

## 两个水稻抗褐飞虱隐性基因的遗传分析与初步定位

侯丽媛<sup>1,2</sup> 于萍<sup>1</sup> 徐群<sup>1</sup> 袁筱萍<sup>1</sup> 余汉勇<sup>1</sup> 王一平<sup>1</sup> 王彩红<sup>1</sup> 万国<sup>1,2</sup>

彭锁堂<sup>2,\*</sup> 魏兴华<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310006; <sup>2</sup>山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801; \* 通讯联系人, E-mail: xwei@mail.hz.zj.cn)

### Genetic Analysis and Preliminary Mapping of Two Recessive Resistance Genes in Rice to Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*

HOU Li-yuan<sup>1,2</sup>, YU Ping<sup>1</sup>, XU Qun<sup>1</sup>, YUAN Xiao-ping<sup>1</sup>, YU Han-yong<sup>1</sup>, WANG Yi-ping<sup>1</sup>, WANG Cai-hong<sup>1</sup>, WAN Guo<sup>1,2</sup>, PENG Suo-tang<sup>2,\*</sup>, WEI Xing-hua<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; <sup>2</sup>College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; \* Corresponding author, E-mail: xwei@mail.hz.zj.cn)

HOU Liyuan, YU Ping, XU Qun, et al. Genetic analysis and preliminary mapping of two recessive resistance genes in rice to brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(4): 367-371.

**Abstract:** An F<sub>2</sub> population was derived from the cross of the brown planthopper resistant line WB01, an introgression line of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) from Hainan Province, China and the susceptible indica cultivar 9311. The population with 303 lines was genotyped using 141 simple sequence repeat (SSR) markers and used for gene mapping. Two softwares, MapMaker/Exp 3.0 and Windows QTL Cartographer 2.0 were applied to detect QTLs. Totally, two QTLs on chromosomes 4 and 8 were detected. Each of these QTLs individually explained 11.3% and 14.9% of the phenotypic variations, respectively.

**Key words:** brown planthopper; *Oryza rufipogon*; resistance gene; quantitative trait locus; gene mapping

侯丽媛, 于萍, 徐群, 等. 两个水稻抗褐飞虱隐性基因的遗传分析与初步定位. *中国水稻科学*, 2010, 24(4): 367-371.

**摘要:** 选用抗褐飞虱的海南普通野生稻渗入系 WB01 与感虫品种 9311 杂交, 构建 F<sub>2</sub> 群体。采用 141 个具有多态性的 SSR 标记对 303 个 F<sub>2,3</sub> 株系进行分析, 并应用 MapMaker/EXP 3.0 和 Windows QTL Cartographer 2.0 对水稻抗褐飞虱的数量性状基因座进行检测和遗传效应分析。共检测到 2 个抗性 QTL, 分别位于第 4 和第 8 染色体上, LOD 值分别为 2.92 和 3.15, 贡献率分别为 11.3% 和 14.9%。

**关键词:** 褐飞虱; 普通野生稻; 抗性基因; 数量性状基因座; 基因定位

**中图分类号:** Q943.2; S511.034

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-7216(2010)04-0367-05

褐飞虱 (*Nilaparvata lugens* Stål) 是一种以稻属为食的单食性昆虫, 为亚洲国家主要水稻害虫<sup>[1]</sup>。近年来, 我国褐飞虱发生呈加重态势。全国农业技术推广服务中心病虫测报站的资料表明, 2006 年全国褐飞虱发生面积达 2576.5 万 hm<sup>2</sup>, 成灾 20 万 hm<sup>2</sup>, 损失稻谷 188 万 t, 其中又以浙江、江苏、安徽等省最为严重<sup>[2]</sup>。一直以来, 化学防治都是减轻褐飞虱危害的主要途径, 但是农药等化学药剂的广泛使用不但诱使褐飞虱产生了抗药性, 还对环境造成了污染和破坏<sup>[3-4]</sup>。实践证明, 利用水稻品种自身的抗性是防治褐飞虱危害经济而有效的途径<sup>[5]</sup>。

自 20 世纪 70 年代以来, 国内外相继开展了水稻褐飞虱抗性基因的发掘工作。迄今已确认和报道的水稻抗褐飞虱基因共 24 个, 其中 14 个为显性基因, 10 个为隐性基因, 至少定位了 19 个褐飞虱主效

