

曾生元, 龚红兵, 李 闯, 等. 镇粮 232 的抗飞虱特性与育种利用[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(3): 676-678.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2013.03.038

## 镇粮 232 的抗飞虱特性与育种利用

曾生元, 龚红兵, 李 闯, 林添资, 景德道, 盛生兰  
(江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏 句容 212400)

关键词: 稻飞虱; 抗性基因; 分子标记辅助选择; *bph2*

中图分类号: S511.2+203.54 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2013)03-0676-03

## Resistance rice Zhenxian232 to rice planthopper and its application

ZENG Sheng-yuan, GONG Hong-bing, LI Chuang, LIN Tian-zi, JING De-dao, SHENG Sheng-lan  
(Zhenjiang Institute of Agricultural Sciences of the Ning-Zhen Hilly District, Jurong 212400, China)

Key words: rice planthopper; resistant gene; marker-assisted selection; *bph2*

稻飞虱是亚洲稻区的主要害虫之一, 对其防治主要依赖于高效化学杀虫剂的使用, 这对防治稻飞虱虽然起到了一定作用, 但长期使用杀虫剂导致飞虱的抗药性增强、天敌减少、飞虱再猖獗, 另外, 化学药剂的过度使用还会造成严重的环境污染。利用寄主抗性培育抗飞虱品种被认为是防治其危害最经济、有效的途径, 因此, 水稻育种家们努力寻找稻飞虱抗源, 以期培育抗虫品种。

近年来, 水稻抗褐飞虱基因(主效基因)的发掘、定位及克隆工作取得了较大进展, 目前已鉴定的抗褐飞虱基因超过 30 个<sup>[1]</sup>, 多个抗褐飞虱基因已经被精细定位, 其中 *Bph14* 及 *Bph18* 基因已成功克隆<sup>[2]</sup>; 有 8 个有白背飞虱基因<sup>[3]</sup> 及少数几个抗灰飞虱基因<sup>[4]</sup> 也已被定位。然而, 目前鉴定的抗源大多数为野生稻和印度次大陆及东南亚的农家品种, 其本身的综合农艺性状差, 将有利抗性基因转育到当前品种中所需周期较长; 此外, 从原始材料鉴定、定位及进一步精细定位一个抗飞虱基因所需周期也较长, 例如对 *Bph14* 基因的克隆耗时

14 年<sup>[5]</sup>; 而飞虱种群的生物型变异丰富, 单个基因的抗性易随飞虱生物型的变化而逐渐消失。因此, 从推广品种中寻找综合抗性好的材料并将其中的抗性基因采用分子标记辅助选择导入目标品种, 结合田间抗性鉴定培育抗性品种具有重要的实践价值。

此前的抗性鉴定初步表明, 籼稻品种镇粮 232 是高抗褐飞虱品种, 其对白背飞虱及灰飞虱的发生也具有抑制作用, 综合性状优良<sup>[6]</sup>。为了探明镇粮 232 对稻飞虱的抗性特性, 我们对镇粮 232 进行了稻飞虱抗性鉴定, 构建镇粮 232/武育梗 3 号 F<sub>2</sub> 群体, 检测、分析其与褐飞虱抗性相关的基因位点, 并采用分子标记辅助选择改良镇恢 084 的抗飞虱特性, 以期为培育对飞虱具有综合抗性的杂交稻提供材料基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

抗飞虱品种镇粮 232(江苏丘陵地区镇江农业科学研究所培育), 对照 IR36、IR26(江苏丘陵地区镇江农业科学研究所保存), 镇恢 084(江苏丘陵地区镇江农业科学研究所培育), 感虫亲本 TN1(引自扬州大学)、武育梗 3 号(常规梗稻品种)。

#### 1.2 抗虫鉴定

供试材料抗飞虱特性鉴定采用徐红星等<sup>[7]</sup>方法, 略有改动。2010 年 5 月上旬将上述材料浸种、催芽后, 播种于 5 m ×

收稿日期: 2012-08-09

基金项目: 镇江市农业科学研究所科研基金项目(ZJS2010002); 江苏省成果转化项目(BA2010140)

