

# 水稻抗白背飞虱新基因W bph6 (t) 的定位初报

马良勇 庄杰云 刘光杰 闵绍楷 李西明\*

(中国水稻研究所, 浙江 杭州 310006; \*通讯联系人, E-mail: zaodaozu@fy. hz. zj. cn)

## Mapping of a New Gene *W bph6 (t)* Resistant to Whitebacked Planthopper (*Sogatella furcifera* Horvath) in Rice

MA Liang-yong, ZHUANG Jie-yun, LU Guang-jie, MIN Shao-kai, LI Xi-ming\*

(China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; \*Corresponding author, E-mail: zaodaozu@fy. hz. zj. cn)

**Abstract:** An rice population consisting of 90 F<sub>3</sub> lines from TN1/Guiyigu was employed to analyze linkage between DNA markers and a new gene *W bph6 (t)* conferring resistance to the whitebacked planthopper. Using the mapping approach of bulked extremes and recessive class, *W bph6 (t)* was mapped onto the short arm of chromosome 11 of rice, with a genetic distance of 21.2 cM to SSLP marker RM 167.

**Key words:** rice; whitebacked planthopper; resistance; gene mapping; simple sequence length polymorphism

**摘要:** 应用由 90 个株系组成的 TN1/鬼衣谷 F<sub>3</sub> 群体, 分析了水稻抗白背飞虱新基因 *W bph6 (t)* 与 DNA 标记的连锁关系。应用隐性极端群体法, 将 *W bph6 (t)* 定位于第 11 染色体短臂, 与 SSLP 标记 RM 167 的遗传距离为 21.2 cM。

**关键词:** 水稻; 白背飞虱; 抗性; 基因定位; 简单序列重复多态性

中图分类号: Q943; S511.032

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2002)01-0015-04

白背飞虱 (*Sogatella furcifera*) 是我国和东南亚水稻产区的主要害虫之一, 发掘和鉴定抗白背飞虱材料, 选育抗白背飞虱品种一直是水稻育种的目标之一。迄今为止, 已发现和命名了 5 个抗白背飞虱基因: *W bph1*、*W bph2*、*W bph3*、*w bph4* 和 *W bph5*, 除 *w bph4* 为隐性遗传外, 另 4 个均表现为显性遗传<sup>1-5</sup>。我们自 1984 年起对我国的白背飞虱抗源材料进行遗传分析, 发现水稻地方品种鬼衣谷、便谷、大齐谷和大花谷对白背飞虱的抗性, 由 1 个等位的显性抗性基因控制, 并与 5 个已命名的抗性基因不等位, 将其暂命名为 *W bph6 (t)*<sup>6,7</sup>。本文报道了应用 DNA 标记定位 *W bph6 (t)* 的研究结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 水稻材料

所用的水稻群体为 TN1/鬼衣谷 F<sub>3</sub> 群体, 母本 TN1 为标准感虫品种, 父本鬼衣谷为携带 *W bph6 (t)* 的云南地方品种<sup>7</sup>。1998 年秋在杭州富阳中国水稻研究所试验场配置杂交组合, 1998 年冬~ 1999 年春在海南陵水种植亲本和 F<sub>1</sub> 单株, 1999 年夏在中国水稻研究所试验场种植 F<sub>2</sub>, 成熟期分单株收获种子, 将每个 F<sub>3</sub> 株系的种子各分成两份, 一份作抗虫鉴定, 另一份供 DNA 提取。

