

普通野生稻转育后代稻褐飞虱抗性基因的初步定位

张志伟 段利超 黄常源 林拥军 陈浩

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/国家植物基因研究中心(武汉), 武汉 430070

摘要 通过 BR96 与白 56 构建 F₂ 群体, 利用均匀分布于水稻全基因组的 122 对多态性引物标记分析 F₂ 群体的基因型, 构建遗传连锁图谱, 考查 F₂ 衍生的 F₃ 各家系的褐飞虱苗期抗性等级, 检测水稻褐飞虱抗性数量性状位点(QTL)。结果显示: 分别在第 3、4 和 6 号染色体上各扫描到一个抗褐飞虱 QTL 位点, *QBph3* 位于第 3 染色体 RM489-RM282 之间, LOD 值为 5.1, 解释表型变异率是 3.8%; *QBph4* 位于第 4 号染色体 RM16605-RM16717 之间, LOD 值为 28.7, 解释表型变异率是 29.4%; *QBph6* 位于第 6 号染色体 RM276-RM527 之间, LOD 值为 2.7, 解释表型变异率是 7.1%; 3 个 QTL 的联合贡献率为 40.3%。*QBph4* 可解释表型变异率最大, 初步判断 *QBph4* 可能是一个控制褐飞虱抗性的主效基因。

关键词 普通野生稻; 重组自交系; 褐飞虱; QTL; 遗传连锁图谱; 基因定位

中图分类号 S 511.103.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)02-0010-05

褐飞虱 (*Nilaparvata lugens* Stål, BPH) 已成为危害水稻生产最严重的害虫之一, 在我国每年因褐飞虱而导致的水稻产量损失非常严重。褐飞虱是同翅目(Homoptera) 飞虱科(Delphacidae) 的一种昆虫, 是一种专食性水稻害虫, 只能在水稻稻株上进行取食和繁殖后代^[1]。褐飞虱是以口针刺吸水稻茎秆韧皮部内的汁液, 使水稻的生长发育受到影响, 虫害严重时, 水稻基部会变黑, 稻株瘫痪倒伏, 俗称“冒穿”或“虱烧”^[2]。同时, 褐飞虱还是水稻草状从矮病毒和齿叶矮缩病病毒的传播媒介。此外, 褐飞虱分泌的含有多种有机物质的“蜜露”, 非常适合烟煤病菌的繁殖生长^[3]。

褐飞虱外观形态上无明显差异, 仅在少数生物学特征, 如个体大小、昼夜或季节活动形式、迁移及分散特性、性状及体色、传病能力、外激素的成分和对农药或寄主的抗性等方面表现出差异。根据不同褐飞虱种群对不同抗性基因作物品种的致害反应, 国际水稻所正式命名了 6 种褐飞虱生物型, 分别是生物型 I、II、III、IV、V 和孟加拉型褐飞虱生物型^[4]。褐飞虱生物型 I 是只能致害不含任何抗性基因水稻品种(如台中 1 号 TN1 等)的褐飞虱群体, 生物型 II 是指可以为害含有 *Bph I* 的水稻品种(如 Mudgo、IR26 和汕优 6 号等), 但不能致害含有其他

抗性基因如 *Bph II* 水稻品种的褐飞虱群体, 生物型 III 可以致害含有 *Bph II* 基因水稻品种(如 ASD7 和 IR36)的褐飞虱群体。在我国, 褐飞虱虫源主要是由中南半岛迁飞而来, 褐飞虱危害多为生物型 I、II 混合发生, 并且以生物型 II 为主^[6]。

目前, 抑制水稻害虫褐飞虱的惯用方法是喷洒化学杀虫剂, 而杀虫剂的使用不仅会增加农田的种植成本而且还会带来环境污染, 甚至稻谷上残留的杀虫剂还会对人类健康造成危害。同时杀虫剂的过量使用, 进一步加速了褐飞虱耐药性群体的发生^[7]。选育和种植水稻抗虫品种, 利用水稻自身抗性基因杀死害虫, 不仅能够解决上述问题, 而且还能够节约种植成本、保护环境。从长远角度来看, 防控褐飞虱最经济、有效、环保的方法是从水稻种质资源中挖掘褐飞虱抗性基因并将其转育至优良水稻品种中, 利用其自身的抗性达到降低褐飞虱引发的危害。迄今, 已定位了 33 个褐飞虱抗性基因, 其中显性基因 20 个、隐性基因 13 个, 定位在水稻连锁群上的有 27 个抗性基因^[8], 它们均来自籼稻和野生稻^[9], 成功克隆的只有 *Bph3*^[10]、*Bph14*^[11]、*Bph26*^[12]。自从 20 世纪 70 年代以来, 陆续有几个褐飞虱抗性基因应用于分子育种工程^[13], 取得了一定的效果。但褐飞虱群体在同一抗性品种上连续多代饲养后, 可能会出