抗性基因<sup>[6-7]</sup>。此外还鉴定了一些重要的抗性 QTL<sup>[8-9]</sup>。其中抗褐飞虱的基因共有 11 个来自于野生稻, 分别是来源于澳洲野生稻 (*Oryza australiensis*) 的 *Bph10*<sup>[10]</sup> 和 *Bph18* (t)<sup>[11]</sup>; 来源于阔叶野生稻 (*O. latifolia*) 的 *Bph12* (t)<sup>[12]</sup>, 来源于紫穗野生稻 (*O. eichingeri*) 的 *Bph13*<sup>[13]</sup>, 来源于药用野生稻 (*O. officinalis* Wall.) 的 *bph12*<sup>[14]</sup>、*Bph14*<sup>[15]</sup>、*Bph15*<sup>[8]</sup>、*Bph16*<sup>[16]</sup>、*Bph17*<sup>[17]</sup>, 以及来源于小粒野生稻 (*O. minuta*) 的 *Bph20* (t) 和 *Bph21* (t)<sup>[18]</sup>。由此可见, 野生稻是防治病虫害的天然有益基因库, 充分利用野生稻的这些有利基因

**收稿日期:** 2009-08-27; **修改稿收到日期:** 2010-01-26。

**基金项目:** 中央级公益性科研院所专项资金资助项目 (2009RG001-3); 农业部农业野生植物资源保护专项资助项目; 浙江省农业重大科技项目 (2007C12073)。

可大大拓宽现有栽培品种的遗传基础<sup>[19-20]</sup>。引入野生稻的抗性基因,对培育抗病虫害的新品种和减少农药用量、保护环境具有重要意义<sup>[21-23]</sup>。

本研究以抗褐飞虱的海南普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.) 渗入系 WB01 与感褐飞虱品种 9311 杂交获得的 F<sub>2,3</sub> 株系为试验材料,通过改进苗期集团筛选法(MSST)进行抗褐飞虱鉴定,根据 F<sub>2,3</sub> 株系的表型平均值和表型变异度推测 F<sub>2</sub> 对应单株的抗性,结合 F<sub>2</sub> 群体构建的分子标记连锁图谱,进行水稻褐飞虱抗性的遗传分析与基因定位。本研究旨在寻找与水稻抗褐飞虱基因相连锁的 SSR 分子标记,进而深入剖析水稻抗褐飞虱的抗性遗传规律,以期为分子标记辅助育种和基因克隆奠定基础。

## 1 材料与与方法

### 1.1 供试材料

本研究所用材料 WB01 是抗褐飞虱的海南普通野生稻与感虫恢复系明恢 63 的渗入系(明恢 63/海南普通野生稻//明恢 63),与感虫品种籼稻 9311 于 2006 年杂交得到 F<sub>1</sub>,2007 年自交获得 F<sub>2</sub>,随机选取 303 个 F<sub>2</sub> 单株构建分离遗传群体。2008 年春季在海南每个 F<sub>2</sub> 单株自交得 F<sub>2,3</sub> 株系。

### 1.2 抗褐飞虱鉴定

2008 年夏季,采用改进的苗期集团筛选法<sup>[24]</sup>对亲本 WB01、9311 及其 F<sub>1</sub> 和 F<sub>2,3</sub> 株系分别进行褐飞虱抗性鉴定。鉴定所用褐飞虱为杭州地区田间种群,褐飞虱生物型以 1 型和 2 型为主<sup>[25]</sup>。为确保各品种(株系)生长一致,所有供试材料分别浸种催芽。每个品种(株系)播于玻璃温室鉴定圃内,每个小区 10 个品种(株系)加 4 个对照(Mudgo、IR26、ASD7 为抗性对照,TN1 为感虫对照),每品种(株系)1 行 15 株苗。设两次重复,完全随机排列。待苗长到 2 叶 1 心时,平均每苗接入 1~2 龄褐飞虱若虫 8~10 头。当感虫品种 TN1 死苗率达 70% 时,逐日记载各品种的死苗数,至 TN1 全部枯死时评定各品种受害等级<sup>[26]</sup>,褐飞虱抗性鉴定按照中国水稻研究所评价标准进行<sup>[27]</sup>。

### 1.3 SSR 分析

参考郑康乐等<sup>[28]</sup>的 DNA 微量提取法,采集苗期鲜嫩叶片,进行 DNA 的提取和纯化。PCR 扩增条件如下:10 μL 反应体积,含 10×PCR buffer 1.0 μL,2 mmol/L dNTP 1.0 μL,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.0 μL,10 μmol/L 正、反 SSR 引物各 0.6 μL,

