种区试(晚造)产量均名列第 3 名, 产量分别 6 122.7 kg/hm² 和 6 463.2 kg/hm², 比对照种粳粳 89 增产 2.66% 和 5.78%。抗蚊青占不仅高抗稻瘰蚊, 还抗白叶枯病(IV 型菌), 米质一级。已在广东、广西、江西、福建和湖南等省区的稻瘰蚊区种植, 累计超过 60 800 hm²。达到减少用药, 保护环境, 又能

控制稻瘰蚊灾害发生, 提高产量和效益的目的^[42, 43]。

2000 ~ 2004 年, 通过田间农艺性状的观察和米质分析, 选育出高抗稻瘰蚊的抗蚊 18 号和抗蚊软占等 6 个常规优质(国优 3 级)的籼稻新品系, 抗蚊 18 号参加 2004 年和 2005 年广东省水稻新品种区试, 抗蚊软占推荐参加 2005 年广东省水稻新品种预试^[39]。

抗蚊 18 号(编号 KG18)是广东省农业科学院(植物保护研究所、水稻研究所)以桂 99/抗蚊青占为亲本, 用分子标记辅助选择方法选育出来的新品系, 高抗稻瘰蚊, 丰产, 全生育期 120 d。千粒重 21.5 g, 2002 年晚造小区 8 643 kg/hm²。早晚兼用。2003 年早造在清远市清新县太平镇试种表现高抗稻瘰蚊、丰产。在周边对照种无效分蘖标葱率 12.9% ~ 21.6% 的情况下, 抗蚊 18 号无标葱^[31]。

抗蚊软占(编号 KZ10)是广东省农业科学院植物保护研究所, 以中二软占/抗蚊青占为亲本, 转育 *Gm6* 基因选育出来的优质高抗稻瘰蚊新品系, 软性米, 千粒重 20.0 g, 全生育期 115 d。2003 年早造在清远市清新县太平镇试种表现高抗稻瘰蚊、丰产。在周边对照种无效分蘖标葱率 12.9% ~ 21.6% 的情况下, 抗蚊软占无标葱, 产量 9 677.4 kg/hm²^[39]。

抗蚊 18 号和抗蚊软占与粳粳 89 (CK)产量比较见表 1。

表 1 抗蚊 18 号和抗蚊软占与粳粳 89 (CK)产量比较 (2004 年晚造, 广州)

品种	产量 (kg/hm ²)	1%极显著 水平	比对照增减 (%)
抗蚊 18 号	1012.8	A	26.39
抗蚊软占	8749.5	B	12.17
粳粳 89 (CK)	7800.8	C	

注: 表中数据为 3 次重复平均值, (下同)。

5 抗稻瘰蚊杂交稻的选育

广东农科院植保所用上述分子标记辅助选育出来的抗抗稻瘰蚊新品系, 组配了 4 个两系杂交稻组合培矮 64S/KG18、培矮 64S/KI41、

培矮 64S / AK7, 培矮 64S / 03W16 和 1 个三系杂交稻组合抗蚊博优^[21]。培杂软占 (培矮 64S / 03W16) (国优 2 级) 推荐参加 2005 年广东省水稻新品种区试。4 个组合表现丰产、产量比较如表 2。

江西宁都名林水稻研究所与广东农科院合作, 用广东农科院提供的抗蚊青占 (含 *Gm6* 基因) 为父本培育出 2 个抗稻瘰蚊的两系杂交稻组合安两优青占和培两优抗占。其中安两优青占在 2004 年 3 月通过江西省品种审定, 并参加 2004 年国家南方区试。培两优抗占 2005 年 3 月通过江西省品种审定^[44,45]。

表 2 4 个两系杂交稻新组合的产量比较
(2004 年晚造, 广州)

组合	产量 (Kg / hm ²)	5% 显著 水平	1% 极显 著水平	比对照 增减 (%)
培矮 64S / 03W16	10 255.5	a	A	17. 74
培矮 64S / KG18	10 165.5	a	A	16. 70
培矮 64S / AK7	9 892. 5	a	AB	13. 56
培矮 64S / KI41	9 885. 0	a	AB	13. 54
培杂 77 (CK)	8 710. 5	b	B	

6 成果应用情况

培育出的带有 *Gm6* 基因的品种 (系) 在我国华南 (广东、广西、江西、和福建) 稻瘰蚊区试验推广 161 000 hm² (241. 5 万亩), 广为应用, 对控制华南稻瘰蚊的灾害发生, 减少农药使用, 提高农户的经济效益有积极的作用, 获社会效益 1. 93 亿元。