收稿日期: 2015-04-25

基金项目: 国家“863”计划项目(2014AA10A604)

张志伟, 硕士研究生, 研究方向: 水稻基因工程。E-mail: 1051303586@qq.com

通信作者: 陈浩, 博士, 副教授, 研究方向: 水稻基因工程。E-mail: hchen@mail.hzau.edu.cn

现克服抗性基因的新种群。如 IR26(含 *Bph1* 抗性基因)是第 1 个推广的抗褐飞虱水稻品种,但在种植 3 a 之后,出现了能危害该品种的生物型 II 褐飞虱种群。包含 *Bph2* 基因的品种在栽培种植几年后,也发生了类似的情况,失去了抗性^[14]。包含单个抗性基因(如 *Bph1*, *bph2* 或 *bph4*)的改良品种在种植几年后,都失去了对褐飞虱的抗性性状^[15];而含有主效基因 *Bph1* 和几个微效 QTLs 的 IR64 被发现具有相对稳定的褐飞虱抗性,在菲律宾主要岛屿吕宋岛种植十几年仍具有抗性。这些研究表明,褐飞虱群体可以很容易地克服来自单个基因的抗性,但是,包含多基因或 QTLs 的品种也许能够解决该问题。因此,定位更多的褐飞虱抗性基因,将其整合到水稻品种中,尤其是含有微效抗性的粳稻品种是很有意义的^[16]。本研究通过 BR96 与白 56 构建 F₂ 群体,利用均匀分布于水稻全基因组的 122 对多态性引物标记分析 F₂ 群体的基因型,构建遗传连锁图谱,考查 F₂ 衍生的 F₃ 各家系的褐飞虱苗期抗性等级,检测水稻褐飞虱抗性数量性状位点(QTL)。

1 材料与方法

1.1 试验材料

褐飞虱抗源亲本 BR96 为普通野生稻与栽培稻杂交转育的后代、褐飞虱感源亲本粳稻恢系白 56,均为广西大学李荣柏教授提供。抗源 BR96 与感源白 56 杂交 1 次,自交 2 次,构建 BR96/白 56 重组自交系 F_{2:3} 群体,该群体共有 142 个家系。

1.2 抗虫鉴定

2014 年 5 月下旬,采用改进的苗期集团筛选法,对亲本 BR86、白 R56 及 F₂ 衍生的 F₃ 各家系进行褐飞虱苗期抗性鉴定。所有抗虫鉴定试验均在江西省农业科学院微生物研究所进行,褐飞虱虫源采集于江西省农业科学院水稻研究所试验田,饲养于温室内的 TN1 植株上,属于野生型混合褐飞虱种群,以生物型 II 为主。抗虫鉴定试验以 TN1 为感虫对照, RH 为抗虫对照。为保证各品种生长一致,所有试验材料分别浸种催芽,确保播种时每个品种的芽长度相近。将 F₃ 各家系、白 56 和 BR96 在塑料育苗盆(60 cm×40 cm×15 cm)中各播种 1 行,行距 3.0 cm,株距 1.0 cm,每个塑料育苗盆随机设置 1 行感虫 TN1 对照和 1 行抗虫 RH 对照,每行 20 株苗,待长到 2 叶 1 心至 3 叶期时,挑去死苗和弱苗,最后每份材料保留长势一致的 15 株苗。平均每株稻苗接 15 头左右的 2~3 龄的褐飞虱若虫,当感虫

