

水稻抗白背飞虱基因 *Wbph2* 的初步定位

刘志岩¹ 刘光杰^{1*} 寒川一成² 庄杰云¹ 陈深广¹ 沈君辉¹ 郑康乐¹

(¹ 中国水稻研究所 国家水稻改良中心, 浙江 杭州 310006; ² 日本国际农林水产业研究中心, 日本 筑波 305-8686; *通讯联系人, E-mail:liug@mail.hz.zj.cn)

Mapping the Gene *Wbph2* in ARC10239 Resistant to the Whitebacked Planthopper, *Sogatella furcifera* in Rice

LIU Zhi-yan¹, LIU Guang-jie^{1*}, Kazushige SOGAWA², ZHUANG Jie-yun¹, CHEN Shen-guang¹, SHEN Jun-hui¹, ZHENG Kang-le¹
(¹ Chinese National Center for Rice Improvement, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; ² Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba 305-8686, Japan; *Corresponding author, E-mail:liug@mail.hz.zj.cn)

Abstract: The F₂ population of ARC10239/Minghui 63 was screened for the resistance to the whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera*. The DNA extracted from the susceptible F₂ individuals was mixed, forming a susceptible DNA bulk. The polymorphisms in the resistant parent ARC10239, the susceptible parent Minghui 63 and the susceptible DNA bulk were tested by using 129 probes in combination with four enzymes of *Bam*H I, *Dra* I, *Eco*R V and *Hind* III. Six positive probes were obtained, distributing in five rice chromosomes (Chromosome 3, 6, 8, 11 and 12). The positive probes were used to screen for the F₂ population of 142 individuals, revealing that *Wbph2* was linked with the markers RZ667, RG64 and RG264 on the chromosome 6. Among the markers, the distance of RZ667 to *Wbph2* was 25.6 cM (LOD=4.50).

Key words: *Sogatella furcifera*; rice; gene mapping; insect resistance; restricted fragment length polymorphism

摘要: 鉴定了 ARC10239/明恢 63 F₂ 群体对白背飞虱的抗性, 混合 F₂ 感虫稻株的 DNA, 构建感虫池。应用 129 个 RFLP 探针, 结合 4 种限制性内切酶, 检测抗虫亲本 ARC10239、感虫亲本明恢 63 和感虫 DNA 池的多态性。检测到 6 个阳性探针, 分布在 5 个染色体上(染色体 3、6、8、11 和 12)。应用阳性探针分析了 F₂ 群体的 142 个个体, 发现抗虫基因 *Wbph2* 与第 6 染色体上的标记 RZ667、RG64 和 RG264 连锁, 其中, *Wbph2* 与 RZ667 的遗传距离为 25.6 cM (LOD=4.50)。

关键词: 白背飞虱; 水稻; 基因定位; 抗性; 限制性片段长度多态性

中图分类号: Q943; S511.03

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2002)04-0311-04

白背飞虱 (*Sogatella furcifera*) 是我国主要的水稻害虫之一。自 20 世纪 70 年代开展抗白背飞虱品种筛选及其遗传分析研究以来, 已确定了 5 个抗性基因^[1], 品种 Podiwi A8 携带的为隐性基因 *wbph4*。李西明等发现鬼衣谷等 4 个抗白背飞虱的云南地方品种的抗性基因与已知的 5 个基因不等位, 将其命名为 *Wbph6(t)*^[2]。McCouch 等检测到与抗白背飞虱基因 *Wbph1* 连锁的 2 个 RFLP 标记^[3]。Yamasaki 等定位了 2 个与白背飞虱产卵反应有关的数量性状基因^[4]。因此, 还没有抗性主效基因定位的报道。在本项研究中, 以具有抗白背飞虱基因 *Wbph2* 的品种 ARC10239 为抗虫亲本, 以明恢 63 为感虫亲本, 构建了 F₂ 群体和感虫池, 初步定位了抗白背飞虱基因 *Wbph2*。

1 材料与试验方法

1.1 试验材料

水稻材料抗白背飞虱鉴定和分子检测等试验均

在中国水稻研究所富阳试验基地进行。将携有抗白背飞虱基因 *Wbph2* 的水稻品种 ARC10239 与感虫品种明恢 63 杂交, 获得的 F₁ 自交, F₂ 植株种植在温室内。

1.2 试验方法

采用刘光杰等的方法^[5], 在分蘖期掰分蘖, 单株鉴定亲本和 F₂ 群体对白背飞虱的抗性; 同时, 采集叶片组织, 提取 DNA。采用陈洪等^[6]的方法提取亲本和 F₂ 个体的总 DNA。由于抗虫基因 *Wbph2* 为显性遗传, 抗虫植株包含了抗虫纯合和抗虫杂合 2 种基因型, 即同时含有抗虫亲本和感虫亲本的基因型, 无法直接用于基因分析。而感虫植株仅含有感虫亲