Taq 聚合酶(5 U/μL) 0.1 μL,20 ng 模板 DNA。应用 MJ Research 公司的 PTC-100 进行 PCR 扩增,94℃ 下预变性 2 min;94℃ 下变性 45 s,根据不同引物的退火温度分别在 50℃、55℃、61℃、67℃ 下退火 45 s,72℃ 下延伸 1 min,30 个循环;最后 72℃ 下延伸 8 min。PCR 扩增产物在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上恒压电泳,最后用银染法<sup>[29]</sup> 检测并拍照。

### 1.4 混合 DNA 池的构建

参照 Michelmores 等<sup>[30]</sup> 提出的 BSA 法,依据 F<sub>2,3</sub> 株系的抗性鉴定结果推测 F<sub>2</sub> 对应单株的抗性,选取 F<sub>2</sub> 极端抗虫单株和感虫单株各 12 株,分别抽提 DNA 并等量混合,建成 DNA 抗虫池和感虫池,用于筛选与目的基因连锁的分子标记。

### 1.5 连锁图谱的构建及 QTL 分析

选取覆盖水稻全基因组的 586 对 SSR 引物(由上海生工生物工程技术有限公司合成)对亲本进行多态性筛选。再利用有多态性的引物检测 F<sub>2</sub> 群体各个单株的基因型。按照常规的 MapMaker 数据记录方法<sup>[31]</sup> 统计带型数据,并利用分析软件 MapMaker/Exp 3.0<sup>[32]</sup> 和 Windows QTL Cartographer 2.0 对 9311/WB01 F<sub>2</sub> 群体进行遗传作图和抗性 QTL 检测及遗传效应分析。将 LOD 值 2.0 作为阈值,若标记区间的 LOD>2.0,则认为该区间 LOD 值最高处对应的位点为 1 个抗褐飞虱的 QTL。采用 MapDraw 2.2<sup>[33]</sup> 软件绘制局部遗传连锁图谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 褐飞虱抗性鉴定与遗传分析

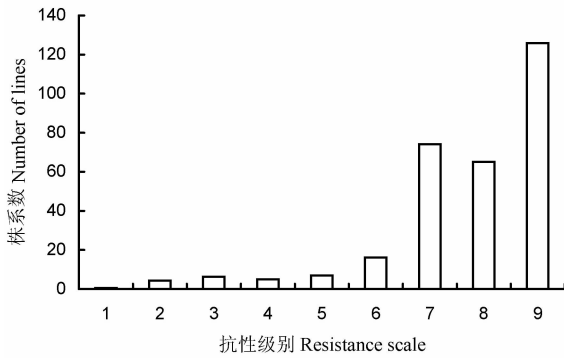
采用改进的苗期集团筛选法对两个亲本、F<sub>1</sub>、F<sub>2,3</sub> 株系及抗感对照品种进行抗褐飞虱鉴定,结果显示,亲本 WB01 表现抗虫(3 级),亲本 9311 表现感虫(9 级)。F<sub>1</sub> 全部不抗,F<sub>2,3</sub> 株系产生大量抗感分离,平均受害级别为 2.6~9.0,并呈连续分布,其中很多株系亦表现为感虫(图 1)。卡方检验表明,F<sub>2</sub> 群体抗感分离符合 1:15 的规律,WB01 对褐飞虱抗性受 2 对隐性基因控制(表 1)。

### 2.2 筛选与抗褐飞虱基因连锁的 SSR 标记

采用分离集团分析法筛选与抗褐飞虱连锁的 SSR 标记。选取分布在水稻 12 条染色体上的 586 对 SSR 引物,对亲本 WB01 和 9311 进行多态性筛选。结果发现有 141 对引物在亲本间存在多态性,比例为 24%;再选用这些引物对抗虫、感虫池进行

表 1  $F_{2,3}$  株系对褐飞虱的抗性遗传分析Table 1. Genetic analysis of brown planthopper resistance in the  $F_{2,3}$  generation.

供试材料	抗褐飞虱株系数	感褐飞虱株系数	比值	$\chi^2$	$P$
Rice material	Number of resistant lines	Number of susceptible lines	Ratio		
$F_{2,3}$	21	282	1 : 15	0.529	0.30—0.50

图 1 303 个  $F_{2,3}$  株系褐飞虱抗性级别的频率分布Fig. 1. Distribution of brown planthopper resistance scales of the 303 lines of  $F_{2,3}$  generation.