对照 TN1 死亡率达 90% 以上时,统计各个品种的褐飞虱抗性等级,抗性等级的评价方法参考国际上统一的评价标准^[17],3 次重复。

1.3 基因型分析

采集 BR96/白 56 重组自交系 F₂ 群体单株鲜嫩的叶片提取 DNA。PCR 反应在 10 μL 的体系中进行,反应体系为:DNA 模板 1 μL;1 μmol/L 引物 2 μL;10 μmol/L dNTP 0.2 μL;10×PCR Buffer 1 μL;r*Taq* 0.1 μL;加双蒸水补足至 10 μL。PCR 反应程序:95℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 40 s,35 个循环;72℃ 延伸 7 min,25℃ 1 s。最后,每管 PCR 扩增产物中加入 3 μL 溴酚蓝在 4% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,用银染法检测,拍照并记录每株的基因型。

1.4 群体图谱和 QTL 分析

利用 700 对 SSR 引物在 BR96 与白 56 两亲本间筛选具有多态性的标记。再利用这些具有多态性的引物检测 F_{2:3} 群体中各个单株的基因型,并记录基因型数据。对基于普通野生稻 BR96/白 56 F_{2:3} 群体的基因型及表型数据,应用相关的分析软件检测该群体抗性的 QTL 及绘制遗传图谱^[16]。

2 结果与分析

2.1 亲本及 F₂ 衍生 F₃ 各家系苗期抗褐飞虱鉴定

当感虫对照 TN1 死亡率达 90% 以上时,开始调查各个材料的抗性级别,BR96 对褐飞虱的抗性等级分数是 2.9,白 56 抗性等级分数为 8.6, F₃ 的 142 份家系间褐飞虱抗性等级分数相差较大,在 2.0~9.0 间呈非规律地连续性分布(图 1)。

2.2 F_{2:3} 群体抗褐飞虱 QTL 定位结果

应用亲本 BR96 与白 56 间 122 对多态性标记,对 BR96/白 56 F₂ 家系进行基因型分析,然后结合普通野生稻 BR96/白 56 F₂ 衍生的 F₃ 各家系苗期褐飞虱抗性数据,利用 Map Maker/Exp 3.0 和 Windows QTL Cartographer 2.5 软件,进行 QTL 扫描,分别在第 3、4 和 6 号染色体上各扫描到 1 个抗褐飞虱 QTL 位点(表 1):*QBph3* 位于第 3 染色体 RM489-RM282 之间,LOD 值为 5.1,解释表型变异率是 3.8%;*QBph4* 位于第 4 号染色体 RM16605-RM16717 之间,LOD 值为 28.7,解释表型变异率是 29.4%;*QBph6* 位于第 6 号染色体 RM276-RM527 之间,LOD 值为 2.7,解释表型变异率是 7.1% (图 2)。3 个 QTL 的联合贡献率为 40.3%。