### 1.2 抗虫鉴定试验

抗虫性鉴定采用国际水稻研究所的“标准苗盘

法”<sup>8</sup>, 于 2000 年 6~ 7 月间完成。各供试材料的种子浸种催芽后, 播于 60 cm × 45 cm × 10 cm 的苗盘内, 每个 F<sub>3</sub> 株系播 1 行, 每行 25 株, 设 3 个重复; 同时, 每个苗盘种植感虫亲本 TN1 和抗虫亲本鬼衣谷, 3 个重复; 出苗后拔去弱苗。2 叶期每苗平均接入 7~ 8 头 1~ 2 龄的白背飞虱若虫, 每个苗盘上罩 60 cm 高的网罩, 以防止白背飞虱逃离。当感虫对照 TN1 苗 95% 枯死时, 观察记载亲本和各株系的抗感虫苗数(心叶枯卷株为感虫, 其余为抗虫)。试验用虫来自网室内 TN1 苗上饲养的 1~ 2 龄若虫。

### 1.3 DNA 标记分析

亲本材料于 1999 年种植, 分蘖盛期剪取单株叶片。F<sub>3</sub> 群体于 2000 年种植, 根据抗虫鉴定结果, 选择 3 个重复抗性鉴定一致的 90 个株系, 于 5~ 6 叶期每株系混收 20 个单株上的叶片, 其基因型代表 F<sub>2</sub>。水稻基因组总 DNA 的提取, 采用卢扬江和郑康乐的方法<sup>9</sup>。所选用的 DNA 标记, 包括限制性片段长度多态性(RFLP)和简单序列长度多态性(SSLP)两种类型。

RFLP 分析参照 McCouch 等人的方法<sup>10</sup>, 但探针标记、分子杂交和信号检测采用 ECL 系统

收稿日期: 2001-10-09; 修改稿收到日期: 2001-11-20。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870535); 农业部水稻生物学重点实验室开放项目(000203)。

第一作者简介: 马良勇(1968- ), 男, 助理研究员。

(Amersham Pharmacia Biotech)。选用的限制性内切酶为 *Bam*HI、*Eco*RI、*Eco*RV 和 *Hind*III。参考我们以前的 RFLP 检测结果,挑选在籼亚种内具有较高多态性检测能力的 131 个探针,检测亲本。分别选择死苗率最低和最高的 10 个株系,组成抗感 DNA 池,应用多态性探针检测。所用的 RFLP 探针,全部来源于美国康乃尔大学 Tanksley 实验室。

SSLP 分析中的微卫星引物购自 Research Genetics Inc,反应体系参照厂商提供的方法。使用的 PCR 扩增仪为 Peikin Elmer GeneAMP PCR System 9600,94 预变性 1 min 后,按循环条件 94 45 s、57 45 s、升温 45 s、72 1 min,反应 30 个循环,最后在 72 延伸 5 min。组成抗感 DNA 池各 2 个,分别由不同的 5 个株系组成。DNA 池和亲本 DNA 用 1×TE (pH 8.0) 稀释 20 倍后,同时进行 PCR 扩增和电泳检测。应用检测到阳性标记的引物,检测群体。PCR 扩增产物在 2.5% Metaphor<sup>®</sup> 高分辨率琼脂糖(BMA)上电泳,所用的分子量标记为 100 bp DNA Ladder Plus(MBID)。电泳完成后,凝胶经溴化乙锭染色,应用 GDS 8000 凝胶图像分析系统(UVP)成像,用热敏打印机打印图片后记录,或直接记录各个体的带型。其中抗虫亲本鬼衣谷的带型记为 1,感虫亲本 TN 1 的带型记为 2,杂合带型记为 3。

#### 1.4 数据分析

应用隐性极端群体法<sup>11</sup>分析分子标记与抗虫基因的连锁关系。应用 MAPMAKER/EXP3.0<sup>12,13</sup>分析标记之间的连锁关系,采用 Kosambi 函数将重组值转换成遗传图距。

## 2 结果与分析

### 2.1 亲本和 F<sub>3</sub> 代抗虫鉴定结果

经对抗性鉴定结果统计,感虫亲本 TN 1 平均死苗率为 97.2%,抗虫亲本鬼衣谷平均死苗率为 18.3%。鉴定的 F<sub>3</sub> 株系中,90 个在 3 个重复间表现一致,各株系平均死苗率为 12%~100%,呈多峰连续分布(图 1),绝大部分株系的平均死苗率低于感虫对照 TN 1,而高于抗虫亲本鬼衣谷,表明鬼衣谷可能携带多个抗虫基因。