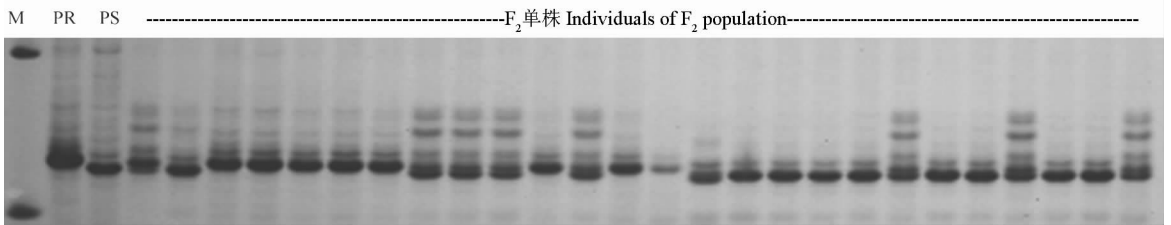
筛选,其中有 3 对引物在抗感池间表现出多态性,它们分别是位于第 4 染色体上的 RM261、RM8212 和第 8 染色体上的 RM2655。选用这 3 对特异性引物,并增加上述标记位置附近具多态性的 SSR 引物,对  $F_2$  群体进行 PCR 扩增。图 2、图 3 分别为位于第 4、第 8 染色体的引物 RM261 和 RM2655 在亲

本 WB01、9311 及部分  $F_2$  单株的 PCR 扩增结果。

利用 Windows QTL Cartographer 2.0 进行复合区间作图分析,在第 4 染色体和第 8 染色体上各检测到 1 个抗褐飞虱 QTL,分别位于标记 RM8212—RM261、RM2655—RM3572,LOD 值分别为 2.92 和 3.15,贡献率分别为 11.3% 和 14.9%。各 QTL 的加性效应推测结果显示,增强抗性的基因效应均来自于亲本 WB01,故我们暂将这两个抗性位点命名为 *bph22(t)* 和 *bph23(t)*。

### 3 讨论

野生稻是现代栽培水稻的祖先种,蕴含丰富的遗传变异。同时,它由于长期处于自然环境,经受了漫长的自然选择而生生不息,是天然的抗性基因库。所以通常认为,在野生稻中发现抗病虫害基因的几率要比在驯化的栽培稻中约大 50 倍,而且有的可能是某种病虫害的唯一抗源<sup>[34-35]</sup>。加之栽培稻抗虫资源的稀缺性,发掘野生稻抗虫基因就显得尤为重要。因此,野生稻抗褐飞虱种质的发掘、鉴定和基

图 2 亲本 WB01、9311 及部分  $F_2$  单株 RM261(第 4 染色体)的 PCR 扩增结果Fig. 2. Electrophoresis of PCR products of RM261 on chromosome 4 for parents and partial individuals of  $F_2$  population.

M—标准分子量; PR—抗虫亲本(WB01); PS—感虫亲本(9311)。图 3 同。

M, Molecular weight marker; PR, Resistant parent (WB01); PS, Susceptible parent (9311). The same as in Fig. 3.

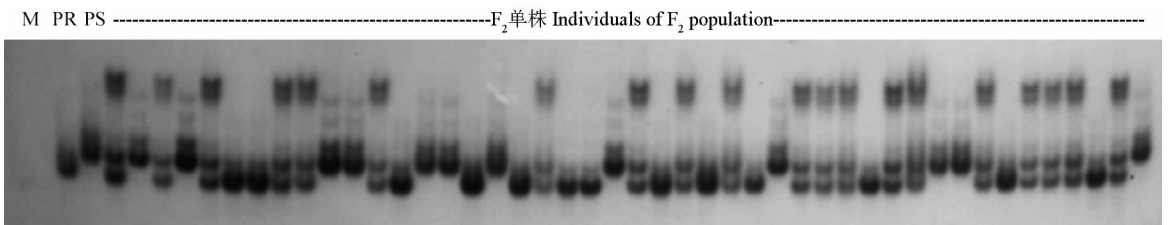
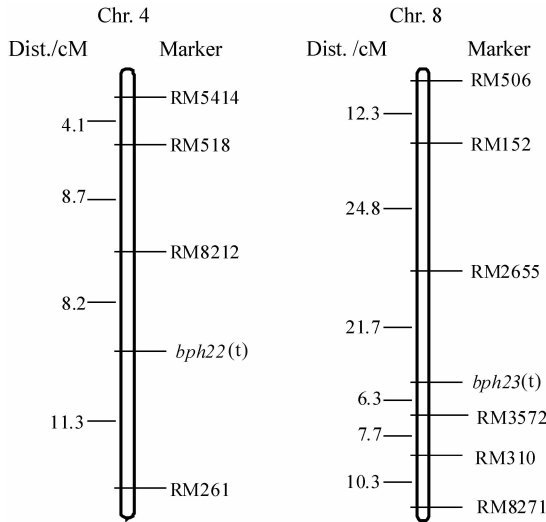
图 3 亲本 WB01、9311 及部分  $F_2$  单株 RM2655(第 8 染色体)的 PCR 扩增结果Fig. 3. Electrophoresis of PCR products of RM2655 on chromosome 8 for parents and partial individuals of  $F_2$  population.