作者简介: 曾生元(1984-), 男, 江西赣州人, 硕士, 研究实习员, 从事水稻重要性状的遗传与育种研究。(E-mail) vicentceng@126.com

通讯作者: 盛生兰, (Tel) 0511-87265416; (E-mail) shengshenglan@ sina.com

1 m 的水泥池内,用 200 目纱网罩住,每处理 2 行,  $F_2$  群体 10 行,每行播种 50 粒,行距 5 cm,用感虫品种武育梗 3 号播于试验区周围作保护行。待苗至二叶一心时,去除弱苗,定苗至每行 30 苗,按每苗 5~7 头稻飞虱接虫,重复 3 次。不施用任何对稻飞虱有影响的农药,保护行多施 1 次氮肥,以诱发稻飞虱发生。接种后统计每苗上的稻飞虱数量与类型。

由于徐红星等提出的抗性评价标准<sup>[7]</sup>较为粗放,在此基础上参照刘光杰等标准<sup>[8]</sup>予以细化:当感虫对照品种 TN1 死苗率达到 95.0% 时,根据死苗率评定抗性级别。评价标准为:死苗率  $\leq 1.0\%$ , 级别为 0, 免疫;死苗率 1.1%~10.0%, 级别为 1, 高抗;死苗率 10.1%~30.0%, 级别为 3, 抗;死苗率 30.1%~50.0%, 级别为 5, 中抗;死苗率 50.1%~70.0%, 级别为 7, 中感;死苗率  $\geq 70.1\%$ , 级别为 9, 感。

### 1.3 分子标记检测

根据系谱分析与田间抗性鉴定的结果,参照 Sun 等<sup>[9]</sup> 研究结果,获得与 *bph2* 紧密连锁的标记,对镇粳 232 的主效抗性基因进行检测和分子标记辅助选择。

### 1.4 DNA 提取和 PCR 扩增、电泳检测

参考 McCouch 等<sup>[10]</sup> 的方法提取水稻苗期叶片的 DNA。PCR 反应体系(总体积 20.0  $\mu\text{l}$ ):  $10\times\text{Buffer}$ (含  $\text{MgCl}_2$ ) 2.0  $\mu\text{l}$ , 10 mmol/L dNTPs 1.2  $\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$  正、反向引物各 0.3  $\mu\text{l}$ , 5 U/ $\mu\text{l}$  *Taq* 酶 0.2  $\mu\text{l}$ , 100 ng/ $\mu\text{l}$  DNA 模板 1.0  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 15.0  $\mu\text{l}$ 。扩增反应程序:94  $^{\circ}\text{C}$  下预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  下变性 30 s, 55~60  $^{\circ}\text{C}$  下退火 40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  下延伸 1 min, 循环 35 次;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  下再延伸 5 min。扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染检测读取结果后拍照或扫描保存。

## 2 结果

### 2.1 镇粳 232 的抗飞虱特性

通过田间采集飞虱,3 种飞虱(褐飞虱、灰飞虱、白背飞虱)分类饲养 1 至 2 代后分别以 8 头/丛稻株接种,在接种后第 10 d 飞虱种群进入高峰期,部分稻株飞虱数量逾百头,统计不同飞虱种群的数量发现褐飞虱占大多数,灰飞虱约占 10.0%,白背飞虱占 5.0%。表明,目前生产上前期主要还是褐飞虱危害,灰飞虱及白背飞虱危害较轻。

只含有 *Bph1* 基因的 IR26 中感褐飞虱,具有抗性基因 *bph2* 的 IR36 仍具有很高的抗性水平,鉴于 2 个基因对不同褐飞虱生物型的抗性特征,说明目前褐飞虱种群特性以生物型 2 为主,生物型 1 较少;镇粳 232 比 IR36 的抗性水平略高,镇恢 084 与 IR26 抗性相当,而武育梗 3 号高感飞虱。镇粳 232/武育梗 3 号  $F_1$  表现为抗,  $F_2$  抗性分离,接近 1/3 植株死亡。这些结果说明镇粳 232 的抗飞虱特性受 1 对显性主效基因控制,同时还具有一些微效的抗性基因。