### 2.2 阳性标记的筛选

应用于亲本检测的 131 个 RFLP 探针中,54 个在双亲间检测到差异性,但这些多态性探针都未能在抗感 DNA 池间检测到阳性标记。应用于亲本检测和阳性标记筛选的 150 对微卫星引物中,45 对引物在双亲间检测到差异性,其中,位于水稻第 11 染色体的 RM 167 表现为阳性标记,2 个感病 DNA 池

仅扩增出来源于感病亲本的片段,2 个抗病 DNA 池则呈杂合型(图 2)。

### 2.3 抗虫基因的定位

应用 RM 167 引物,分析了构成抗感 DNA 池的 20 个个体。10 个感虫个体中,6 个为 TN 1 纯合型,4 个为杂合型,未发现鬼衣谷纯合型,据此计算,抗虫基因与 RM 167 的交换率为 20%±0.8%,换算成遗传图距为 21.2 cM。10 个抗虫个体中,5 个为鬼衣谷纯合型,3 个为杂合型,2 个为 TN 1 纯合型。显然,抗虫个体中出现的 RM 167 纯合感虫亲本带型,难以用抗虫基因与 RM 167 的重组来解释,由此推测,研究群体中存在其他抗虫基因。

应用 RM 167 引物,分析了其他个体。根据 RM 167 的带型,将完整 F<sub>3</sub> 群体分为带型 1、2 和 3 三种类型(图 1)。在 RM 167=1(抗虫亲本纯合基因型)的 16 个株系中,12 个株系的死苗率低于 65%,4 个株系的死苗率高于 85%,按完整群体的峰谷 65% 为界限将其分成两组,则抗虫基因与 RM 167 在 4 个个体发生了重组。如果所有重组全部为双交换(即感虫株系的 F<sub>2</sub> 个体为纯合感虫),则交换率为 25%

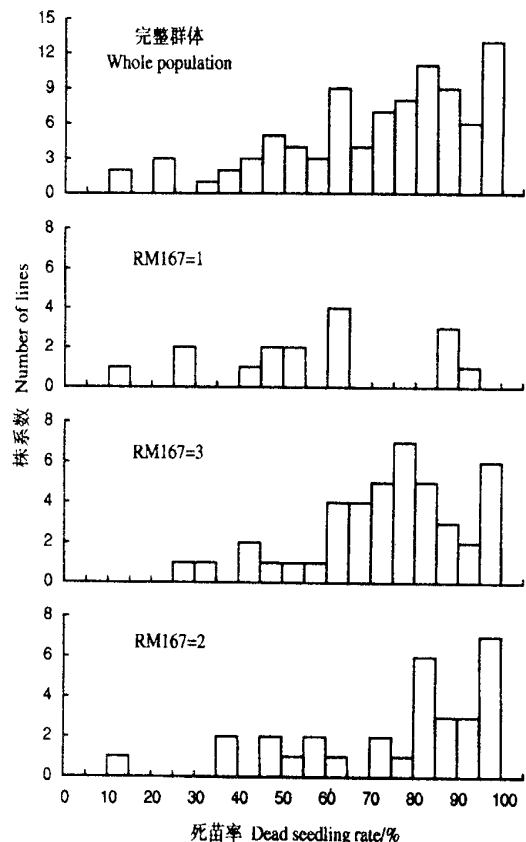


图 1 TN 1/鬼衣谷 F<sub>3</sub> 群体的白背飞虱抗性分离

Fig. 1. Resistance segregation in the TN 1/Guiyigu F<sub>3</sub> population scored as the dead seedling percentage of F<sub>3</sub> lines infested with 1-2 instar of *S. furcifera*.