广西农科院、江西名林水稻所和福建三明农科所用带有 *Gm6* 基因的品种 (系) 作为育种抗性亲本开展了抗稻瘰蚊育种。

7 结语

本项目经 10 年研究, 广东省农业科学院 (植保所和水稻所)、华南农业大学、国际水稻研究所和江西名林水稻研究所合作, 植物保护、遗传育种和分子生物技术等多学科联合攻关, 研究建立了以稻瘰蚊种群 DNA 指纹研究分析技术, 抗稻瘰蚊基因 *Gm6* 的精细定位, 分子标记

辅助选育抗稻瘰蚊品系, *Gm6* 基因导入杂交稻恢复系并培育抗稻瘰蚊杂交稻作为技术要点, 形成水稻抗稻瘰蚊分子育种技术体系。培育出的带有 *Gm6* 基因的新品种 (系) 在我国华南 (广东、广西、江西、和福建) 稻瘰蚊区试验推广并为育种部门应用。该项成果为我国抗稻瘰蚊育种提供了新技术和新种质, 为控制稻瘰蚊的灾害发生提供了新的技术措施。

在国际上首先用 AFLP 方法, 研究亚洲 5 国 (中国, 印度, 斯里兰卡, 尼泊尔和老挝) DNA 指纹及其生物多样性; 在国内首先用 AFLP 方法广东省 7 个地点稻瘰蚊种群 DNA 指纹及其生物多样性。

在国际上首先建立了水稻抗稻瘰蚊 MAS 育种的技术体系。在育种层面, 这个技术体系包括对抗稻瘰蚊基因 *Gm6* MAS 方法选育抗亚洲稻瘰蚊中国种群的常规优质新品系和杂交稻。

对抗稻瘰蚊基因 *Gm6* 精细定位, 有 2 点在国际和国内具有创新:

(1) 是将中国农家品种大秋其的抗中国 4 个稻瘰蚊生物型的 *Gm6* 基因定位于水稻第 4 染色体上, 位于 RG214 (1. 0 cM) 和 RG476 (2. 3 cM) 2 个 RFLP 标记之间。

(2) 是利用微卫星 (simple sequence repeats SSR) 技术, 将 *Gm6* 基因进一步精细定位于水稻第 4 染色体 PSM112 和 PSM114 之间, 遗传距离为 0. 4 cM, 且与 PSM101, PSM106 和 PSM115 三个标记紧密连锁。筛选出 2 个 BAC 重叠克隆 AL606645 和 AL606660 用于 *Gm6* 基因的物理作图, 利用这 2 个克隆上有多态的位置特异微卫星标记将该基因限定在大约 158 kb 的物理区域内。

在国际和国内首先用 MAS 方法选育抗中国稻瘰蚊种群的新品系, 包括两方面的研究, 应用与 *Gm6* 基因紧密连锁的 STS 分子标记和 SSR 标记, 用 MAS 方法选育抗中国稻瘰蚊种群的新品系; 用 MAS 方法成功地将 *Gm6* 基因导入到常规优质稻中去, 培育出抗中国稻瘰蚊种群的优质稻新品系, 选育出抗稻瘰蚊的抗蚊 18 号和

抗蚊软占(达国优3级)等6个常规优质籼稻新品系。

成功地将 *Gm6* 基因转入到杂交稻(三系和二系)的恢复系中去, 培育出抗中国稻瘿蚊种群的杂交稻, 包括4个两系杂交稻组合培矮64S/KG18、培矮64S/KI41、培矮64S/AK7、培矮64S/03W16(命名培杂软占, 达国优2级)和1个三系杂交稻组合抗蚊博优。其中安两优青占在2004年3月通过江西省品种审定, 并参加2004年国家南方区试。安两优抗占2005年3月通过江西省品种审定。在国际上首先培育出抗稻瘿蚊种群的杂交稻。

培育出的带有 *Gm6* 基因的品种在我国华南稻瘿蚊区广为应用, 对控制稻瘿蚊的灾害发生, 减少农药使用, 提高农户的经济效益有积极的作用。

对亚洲5国和广东稻瘿蚊种群DNA指纹及其生物多样性分析2项结果, 使我们从分子水平认识防治对象的生物多样性和遗传特点, 从一个侧面认识大多数国外引进的抗性品种对中国稻瘿蚊种群缺乏抗性的原因, 不同基因型的水稻品种对不同生物型的稻瘿蚊种群有不同的抗性反应, 与亚洲稻瘿蚊种群生物多样性有关。我们必须研究和开发我国抗稻瘿蚊的水稻资源。同时这些结果为抗稻瘿蚊品种的选育和推广应用提供依据。