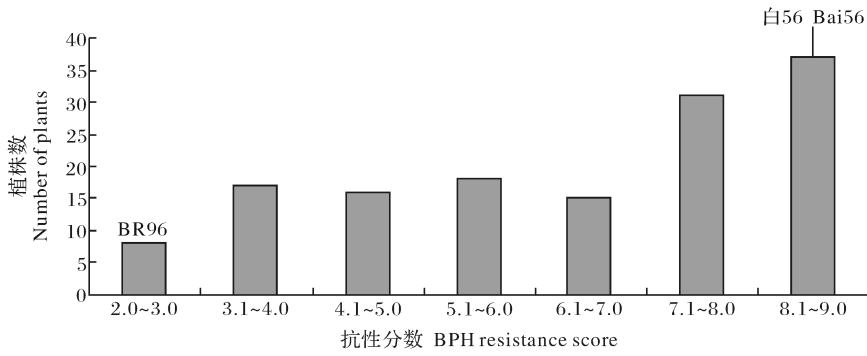


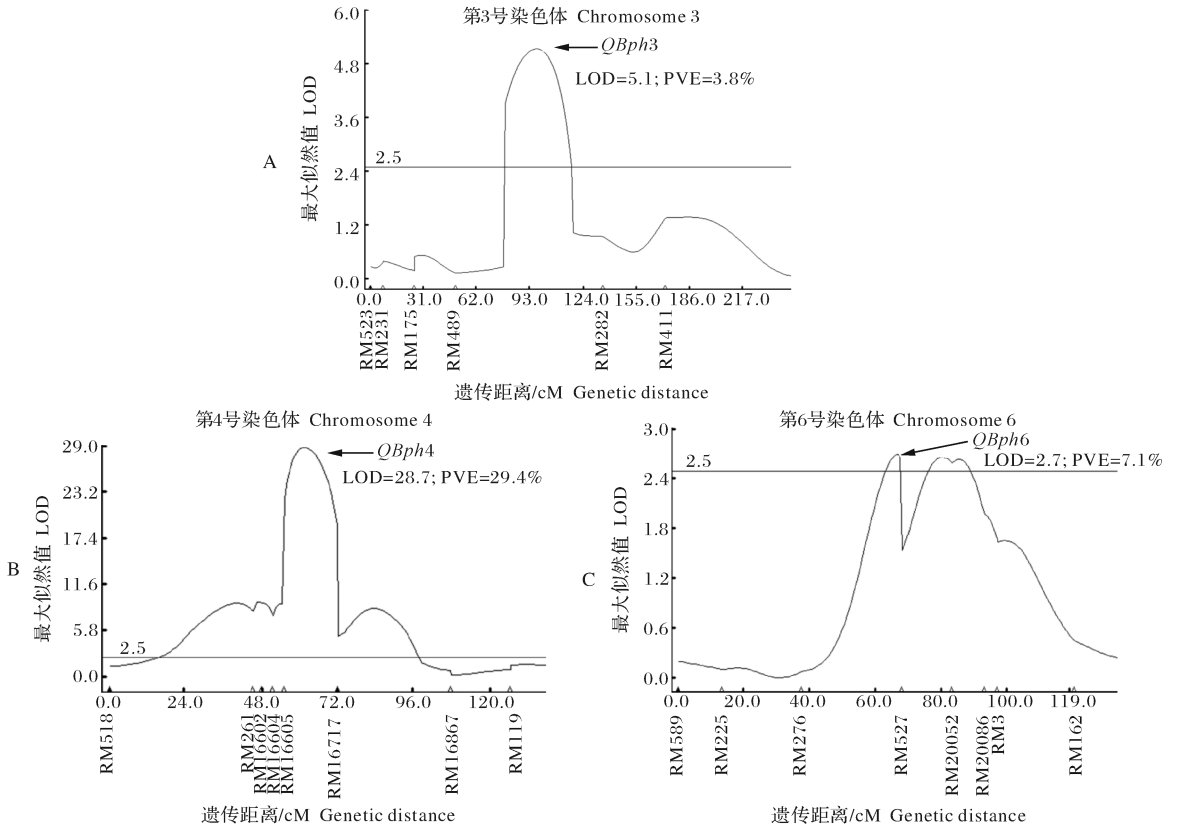
图 1 BR96/白 56 F_{2:3} 家系的抗性分数分布

Fig. 1 Frequency of the BPH resistance scores among F_{2:3} families of the cross between BR96 and Bai56

表 1 褐飞虱抗性 QTLs 分布

Table 1 Distribution of BPH resistance QTL

数量性状位点 QTLs	染色体 Chromosome	区间 Interval	最大似然值 LOD	表型变异贡献率/% PVE	加性效应 Add	显性效应 Dom
<i>QBph3</i>	3	RM489-RM282	5.1	3.8	-0.75	-0.09
<i>QBph4</i>	4	RM16605-RM16717	28.7	29.4	-2.18	0.68
<i>QBph6</i>	6	RM276-RM527	2.7	7.1	-0.49	0.67



A. *QBph3* 的位置和效应; B. *QBph4* 的位置和效应; C. *QBph6* 的位置和效应。A. Location and genetic of *QBph3*; B. Location and genetic of *QBph4*; C. Location and genetic of *QBph6*.

图 2 BR96 褐飞虱抗性相关 QTL 的分布

Fig. 2 The distribution of resistant QTL to brown planthopper from BR96

3 讨 论

普通野生稻 BR96 对褐飞虱生物型 I、II、III、IV 4 种生物型均具有强烈的抗性,应用于褐飞虱抗性育种工作,具有重要的意义。在本研究中,褐飞虱抗源 BR96 与感源白 56 杂交构建重组自交系 F_{2:3} 群体,通过分析其基因型和苗期褐飞虱抗性数据,利用 Map Maker / Exp 3.0 和 Windows QTL Cartographer 2.5 软件,分别在第 3、4 和 6 号染色体扫描到 3 个 QTL: *QBph3*、*QBph4*、*QBph6*。*QBph4* 可解释表型变异率是 29.4%,具有明显的抗性效应,初步判断其可能是 1 个主效基因;*QBph3* 和 *QBph6* 表型变异解释率低,可能是 2 个微效基因。