### 2.2 镇粳 232 的抗褐飞虱主效基因的来源及其验证

分析镇粳 232 的系谱可以发现,镇粳 232 的双亲为湘早

灿 3 号(含 IR36 血统)及 IR54,因此镇粳 232 可能携带了双系的抗性主基因 *bph2*,并且聚合了双亲的微效主基因。用 IR36、镇粳 232、武育梗 3 号、TN1 进行验证,发现镇粳 232 与 IR36 有一致的谱带。综合以上结果说明镇粳 232 含有抗褐飞虱主效基因 *bph2*。

### 2.3 镇粳 232 的育种利用

2009 年正季利用配合力好的优良恢复系镇恢 084(含有 *Bph1* 基因)为母本,镇粳 232 为父本杂交,2009 冬在海南种植  $F_1$ ,并混收  $F_2$  种子。2010 年正季种植  $F_2$  群体,根据田间综合农艺性状选择 37 个优良单株,提取选择单株的 DNA,利用标记 *RM463*、*RM7102* 进行检测筛选,淘汰不含 *bph2* 基因的单株,保留含 *bph2* 基因(包括杂合型)的单株 21 个。2010 年冬海南加代种植  $F_3$  株系,根据田间综合农艺性状结合分子标记辅助选择获得 7 个含 *bph2* 基因单株,中选单株于 2011 年正季在句容种成  $F_4$  小区,每个小区种植 100 株。苗期去除病苗,采用徐红星等<sup>[7]</sup> 方法田间鉴定当选群体的抗性水平。

结果显示,虽然田间鉴定受到一定的环境影响导致抗性水平略有差异,在经过多代分子标记辅助选择结合田间选择之后,目标单株的抗飞虱特性仍能保留,说明采用 *bph2* 两端的连锁标记选择有效,可大大减少重复鉴定的时间及精力。

## 3 讨论

常规育种手段根据田间表型选择后代,难以将多个有利的目标基因聚合到同一个体,并使这些基因在后代中稳定传递、不丢失。在找到与抗病虫基因紧密连锁或共分离分子标记的基础上,借助分子标记辅助选择(Marker-assisted selection)技术可有效地选择抗虫有利基因和 QTL 的聚合,排除环境因素的干扰,提高选择的精确性,并可大大减少田间鉴定的工作量。之前在水稻抗病基因聚合育种研究方面已有很多报道:潘学彪等<sup>[11]</sup> 通过分子标记辅助选择将来自镇粳 88 的抗条纹叶枯病基因 *Stw-bi* 导入优质食味品种武育梗 3 号,选育出新的抗性品种武陵梗 1 号;Jiang 等<sup>[12]</sup> 聚合 *Xa21* 和 *Bt* 基因到恢复系明恢 63 中;倪大虎等<sup>[13]</sup> 利用分子标记辅助选择将广谱高抗稻瘟病的 *Pi9* 基因和高抗白叶枯病的 *Xa21* 基因聚合到优良品系中,获得了含双抗基因的一批优良新品系。

迄今已精细定位了多个抗褐飞虱基因,少数基因已成功克隆,这些研究结果为水稻分子标记辅助选择具有持久抗飞虱特性的品种提供了理论基础和实践支撑。然而,截止到目前,对水稻抗褐飞虱的分子育种大多处于理论研究阶段<sup>[14-15]</sup>,对灰飞虱及白背飞虱的抗性育种研究尚处于空白阶段。原因可能是由于稻飞虱种群较多,年份间差异较大,水稻抗飞虱鉴定易受环境和其他外界因素影响,无论是苗期、分蘖期、成熟期鉴定水稻的抗飞虱能力,都需要比较高的试验条件,需要投入较多的人力、精力,而实际工作中往往较