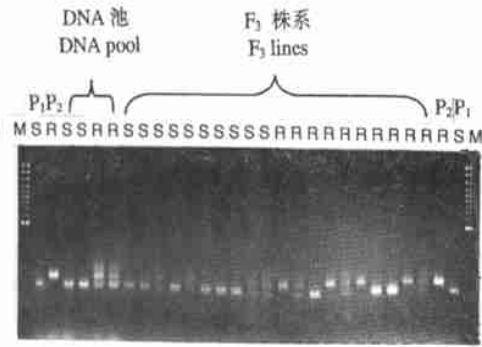


图2 TN1/鬼衣谷F<sub>3</sub>群体中SSLP标记RM167与抗虫性的共分离

Fig. 2. Cosegregation between SSLP marker RM167 and the resistance to whitebacked planthopper in the TN1/Guiyigu population.

M- 100 bp DNA 标准分子量; P<sub>1</sub>- TN1; P<sub>2</sub>- 鬼衣谷; S- 感虫; R- 抗虫。

M- 100 bp DNA ladder; P<sub>1</sub>- TN1; P<sub>2</sub>- Guiyigu; S- Susceptible lines; R- Resistant lines

±0.6%; 如果所有重组全部为单交换(即感虫株系的F<sub>2</sub>个体为杂合感虫), 则交换率为12.5% ± 0.3%。在RM167=2(感虫亲本纯合基因型)的亚群体中, 作类似分组和计算, 抗虫基因与RM167的交换率为14.5%~29.0%。这些结果与前述应用极端感虫个体获得的结果类似, 表明RM167与来源于鬼衣谷的1个抗虫基因连锁, 该基因可能就是以前根据经典遗传分析命名的*Wbph6(t)*。

在RM167=3(杂合型)的亚群体中, 大部分株系的死苗率呈中间类型。如果RM167与来源于鬼衣谷的1个抗虫基因连锁, 这些株系的小部分将由于单交换具有不同的纯合亲本型, 大部分则由于株系内的分离而偏向于中间型。因此, 杂合型亚群体的中间型分布, 也支持了RM167与*Wbph6(t)*连锁的论断。

除了RM167, 还应用与RM167连锁的多态性标记RM287和RM21分析了所有个体。但研究结果表明, 这2个标记与*Wbph6(t)*的连锁性更为松散(表1)。在前人报道的SSLP图谱中<sup>14</sup>, RM167位于

表1 10个极端感虫个体在3个标记座位上的带型表现

标记	抗虫亲本型	杂合型	感虫亲本型
	Paternal genotype (Guiyigu)	Heterozygote	Maternal genotype (TN1)
RM167	0	4	6
RM287	1	4	4
RM21	1	5	4

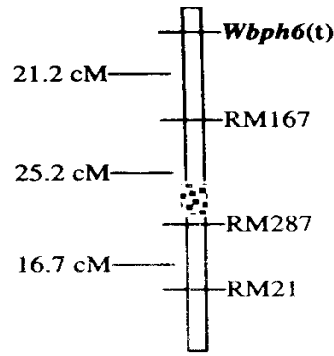


图3 *Wbph6(t)*在染色体11的位置

Fig. 3. Location of *Wbph6(t)* on chromosome 11 of rice. 空心杠示染色体, 阴影部分示着丝粒位置<sup>13</sup>。

The chromosome is drawn as a blank bar with dotted portion referring to centromogan

第11染色体的短臂, RM287和RM21位于RM167的下方, 可见*Wbph6(t)*位于水稻第11染色体短臂RM167标记的上方(图3)。

### 3 讨论

本研究应用TN1/鬼衣谷的F<sub>(2-3)</sub>群体, 定位来源于鬼衣谷的抗白背飞虱新基因*Wbph6(t)*。不管是应用隐性抗虫极端群体分析, 还是应用基于阳性标记的亚群体分析, 都将*Wbph6(t)*定位于水稻第11染色体的短臂, 该基因与RM167的遗传距离为21.2 cM。由于在RM167上部的RFLP和SSLP标记座位上, TN1和鬼衣谷之间表现单态性, 因此, *Wbph6(t)*的准确定位尚有待于进一步工作的开展。