表2 抗褐飞虱 QTL 定位结果

Table 2. Chromosomal locations of QTL for brown planthopper resistance.

QTL	标记区间 Marker interval	染色体 Chromosome	LOD	贡献率 Variance explained/%	加性效应 Additive effect
<i>bph22(t)</i>	RM8212 — RM261	4	2.92	11.3	-1.02
<i>bph23(t)</i>	RM2655 — RM3572	8	3.15	14.9	-1.46

图4 两个抗褐飞虱 QTL *bph22(t)* 和 *bph23(t)* 在水稻第4和第8染色体上的位置Fig. 4. Locations of two BPH-resistance QTLs *bph22(t)* and *bph23(t)* on rice chromosomes 4 and 8.

因分析是水稻抗褐飞虱分子育种的基础。

本研究结果表明,海南普通野生稻的渗入系WB01对褐飞虱的抗性受两对隐性基因 *bph22(t)* 和 *bph23(t)* 控制,分别位于第4和第8染色体上。在已报道的抗褐飞虱基因中,位于第4染色体上的隐性抗性基因分别为 *bph12*<sup>[14]</sup> 和 *bph18(t)*<sup>[36]</sup>,我们用 *bph22(t)* 分别与之进行比对,发现它们不在同一区域,且物理距离较远。吴昌军等<sup>[5]</sup>利用水稻DH群体在苗期对褐飞虱抗性的检测中,检测到在第8染色体上有一个抗性QTL,并定位于RM152和RM310区域。通过与已经发表的遗传图谱进行比较,本研究在第8染色体上检测到的 *bph23(t)* 也在RM152和RM310区域内。由此可以推测,吴昌军等<sup>[5]</sup>在第8染色体上检测到的抗性QTL与本研究检测到的位于RM310附近的QTL很可能在同一区域。但是否是同一抗性基因,尚需进一步的验证。

#### 参考文献:

[1] 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)*. *Mol Gen & Genomics*, 2006, 275: 321-329.

- [2] 国家统计局. 中国农业年鉴(2006). 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [3] 王彦华, 王鸣华. 褐飞虱抗药性及再猖獗研究进展. *农药*, 2006, 45(4): 227-231.
- [4] 姜辉, 林荣华. 稻飞虱的危害及再猖獗机制. *昆虫知识*, 2005, 42(6): 612-615.
- [5] 吴昌军, 姜恭好, 李信, 等. 利用DH群体动态检测水稻抗褐飞虱数量性状基因位点. *分子植物育种*, 2005, 3(4): 456-462.
- [6] 刘宇锋, 李容柏, 杨朗, 等. 水稻褐飞虱抗性基因研究进展. *广西农业科学*, 2007, 38(1): 11-15.
- [7] 黄得润, 龚俊义. 水稻抗褐飞虱与白背飞虱基因定位研究进展. *科技通报*, 2009, 25(4): 412-418.
- [8] Huang N, Parco A, Mew T W, et al. RFLP mapping of isozymes, RAPD and QTLs for grain shape, brown planthopper resistance in a doubled haploid rice population. *Mol Breeding*, 1997, 3(2): 105-113.
- [9] Alam S N, Cohen M B. Detection and analysis of QTLs for resistance to the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, in a doubled-haploid rice population. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 1370-1379.
- [10] Ishii T, Brar D S, Multani D S, et al. Molecular tagging of genes for brown planthopper resistance and earliness introgressed from *Oryza australiensis* into cultivated rice, *O. sativa*. *Genome*, 1994, 37: 217-221.
- [11] Jena K K, Jeung J U, Lee J H, et al. High-resolution mapping of a new brown planthopper (BPH) resistance gene, *Bph18(t)*, and marker-assisted selection for BPH resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 288-297.
- [12] Yang H Y, Ren X, Weng Q M, et al. Molecular mapping and genetic analysis of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene. *Hereditas*, 2002, 136: 39-43.
- [13] Liu G Q, Yan H H, Fu Q, et al. Mapping of a new gene for brown planthopper resistance in cultivated rice introgression from *Oryza eichingeri*. *Chinese Sci Bull*, 2001, 17: 1459-1462.
- [14] Hirabayashi H, Kaji R, Ogawa T. Identification and utilization of DNA markers linked to genes for resistance to brown planthopper (BPH) in rice. *Recent Adv Breeding*, 1999, 41: 71-74.
- [15] Renganayaki K, Fritz Allan K, Sadasivam S, et al. Mapping and progress toward map-based cloning of brown planthopper