抗稻瘿蚊分子育种技术体系分别用与 *Gm6* 基因紧密连锁的STS分子标记和SSR标记, 建立了分子标记辅助选择(MAS)方法选育抗稻瘿蚊新品种技术体系。首先对育种亲本进行多态性分析, 能快捷地从基因型角度鉴定出高代材料是否含有 *Gm6* 基因, 从F₂~F₆代等育种群体中筛选出含有 *Gm6* 基因的株系, 从杂交稻的F₁代种鉴定出真假含有 *Gm6* 基因的株系, 然后通过大田农业性状的观察, 筛选出抗稻瘿蚊新品种(系)和杂交稻。比传统直接单从抗性表现型方法选育抗稻瘿蚊新品种更准确和快捷。抗稻瘿蚊分子育种技术体系国际上还未有报道。

使用抗病虫品种是华南稻区综合防治和实

现可持续控制技术的重要措施。当前, 水稻品种的选育正向优质多抗丰产的方向发展。华南稻瘿蚊区急需抗稻瘿蚊的品种^[19]。以往抗稻瘿蚊育种和抗性鉴定, 是以稻瘿蚊种群进行抗虫鉴定。每年从越冬寄主采集稻瘿蚊, 经2代繁殖(每代30d左右), 然后接虫, 接虫后25~30d才进行评定抗性级别, 耗时3个多月, 工作十分繁重, 又受气候、虫源和养虫试验条件的影响, 准确性较差。用分子标记辅助育种方法, 播种后7d, 就能开始DNA提取和分析, 3~5d就有结果, 能准确、快捷地确定抗性株系, 又不受气候、虫源和养虫试验条件的影响, 是进行抗稻瘿蚊育种的新途径^[19]。但是分子标记辅助选育的基础是首先要作好抗性基因的鉴定、识别、抗性遗传分析、分子标记和定位等工作, 这需要时间、经费及设备, 并需要育种家、分子生物学家和植保工作者的紧密合作。

参 考 文 献

- 1 梁帝允. 世界农业, 1997, (3): 27~56.
- 2 农恒科. 广西植保, 1996, (3): 20~22.
- 3 Kalode M. B., Bentur J. S. *Insect Sic. Appl.*, 1989, (10): 219~224.
- 4 黎国涛, 谭玉娟, 潘英. 植物保护学报, 1983, 10(30): 147~152.
- 4 谭玉娟, 张扬, 黄炳超, 徐炎康, 赵丽霞, 等. 植物保护学报, 1996, 23(4): 315~320.
- 5 Katiyar S. K., Tan Y. J., Huang B. C., Chandel G., Xu Y. K., et al. *Theor. Appl. Genet.*, 2001, 103: 953~961.
- 6 张扬, 谭玉娟, 黄炳超, 陈健伟, 朱旭东. 植物保护学报, 2000, 27(2): 136~140.
- 7 Chaudhary B. P., Shrivastava P. S., Shrivastava M. N. In: *Rice Res. Inst., The Philippines* 1986. 523~528.
- 8 Shrivastava M. N., Kumar A., Shrivastava S. K., Sahu P. K. *Rice Genet. Newsl.*, 1993, 10: 79~80.
- 9 Tan Y., Pan Y., Zhang Y. *Rice Res. Notes*, 1993, 18: 13~14.
- 10 Kumar A., Shrivastava M. N., Sahu P. K. *Rice Genet. Newsl.*, 1998, 15: 142~143.
- 11 Kumar A., Shrivastava M. N., Shukla B. C. *Rice Genet. Newsl.*, 1999, 16: 85~87.
- 12 Kumar A., Bhandarkar S., Pophlay D. J., Srivastava M. N. *Rice Genet. Newsl.*, 2000, 17: 83~84.
- 13 Shrivastava M. N., Kumar A., Bhandarkar S. *Euphytica*, 2003, 130(1): 143~145.
- 14 Mohan M., Nair S., Bentur J. S., Rao U. P., Bennett J. *Theor. Appl. Genet.*, 1994, (87): 782~788.
- 15 Mohan M., Sathyanarayanan P. V., Kumar A. *Theor. Appl.*

Genet., 1997, (95): 777~782.

16 Nair S., Bentur J. S., Rao P. U. *Theor. Appl. Genet.*, 1995, (91): 68~73.

17 Nair S., Kumar A., Srivastava M. N., Sathyanarayanan P. V. *Theor. Appl. Genet.*, 1996, (92): 660~665.

18 Sardesai N., Kumar A., Rajyashri K. R. *Theor. Appl. Genet.*, 2002 (105): 691~698.

19 Katiyar S. K., Huang B. C., Inthavong S., Constantino V. S., Bennett J. In Proceeding: General Meeting of the Intern. Progr. on Rice Biotechn., Malacca, Malasia IRRI 1997, 128.

20 Katiyar S. K., Huang B. C., Bennett J. Intern. Rice Res. Inst. Progr. Rep. for 1998, IRRI, 1999 93~94.

21 Katiyar S. K., Chandel G., Tan Y. J., Zhang Y., Huang B. C., *et al. Genome*, 2000, **43**, 322~332

22 张杨, 黄炳超, 肖汉祥, 谢振文, Bennett J. 广东农业科学, 2005, (1): 60~64.