水稻抗白背飞虱基因的定位研究, 过去仅有少数报道, McCouch应用TN1/R36近等基因系检测到*Wbph1*与RFLP标记RG146和RG445共分离, 但在近等基因系间未检测到其他多态性标记, 而RG146和RG445是多拷贝标记, 因此未能将*Wbph1*定位到染色体上<sup>15</sup>; Liu等应用RFLP标记, 将来源于抗虫品种ARC10329的抗性基因*Wbph2*定位于水稻第6染色体<sup>16</sup>。迄今尚未报道在水稻第11染色体上定位了抗白背飞虱基因的研究, 但Kadirvel等比较了IR64/Azucena的DH群体在白背飞虱侵染和不侵染情况下幼苗期叶片和根干重的差异, 将一个控制干重差异的QTL定位于水稻第11染色体RG167与RG103之间<sup>17</sup>, 该区间位于*Wbph6(t)*所处区间的下部; 在该区间是否存在抗虫基因簇值得深入研究。

褐飞虱抗性基因的定位研究则较为深入, 已将

抗褐飞虱基因 *Bph1*, *bph2*, *Bph3*, *bph4* 和 *Bph10(t)* 分别定位于水稻第 3、4、10 和 12 染色体,并在第 1、2、3、4 和 8 染色体检测到与抗褐飞虱相关的 QTLs<sup>15,18~26</sup>,可以看出,已定位的抗褐飞虱基因也均不位于水稻第 11 染色体。因此,本研究尽管受多态性和样本量限制,表现抗性基因与 RM 167 松散连锁,但抗白背飞虱新基因 *Wbph6(t)* 的定位,对水稻的分子遗传理论和分子标记辅助选择具有重要价值。

在很多基因定位研究中,为了解决 F<sub>2</sub> 群体无法重复鉴定的问题,常常应用 F<sub>3</sub> 株系鉴定表型,这也是本研究所采取的策略。但是应用 F<sub>3</sub> 株系不仅降低了显性效应,且由于各个 F<sub>3</sub> 株系本身是一个分离的群体,将导致遗传效应估算值的偏低和实验机误估算值的偏高<sup>27</sup>,加上本研究群体的样本数较低,因此,难以检测到其他效应较小的抗虫基因。为了解决这一问题,我们正应用单粒传法,构建含有较大样本数的鬼衣谷/TN 1 重组自交系(RL)群体,以验证本研究获得的结果和进一步深化抗白背飞虱基因的定位和育种应用研究。