收稿日期: 2002-01-07; 修改稿收到日期: 2002-04-10。

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(397223); 国家 863 计划资助项目(2001AA241025); JIRCAS-CNRRRI 中日合作项目(中国迁飞性飞虱类害虫的综合防治技术开发)(1998—2003); 农业部水稻生物学重点实验室开放课题(020402)。

第一作者简介: 刘志岩(1973—), 女, 现为美国阿华州州立大学博士研究生。

本基因型,故选用经抗虫性鉴定的 10 个感虫 F_2 植株的 DNA 等量混合构建了感虫池。4 种限制性内切酶 *Bam*H I、*Dra* I、*Eco*R V、*Hind* III 酶解亲本 DNA 和感虫 DNA 池,分析其 RFLP。应用筛选到的阳性探针/酶组合分解各 F_2 个体。所有 RFLP 探针均来自于美国康乃尔大学 Tanksley 实验室。

1.3 数据分析

根据 X 光片放射自显影结果,将各个 F_2 单株的带型按亲本的 RFLP 带型归类。凡与亲本 ARC10239 带型相同者赋值为 1,与亲本明恢 63 带型相同者赋值为 2,杂合子赋值为 3,表型感虫植株赋值 2,抗虫植株由于不知其为纯合、杂合,赋值 4(1 或者 3)。由于各种原因造成的带型不清楚或缺失数据均赋予“0”值,作缺失数据处理。应用 MAPMAKER/EXP 3.0^[7],分析 DNA 标记之间以及 DNA 标记与抗虫基因之间的连锁关系,以 $LOD=2.0$ 进行连锁群内各位点的排序,采用 Kosambi 函数将重组值转换成遗传距离。

2 结果与分析

2.1 阳性探针的筛选

应用 129 个 RFLP 探针,结合 4 种限制性内切酶,分析了亲本和感虫 DNA 池的差异性。根据带型表现可将其分为 3 种类型:(1)抗感亲本之间没有多态;(2)抗感亲本之间有多态,但感虫池具有抗感两种带型,此探针为非阳性探针,可判断其与抗虫基因非连锁或距离很远;(3)抗感亲本之间有多态,并且感虫池具有与感虫亲本同样的带型,则这个探针为此群体的阳性探针。没有多态的探针不能判定它与抗虫基因的连锁关系,需要在其附近继续筛选多态性探针(图 1)。有 77 个探针至少在 1 个限制性内切酶的情况下,可检测到亲本之间的多态性,多态性比率为 59.7%(表 1)。在这些多态性探针中,有 47.4%能在多种限制性内切酶的情况下检测到多态性。本研究所用的 4 种限制性内切酶中,*Eco*R V 检测到的多态性最高,为 32.6%。

根据感虫池与感虫亲本的带型比较,可以从多态性探针中鉴定出阳性探针。大部分感虫池具有抗、感亲本两种带型,抗虫基因不太可能在这些标记附近(图 1)。但有 6 个探针,感虫池只具有感虫亲本的带型,而不具有抗虫亲本的带型,表明它们可能与抗虫基因连锁(图 2)。这些阳性探针分布在 5 条染色体上(染色体 3、6、8、11 和 12)。

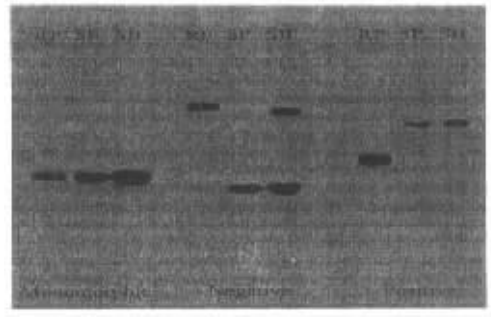


图 1 探针与亲本和感虫池杂交后的 3 种典型带型
Fig. 1. Three typical band forms after hybridization of probes with resistant and susceptible parents and susceptible bulk.

RP—抗虫亲本; SP—感虫亲本; SB—感虫池。

RP—Resistant parent; SP—Susceptible parent; SB—Susceptible bulk.

2.2 RFLP 标记与抗虫基因 *Wbph2* 的连锁分析和图距估算

应用 77 个多态性探针中的 14 个(包括 6 个阳性探针),检测了 142 个 F_2 植株。非阳性探针没有表现出与抗虫性共分离;位于染色体 3、8、11 和 12 的阳性探针没有表现出与抗虫性的共分离,说明这些标记所在的片段并不与抗虫基因连锁,是假阳性。

位于染色体 6 的阳性探针 RZ667 与抗白背飞虱基因 *Wbph2* 表现连锁,在 28 个感虫的植株中,没有 1 株与抗虫亲本的带型完全一致,经计算与抗虫基因的距离为 25.6 cM ($LOD=4.50$),重组率为 22.0%。而且,在完整群体中,标记 RZ667 的分离符

表 1 检测到的多态性探针和阳性探针在水稻染色体上的分布
Table 1. Chromosomal distribution of polymorphic and positive probes.