难满足。另外,目前鉴定的抗源多数为野生稻或籼型原始材料,综合农艺性状、配合力较差,且单个基因的抗性效果不佳,应用价值不高。因此,直接从推广品种中挖掘抗性水平高的资源,分析其抗性基因,再借助分子生物学手段将其中的抗性基因导入当前主栽品种,可以缩短育种年限,提高有利基因的利用效率。本研究发现水稻品种镇粳232高抗褐飞虱,对白背飞虱也具有一定抗性,进一步通过系谱分析、抗性鉴定、分子标记检测等发现该品种含有抗褐飞虱基因 *bph2*。选择含有抗褐飞虱基因 *Bph1* 的优良恢复系镇恢084为受体,通过1次杂交,将 *bph2* 导入镇恢084,分子标记辅助选择结合田间综合农艺性状的选择,采用接近生产的抗性鉴定方法,在简化操作的同时获得了高抗稻飞虱的聚合材料,为改良杂交水稻的抗飞虱特性提供了有价值的中间材料。

致谢: 本试验得到扬州大学农学院李荣德同学及扬州大学植物保护学院石兆鹏同学的无私帮助,再此深表感谢!

#### 参考文献:

- [1] 曾生元,龚红兵,刁立平,等. 水稻抗褐飞虱基因及其在分子育种中的应用[J]. 分子植物育种, 2011(9):1749-1758.
- [2] JENA K K, KIM S M. Current status of brown planthopper (BPH) resistance and genetics[J]. Rice, 2010, 3: 161-171.
- [3] TAN G X, WENG Q M, REN X, et al. Two whitebacked planthopper resistance genes in rice share the same loci with those for brown planthopper resistance[J]. Heredity, 2004, 92(3): 212-217.
- [4] 段灿星,程治军,雷才林,等. 利用 Mudgo/武育梗3号 F<sub>2</sub> 群体分析水稻抗灰飞虱 QTL[J]. 作物学报, 2009, 35(3): 388-394.
- [5] 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]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(52): 2163-2168.
- [6] 胡春明,盛生兰,刁立平,等. 镇粳232的选育、主要特征特性及栽培要点[J]. 江苏农业科学, 1996(5):13-15.
- [7] 徐红星,吕仲贤,陈桂华,等. 一种田间评价水稻抗稻飞虱特性的方法:中国,201010162757[P]. 2010-04-30.
- [8] 刘光杰,付志红,沈君辉,等. 水稻品种对稻飞虱抗性鉴定方法的比较研究[J]. 中国水稻科学, 2002, 16(1): 52-56.
- [9] SUN L H, WANG C M, SU C C, et al. Mapping and marker-assisted selection of a brown planthopper resistance gene *bph2* in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(8): 717-723.
- [10] MCCOUCH S R, KOCHERT G, YU Z H, et al. Molecular mapping of rice chromosomes[J]. Theor Appl Genet, 1988, 76: 815-829.
- [11] 潘学彪,陈宗祥,左示敏,等. 以分子标记辅助选择育成抗条纹叶枯病水稻新品种“武陵梗1号”[J]. 作物学报, 2009, 35(10): 1851-1857.
- [12] JIANG G H, XU C G, TU J M, et al. Pyramiding of insect and disease resistance genes into an elite indica cytoplasm male sterile restorer line of rice Minghui 63[J]. Plant Breeding, 2004, 123: 112-116.
- [13] 倪大虎,易成新,李莉,等. 利用分子标记辅助选择聚合水稻基因 *Xa21* 和 *Pi9(t)* [J]. 分子植物育种, 2005, 30(3): 329-333.
- [14] 李进波,夏明元,戚华雄,等. 水稻抗褐飞虱基因 *Bph14* 和 *Bph15* 的分子标记辅助选择[J]. 中国农业科学, 2006, 39(10): 2132-2137.
- [15] 梁云涛,王春连,赖凤香,等. 水稻抗褐飞虱基因 *Bph18(t)* 的 STS 标记开发及有效性验证[J]. 中国水稻科学, 2010, 24(3): 244-250.

(责任编辑:袁伟)