谢辞:本研究实验室和田间工作方面分别得到樊叶扬和屠国庆同志的帮助,在此一并表示感谢。

#### 参考文献

- 1 Angeles E R, Khush G S, Heinrichs E A. New genes for resistance to whitebacked planthopper in rice. *Crop Sci*, 1981, 21: 47-50
- 2 Wu C F, Khush G S. A new dominant gene for resistance to whitebacked planthopper in rice. *Crop Sci*, 1985, 25(3): 505-509
- 3 Hernandez J E, Khush G S. Genetics of resistance to whitebacked planthopper in some rice varieties. *Oryza*, 1981, 18: 44-50
- 4 Sidhu G S, Khush G S, Medrano F G. A dominant gene in rice for resistance to whitebacked planthopper and its relationship to other plant characteristics. *Euphytica*, 1979, 28: 227-232
- 5 Nair R V, Masajo E M, Khush G S, et al. Genetic analysis of resistance to whitebacked planthopper in twenty-one varieties of rice *Oryza sativa* L. *Theor Appl Genet*, 1982, 61: 19-22
- 6 Li X M (李西明), Min S K (闵绍楷), Xiong Z M (熊振民), et al. Screening of resistant resource and genetical analysis of resistance to whitebacked planthopper (WBPH) *Sogatella furcifera* (Horvath) in rice varieties (*Oryza sativa* L.). *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1987, 14(6): 413-418 (in Chinese with English abstract)
- 7 Li X M (李西明), Min S K (闵绍楷), Xiong Z M (熊振民), et al. Genetics analysis of resistance to whitebacked planthopper *Sogatella furcifera* (Horvath) in four rice varieties (*Oryza sativa*) of Yunnan Province. *Chinese J Rice Sci* (中国水稻科学), 1990, 4(3): 113-116 (in Chinese with English abstract)
- 8 IRRI. Inheritance of resistance to whitebacked planthopper. In: IRRI Annual Report for 1978. Manila: IRRI, 1979: 71-75
- 9 Lu Y J (卢扬江), Zheng K L (郑康乐). A simple method for isolation of rice DNA. *Chinese J Rice Sci* (中国水稻科学), 1992, 6(1): 47-48 (in Chinese)
- 10 McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1988, 76: 815-829
- 11 Zhang Q F, Shen B Z, Dai X K, et al. Using bulked extremes and recessive class to map genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice. *Genetics*, 1994, 91: 8675-8679
- 12 Lander E, Green P, Abrahamson J, et al. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, 1: 174-181
- 13 Lander E S, Bostein D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 1989, 121: 185-199
- 14 Tenenikh S, Park W D, Ayres N, et al. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 697-712
- 15 McCouch S R, Khush G S, Tanksley S D. Tagging genes for disease and insect resistance via linkage to RFLP markers. In: Rice Genetics II. Manila: IRRI, 1991: 443-449
- 16 Liu Z Y, Liu G J. Study on mapping the resistant genes to the whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera* using RFLP markers. *CRRN*, 2001, 9(2): 10
- 17 Kadirvel R, Maheswaran M, Gunathilagaraj K. Molecular mapping of quantitative trait loci (QTL) associated with whitebacked planthopper in rice. *IRRN*, 1999, 24(3): 12-13
- 18 Alam S N, Cohen M B. Detection and analysis of QTLs for resistance to brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, in a doubled-haploid rice population. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 1370-1379
- 19 Ikeda R, Kaneda C. Trisomic analysis of the gene *Bph-1* for resistance to brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stal in rice. *Jpn J Breed*, 1983, 33: 40-44
- 20 Ikeda R, Kaneda C. Genetic analysis of resistance to brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stal in rice. *Jpn J Breed*, 1981, 31: 279-285
- 21 Hirabayashi H, Ogawa T. RFLP mapping of *Bph-1* (brown planthopper resistance gene) in rice. *Breed Sci*, 1995, 45: 369-371
- 22 Jeon Y H, Ahn S N, Choi H C, et al. Identification of a RAPD marker linked to a brown planthopper resistance gene in rice. *Euphytica*, 1999, 107: 23-28
- 23 Ishii T, Brar D S, Multani D S, Khush G S. Molecular tagging of gene for brown planthopper resistance and earliness introgressed from *Oryza australiensis* into cultivated rice, *O. sativa*. *Genome*, 1994, 37: 217-221
- 24 Murata K, Fujiwara M, Kaneda C, et al. RFLP mapping of a brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance gene *bph2* of indica rice introgressed into a japonica breeding line "Norin-PL 4." *Genet Syst*, 1998, 73: 359-364
- 25 Huang N, Parco A, Mew T, et al. RFLP mapping of isozymes, RAPDs and QTLs for grain shape, brown planthopper resistance in doubled-haploid rice population. *Mol Breed*, 1997, 3: 105-113
- 26 Huang Z, He G, Shu L, et al. Identification and mapping of two brown planthopper resistance gene in rice. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 929-934
- 27 Li J X, Yu S B, Xu C G, et al. Analyzing quantitative trait loci for yield using a vegetatively replicated F<sub>2</sub> population from a cross between the parents of an elite rice hybrid. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 248-254