QBph3 被定位在第 3 染色体长臂 RM489-RM282 之间。迄今,第 3 染色体上已经定位到了 4 个抗性基因,分别是 *bph11*、*Bph13(t)*、*Bph14*、*bph19(t)*^[18],其中 *bph11*、*Bph14* 分别被定位在第 3 染色体长臂的 G1318(3.7 cM)和 G1318 与 R1925 之间,与 *QBph3* 位置相近。*QBph3* 与 *bph11* 或 *Bph14* 是否为同一个基因还需要进一步验证。

第 4 号染色体上已经定位到了 10 个褐飞虱抗性基因:*Bph6*、*bph12*、*Bph12(t)*、*Bph15*、*Bph17*、*bph18(t)*、*Bph20(t)*、*bph22(t)*、*Bph27(t)*、*Bph27*^[18],第 4 染色体的长臂上有 *Bph6*、*bph12*、*Bph27(t)*、*Bph27*、*bph18(t)*;而 *bph22(t)*、*Bph12(t)*、*Bph15*、*Bph17*、*Bph20(t)* 被定位在第 4 染色体的短臂上。本研究中,*Qbph4* 位点在 SSR 标记 RM16605 7.1 cM 和 SSR 标记 RM16717 10.3 cM 的区域。依据日本晴和 9311 的已知序列,*QBph4* 距最近的 2 个标记的物理距离为 4.0 Mb。*QBph4* 与 *bph22(t)*、*Bph12(t)*、*Bph15*、*Bph17*、*Bph20(t)* 相距较远,而与 *Bph6*、*bph12*、*Bph27(t)*、*Bph27*、*bph18(t)* 相距较近。已知 *Bph6*、*bph12*、*Bph27(t)*、*Bph27*、*bph18(t)* 分别被定位在第 4 染色体长臂的 Y19-Y9、G271-R93、Q52-Q20、RM16846-RM16888、RM6506-RM273 区域,那么 *QBph4* 则可能定位于 *Bph6*、*bph12*、*Bph27(t)*、*Bph27*、*bph18(t)* 所在区域的附近,其是否是其中同一个褐飞虱抗性基因,还有待以后的精细定位、等位性验证、基因克隆等研究的验证。

QBph6 被定位在第 6 染色体短臂 RM276-RM527 的区域内,迄今,该染色体上定位到的褐飞虱抗性基因相对较少,只有 3 个褐飞虱抗性基因:

Bph3、*Bph4*、*Bph25(t)*,分别定位在第 6 染色体短臂 RM589-RM588、RM589-RM586、SHd3a-RM225^[19-21]。本研究中 *QBph6* 与 *Bph3*、*Bph4*、*Bph25(t)* 都位于第 6 染色体短臂区域内,相距较近,*QBph6* 效应值较小,其是否与 *Bph3*、*Bph4*、*Bph25(t)* 中其中某个基因是相同的,还有待后续试验的进一步验证。

参 考 文 献

- [1] 王传之,于洁,裴庆利,等.水稻品种抗稻褐飞虱育种的研究进展[J].安徽农业科学,2008,36(8):3170-3173.
- [2] WATANABE T, KITAGAWA H. Photosynthesis and translocation of assimilates in rice plants following phloem feeding by the planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae)[J]. Journal of Economic Entomology, 2000, 93(4): 1192-1198.
- [3] 都健,丁锦华.褐飞虱吸食量的估测[J].昆虫学报,1991,34(1):122-125.
- [4] 周亦红.褐飞虱生物型的研究[D].南京:南京农业大学图书馆,2003.
- [5] HEINRICH S. Perspectives and directions for the continued development of insect-resistant rice varieties[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 1986, 18(1): 9-36.
- [6] 黄凤宽,罗善昱.褐飞虱生物型的监测及其对鉴别品种致害性分析[J].西南农业大学学报,1998,20(5):427-431.
- [7] TANAKA K, ENDO S, KAZANO H. Toxicity of insecticides to predators of rice planthoppers: spiders, the mirid bug and the dryinid wasp[J]. Applied Entomology and Zoology, 2000, 35(1): 177-187.
- [8] 郭嗣斌,刘开强,李孝琼,等.小粒野生稻基因渗入系抗褐飞虱 QTL 定位[J].南方农业学报,2014,45(6):933-937.
- [9] RAHMAN M L, JING W, CHU S H, et al. High-resolution mapping of two rice brown planthopper resistance genes, *Bph20(t)* and *Bph21(t)*, originating from *Oryza minuta*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 119(7): 1237-1246.
- [10] LIU Y, WU H, CHEN H, et al. A gene cluster encoding lectin receptor kinases confers broad-spectrum and durable insect resistance in rice[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33: 301-305.
- [11] DU B, ZHANG W L, LIU B F, et al. Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(52): 22163-22168.
- [12] TAMYRA Y, HATTORI M, YOSHIOKA H, et al. Map-based cloning and characterization of a brown planthopper resistance gene *BPH26* from *Oryza sativa* L. ssp. indica cultivar ADR52 [J/OL]. Scientific Reports, 2014, 4: 1-8[2015-03-13]. <http://www.nature.com/srep/2014/140729/srep05872/metrics>. doi: 10.1038/srep05872.
- [13] 闫成业, MAMADOU G, 朱子建, 等. 分子标记辅助选择改良水