23 Bennett J., Katiyar S. K., Chandel G., Huang B. C., Tan Y. J., *et al.* In Proceeding: Intern. Workshop on New Approaches to Gall Midge Resistance in Rice ICAR & IRRI, Hyderabad India. November 22~24, 1998. 28~29.

24 Pasalu I. C., Huang B. C., Zhang Y., Tan Y. J. In: Bennett J., Benture J. S., Pasalu I. C. *et al.* New Approaches to Gall Midge Resistance in Rice ICAR & IRRI, 2004, 131~138.

25 Katiyar S. K., Venulkar S. B., Chandel G., Zhang Y., Huang B. C., *et al.* In: Bennett J., Benture J. S., Pasalu I. C. (eds.), New Approaches to Gall Midge Resistance in Rice ICAR & IRRI 2004. 139~152

26 Katiyar S. K., Tan Y. J., Huang B. C., Zhang Y., Chandel G., *et al. Theor Appl Genet.*, 2001, **103**:953~961.

27 黄朝锋, 张桂权. 分子植物育种, 2003, 1(4): 572~574.

28 黄朝锋. 硕士学位论文. 华南农业大学, 2003.

29 Katiyar S. K., Huang B. C., Bennett J. *IRRI Program Report for 2000*, IRRI 2000. 78~79.

30 黄炳超, 肖汉祥, 吕利华, 张 扬, 李 宏, 等. 华南农业大学学报. (增刊), (2002 东方科技论坛文集):2002, **23** (1): 101~113.

31 Huang B. C., Zhang Y., Xiao H. X., Liu L. H., Xie Z. W., *et al.* In: Proceeding of the International Rice Congress, Beijing China, September 16~20. 2002. 218.

32 Huang B. C., Xiao H. X., Liu L. H., Zhang Y, Hong L., *et al. Agricul. Sci. in China*, 2003, **2**(8):875~880.

33 黄炳超, 肖汉祥, 吕利华, 张 扬, 李宏, 等. 中国农业科学, 2004, **27**(1): 76~80.

34 Huang B. C., Xiao H. X., Liu L. H., Zhang Y., Hong L., *et al.* In: Proceedings of the 15 th International Plant Protection Congress, Beijing, China, May 11~16 2004. 265.

35 Huang B. C., In Proceeding: China-IRRI Collaborative Work Plan Meeting, Hangzhou, China. 1~2 June 2000, 1~14.

36 肖汉祥, 黄炳超, 张 扬. 广东农业科学, 2005, (3): 50~53.

37 肖汉祥, 黄炳超, 张杨. 迈入 21 世纪的中国生物防治, 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005. 596~600.

38 黄炳超, 张 扬, 肖汉祥. 作物研究(国际水稻年专刊), 2004, (4): 201~207.

39 谢振文, 赵丽霞, 张杨, 黄炳超, 徐炎康, 等. 广东农业科学(增刊), 1999, (增总第 7 期):27~30.

40 谢振文, 赵丽霞, 张杨, 黄炳超, 徐炎康, 等. 广东农业科学(增刊), 1999, (增总第 7 期):31~33.

41 广东省农科院植保所、水稻所. 中国种植科技, 2002, (4): 38~39.

42 广东省农科院植保所. 农业产业化技术推广. 技术成果. 北京: 中国农业出版社. 2001. 22~23.

43 刘名镇, 徐小红, 鄢祖林. 杂交水稻, 2003, **18**(1): 15~16.

44 彭炳生, 刘名镇, 鄢祖林, 吴桂生, 徐小红. 杂交水稻, 2004, **19**(5):66~67.

红脂大小蠹入侵机制与化学生态学研究^{*}

张龙娃^{1, 2} 鲁 敏¹ 刘柱东¹ 孙江华^{1**}

(1. 中国科学院动物研究所 农业虫鼠害综合治理国家重点实验室 北京 100080;
2. 安徽农业大学林学与园林学院 安徽省微生物防治重点实验室 合肥 230036)

Progress on invasion biology and chemical ecology of red turpentine beetle, *Dendroctonus valens*. ZHANG Long-Wa^{1, 2}, LIU Ming¹, LIU Zhu-Dong¹, SUNG Jiang-Hua^{1**}. (1. *State Key Laboratory of Integrated Management Agricultural Pests & Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*; 2. *Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Pest Control, Anhui Agricultural University, Heifei 230036, China*)

Abstract The red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte, native in North America, is a destructive exotic

^{*} 国家基金委杰出青年基金资助项目(30525009), 安徽农业大学引进人才基金资助。本文为《昆虫知识》编委会特邀稿件。

^{**} 通讯作者, E-mail: sunjh@ioz.ac.cn

收稿日期: 2006-12-12, 修回日期: 2007-02-02