染色体 Chromosome	探针数 No. of probes	多态性探针数 No. of polymorphic probes	阳性探针数 No. of positive probes
1	20	14	0
2	9	4	0
3	9	4	1
4	11	4	0
5	9	4	0
6	22	12	2
7	8	6	0
8	7	6	1
9	7	4	0
10	4	1	0
11	9	8	1
12	14	10	1
总计 Total	129	77	6



图2 ARC10239/明恢 63 阳性探针的筛选

Fig. 2. Screening for positive markers of ARC10239/Minghui 63.

λ—分子量标记 λDNA/*Hind* III; A—抗虫亲本 ARC10239; M—感虫亲本明恢 63; S—ARC10239/明恢 63 的 F₂ 感虫池; 从左至右, 第 2~4 道为 *Bam*H I 酶解后与 RG136 杂交; 第 5~7 道为 RG399/*Dra* I; 第 8~10 道为 RG64/*Dra* I; 第 11~13 道为 RZ667/*Dra* I; 第 14~16 道为 RG901/*Eco*R V; 第 17~19 道为 RG16/*Hind* III。所有的探针都是阳性的。

λ—Molecular weight marker λDNA/*Hind* III; A—Resistant parent ARC10239; M—Susceptible parent Minghui 63; S—Susceptible bulk; From left to right, Lanes 2-4 were DNAs hybridized by RG136 with *Bam*H I -digestion; Lanes 5-7, RG399/*Dra* I; Lanes 8-10, RG64/*Dra* I; Lanes 11-13, RZ667/*Dra* I; Lanes 14-16, RG901/*Eco*R V; Lanes 17-19, RG16/*Hind* III. All the markers were positive.

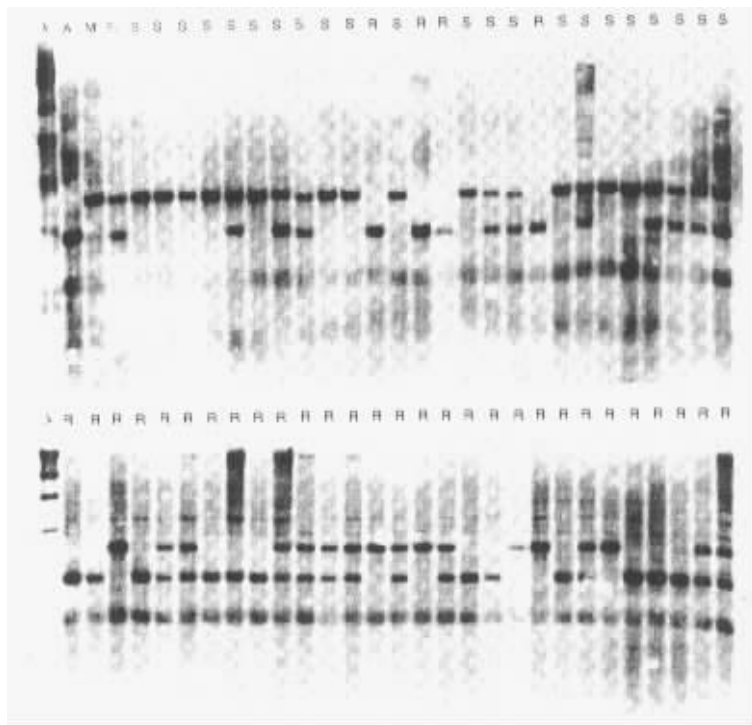


图3 RG64/*Dra* I 对 ARC10239/明恢 63 的 F₂ 群体的 RFLP 检测结果

Fig. 3. Autoradiography of Southern hybridization of *Dra* I digest of rice DNAs with probe RG64.

λ—分子量标记 λDNA/*Hind* III; A—抗虫亲本 ARC10239; M—感虫亲本明恢 63; F₁—ARC10239/明恢 63 的 F₁; S—感虫植株; R—抗虫植株。

λ—Molecular weight marker λDNA/*Hind* III; A—Resistant parent ARC10239; M—Susceptible parent Minghui 63; F₁—F₁ of ARC10239 and Minghui 63; S—Susceptible; R—Resistant.