- 稻恢复系 R1005 的褐飞虱抗性[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(5):8-14.
- [14] ALAM S, COHEN M. Detection and analysis of QTLs for resistance to the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, in a doubled-haploid rice population [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97(8): 1370-1379.
- [15] JAIRIN J, PHENGRAT S, TEANGDEERITH S, et al. Mapping of a broad-spectrum brown planthopper resistance gene, *Bph3*, on rice chromosome 6 [J]. Molecular Breeding, 2007, 19(1): 35-44.
- [16] CHEN J W, WANG L, PANG X F, et al. Genetic analysis and fine mapping of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene *bph19* (t) [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2006, 275(4): 321-329.
- [17] 程明星. 水稻抗褐飞虱基因的遗传定位及在品种改良中的应用 [D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2013.
- [18] ALIM P, CHOWDHURY T R. Tagging and mapping of genes and QTLs of *Nilaparvata lugens* resistance in rice [J]. Euphytica, 2014, 195(1): 1-30.
- [19] KAWAGUCHI M, MURATA K, ISHII T, et al. Assignment of a brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene *bph4* to the rice chromosome 6 [J]. Breeding Science, 2001, 51: 13-18.
- [20] JAIRIN J, PHENGRAT S, TEANGDEERITH S, et al. Mapping of a broad-spectrum brown planthopper resistance gene, *Bph3*, on rice chromosome 6 [J]. Molecular Breeding, 2007, 19: 35-44.
- [21] YARA A, PHI C N, MATSUMURA M, et al. Development of near-isogenic lines for BPH(25t) and BPH(25t), which confer resistance to the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål in indica rice 'ADR52' [J]. Breeding Science, 2010, 60(5): 639-647.

Preliminarily mapping quantitative trait loci (QTLs) for brown planthopper resistance in the offspring of *Oryza rufipogin* Griff

ZHANG Zhiwei DUAN Lichao HUANG Changyuan LIN Yongjun CHEN Hao

*National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/National Center of Plant Gene Research (Wuhan),
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract The genetic linkage map was constructed by using one $F_{2:3}$ population of crossing BR96 with Bai56 and 122 molecular makers covering the whole rice genome. The quantitative trait loci (QTLs) for BPH resistance were identified based on marker genotypes and the phenotypes of BPH resistance in rice seedlings. Totally three QTLs for BPH resistance were detected. *QBph3* was detected in the long arm of chromosome 3 between the molecular markers RM489 and RM282, with a LOD value of 5.1 and explained 3.8% the phenotypic variation. *QBph4* was detected in the chromosome 4 between the molecular markers RM16605 and RM16717, with a LOD value of 28.7 and explained 29.4% the phenotypic variation. *QBph6* was detected in the short arm of chromosome 6 between the molecular markers RM276 and RM527, with a LOD value of 2.7 and explained 7.1% the phenotypic variation. Obviously, *QBph4* with the largest effect among three identified QTLs may be a major QTL for BPH.

Keywords *Oryza rufipogin* Griff; recombinant inbred line (RIL); brown planthopper; QTL; genetic linkage map; gene mapping

(责任编辑: 张志钰)