- biotype-4 resistance gene introgressed from *Oryza officinalis* into cultivated rice, *O. sativa*. *Crop Sci*, 2002, 42: 2112-2117.
- [16] Yang H Y, Ren X, Weng Q M, et al. Molecular mapping and genetic analysis of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene. *Hereditas*, 2002, 136: 39-43.
- [17] Sharma P N, Ketippearachchi Y, Murata K, et al. PFLP/AFLP mapping of a brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene *Bph1* in rice. *Euphytica*, 2003, 129(1): 109-117.
- [18] Rahman M L, Jiang W Z, Chu S H, et al. High-resolution mapping of two rice brown planthopper resistance genes, *Bph20*(t) and *Bph21*(t), originating from *Oryza minuta*. *Theor Appl Genet*, 2009, 119(7): 1234-1246.
- [19] 颜辉煌, 熊振民. 紧穗野生稻的褐飞虱抗性导入栽培稻的研究. *遗传学报*, 1997, 24(5): 424-431.
- [20] 陈大洲, 邓仁根. 东乡野生稻抗寒基因的利用与前景展望. *江西农业学报*, 1998, 10(1): 65-68.
- [21] 蔡得田. 从几种野生稻花药中培养出单倍体植株. *华中农学院学报*, 1984, 3(1): 1-6.
- [22] 陈成斌, 李道远. 野生稻花药培养基研究. *西南农业学报*, 1993, 6(4): 16-20.
- [23] 凌定厚, 陈梅芳, 陈琬琰, 等. 某些单子叶植物幼嫩花序培养中外植体的直接出芽. *植物学报*, 1989, 31(4): 273-279.
- [24] 吴荣宗, 张良佑, 邱细广. 水稻品种抗褐飞虱筛选方法的研究. *植物保护学报*, 1984, 11(3): 145-152.
- [25] 刘国庆, 颜辉煌, 傅强. 栽培稻的紧穗野生稻抗褐飞虱主效基因的遗传定位. *科学通报*, 2001, 46(6): 738-742.
- [26] 陈建明, 俞晓平, 程家安, 等. 水稻新品种(系)对褐飞虱抗性的筛选及评价. *中国水稻科学*, 2005, 19(6): 573-576.
- [27] 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. *中国水稻科学*, 2002, 16(1): 52-56.
- [28] Zheng K L, Subudi P K, Domingo J, et al. Rapid DNA isolation for marker-assisted selection in rice breeding. *Rice Genet Newsl*, 1995, 12: 255-258.
- [29] Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of a microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*O. sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 1996, 252: 597-607.
- [30] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis; A rapid method to detect markers in specific regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9828-9832.
- [31] Lincoln S, Daly M, Lander E S. Constructing Genetic Maps with MapMaker/Exp 3. 0. //Whitehead Institute Technical Report. Cambridge: Whitehead Institute, 1992.
- [32] Lander E, Green P, Abrahamson J. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, 1: 174-181.
- [33] Liu R H, Meng J L. MapDraw: A microsoft excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data. *Hereditas*, 2003, 25(3): 317-321.
- [34] Heinrichs E A, Medrano F G, Rapusas H R. Genetic Evaluation for Insect Resistance in Rice. Manila, Philippines: IRRI, 1985.
- [35] Vaughan D A. The Wild Relatives of Rice. Manila, Philippines: IRRI, 1994: 13.
- [36] 李容柏, 李丽淑, 韦素美, 等. 普通野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 抗稻褐飞虱新基因的鉴定与利用. *分子植物育种*, 2006, 4(3): 365-371.