合 1 : 2 : 1 的理论分离比 ($P = 0.69$)。

选用 RZ667 两侧的探针检测亲本多态性, 只有 RG64 和 RG264 有多态, 其中 RG64 也表现为阳性。应用 RG64 和 RG264 检测 F₂ 个体, 其中 RG64 对 *Dra* I 酶解产物的检测结果显示于图 3。结果表明, 这 2 个标记与抗虫基因 *Wbph2* 也表现为连锁, 与

Wbph2 的距离分别为 27.8 cM (LOD = 4.32) 和 36.4 cM (LOD = 2.56), 重组率分别为 25.2% 和 31.1%。这些位点在染色体上的排列如图 4 所示。

3 讨论

郑康乐等在定位抗稻瘟病基因的研究中用近等

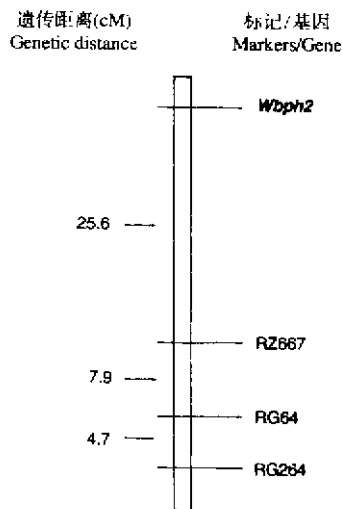


图4 抗白背飞虱基因 *Wbph2* 在染色体6上的位置

Fig. 4. Region of rice chromosome 6 in the vicinity of the *Wbph2* gene for resistance to *S. furcifera*.

基因系来筛选阳性探针,大大减少了工作量^[8]。在本研究中采用10个感虫个体的DNA混合的方法来检测多态性探针,与近等基因系作用相同,并减少了构建近等基因系的麻烦。在筛选的129个探针中,在ARC10239和明恢63中有77个已定位的标记能在抗虫和感虫亲本间检测到多态性,只有6个是阳性探针,与直接应用 F_2 群体相比,工作量减少了90%以上。本研究中,多数阳性克隆是假的,这是因为感虫池的个体比较少,或者这个探针在 F_2 群体中的偏态分布。在这6个阳性探针中,探针RG16在染色体上呈现偏态分布。

由于在染色体6的RZ667这一区域本实验室可以利用的探针比较少,又有许多探针在亲本间没有多态性,所以尚不能将其进一步定位,有必要再增

加探针和限制性内切酶来揭示更多的多态性,以便找到更近的标记。

参考文献:

- 1 Khan Z R, Saxena R C. Varietal resistance in rice against *Sogatella furcifera* (Horváth). *Crop Prot*, 1986, 5(1): 15—25.
- 2 Li X M (李西明), Xiong Z M (熊振民), Min S K (闵绍楷), Hu G W (胡国文). Genetical analysis of resistance to whitebacked planthopper *Sogatella furcifera* (Horváth) 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)
- 3 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, Philippines: IRRI, 1991. 443—449.
- 4 Yamasaki M, Tsunematsu H, Yoshimura A, et al. Quantitative trait locus mapping of ovicidal response in rice (*Oryza sativa* L.) against whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera* Horváth). *Crop Sci*, 1999, 39: 1178—1183.
- 5 Liu G J (刘光杰), Zheng Y C (郑宜才), Gui L Q (桂丽琴), Shen J H (沈君辉). On the screening methods for resistance to rice planthoppers (Homoptera: Delphacidae) in some Chinese rice varieties. *Acta Agric Zhejiang* (浙江农业学报), 1999, 11(6): 306—310. (in Chinese with English abstract)
- 6 Chen H (陈洪), Zhu L H (朱立煌), Xu J C (徐吉臣), Chen M L (陈美玲). Construction of rice RAPD molecular linkage map. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1995, 37(9): 677—684. (in Chinese with English abstract)
- 7 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.
- 8 Zheng K L (郑康乐), Qian H R (钱惠荣), Zhuang J Y (庄杰云), et al. Tagging rice blast resistance genes via DNA markers. *Acta Phytopath Sin* (植物病理学报), 1995, 25(4): 307—313. (in Chinese with English abstract)

欢迎订阅 2003 年《作物学报》

《作物学报》是中国科协主管,中国作物学会主办的学术刊物。刊载农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、生态、种质资源、谷物化学、贮藏加工以及与作物有关的生物技术、生物数学、生物物理等学科具基础理论或实践应用性的学术报告、专题研究报告、研究简报等。

《作物学报》为双月刊,大16开,每期148页,定价26.00元/册。邮发代号:82-336,全国各地邮局均可订阅。编辑部地址:100081北京市中关村南大街12号中国农业科学院作物育种栽培研究所《作物学报》编辑部;电话:(010)68918548;传真:(010)68975212;E-mail:xbzw@chinajournal.net.cn。