

水稻抗褐飞虱基因 *Bph18(t)* 的 STS 标记开发及有效性验证

梁云涛^{1,2,4,#} 王春连^{1,#} 赖凤香³ 刘丕庆² 王 坚¹ 傅 强³ 赵开军^{1,*}

(¹中国农业科学院作物科学研究所/农业部作物遗传育种重点实验室/国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程, 北京 100081; ²广西大学农学院, 广西 南宁 530005; ³中国水稻研究所, 浙江 杭州 310006; ⁴广西农业科学院水稻研究所, 广西 南宁 530007; # 共同第一作者; * 通讯联系人, E-mail: zhaokj@mail.caas.net.cn)

Development of STS Marker KC1 for Brown Planthopper Resistance Gene *Bph18(t)* and Marker Assisted Selection Efficiency

LIANG Yun-tao^{1,2,4,#}, WANG Chun-lian^{1,#}, LAI Feng-xiang³, LIU Pi-qing², WANG Jian¹, FU Qiang³, ZHAO Kai-jun^{1,*}

(¹Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture/The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ²Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530005, China; ³China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; ⁴Rice Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; # These authors contributed equally to this paper; * Corresponding author, E-mail: zhaokj@mail.caas.net.cn)

LIANG Yuntao, WANG Chunlian, LAI Fengxiang, et al. Development of STS marker KC1 for brown planthopper resistance gene *Bph18(t)* and marker assisted selection efficiency. *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(3): 244-250.

Abstract: To facilitate application of the elite brown planthopper(BPH) resistance gene *Bph18(t)* to rice breeding program by molecular assisted selection(MAS), a STS marker, KC1, for *Bph18(t)* gene was developed. To test the MAS efficiency of KC1 for *Bph18(t)*, the F₂ plants derived from the cross between Yangdao 6(i. e. 9311)[without *Bph18(t)*, susceptible to BPH] and C4064[harboring *Bph18(t)*] were subjected to both bioassay of BPH resistance in the field and molecular identification with the STS marker KC1 in the laboratory. Among the F₂ plants, 292 plants were resistant to BPH while the other 84 plants were susceptible, indicating a single gene [*Bph18(t)*] controlling the BPH resistance in the F₂ population. The results of molecular identification showed that the MAS efficiency of KC1 for *Bph18(t)* was 82.6%, indicating that the STS marker KC1 could be useful to trail *Bph18(t)* gene in rice breeding program.

Key words: resistance gene; molecular marker; rice brown planthopper; marker assisted selection

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. 中国水稻科学, 2010, 24(3): 244-250.

摘 要: 利用携有 *Bph18(t)* 基因抗褐飞虱材料与感虫材料之间在抗虫位点上的单核苷酸差异,成功开发出 1 个 STS 标记 KC1。该标记可以准确区分含或不抗虫基因 *Bph18(t)* 的基因型。进一步构建扬稻 6 号(9311)[不含 *Bph18(t)* 基因,感褐飞虱]/C4064[携有 *Bph18(t)* 基因]的 F₂ 群体进行抗虫鉴定,同时使用 KC1 标记检测 F₂ 群体单株的基因型。根据分子标记检测结果与抗虫表现之间的符合程度推算出标记的选择效果达到了 82.6%。研究结果表明,KC1 标记有较高的目的基因选择效率,可以应用于扬稻 6 号遗传背景下 *Bph18(t)* 基因分子标记辅助选择。

关键词: 抗性基因; 分子标记; 水稻褐飞虱; 分子标记辅助选择

中图分类号: Q943.2; S511.034

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2010)03-0244-07

水稻褐飞虱 [*Nilaparvata lugens* (Stål)] 是一种单食性水稻害虫,属同翅目飞虱科(Homoptera: Delphacidae)。20 世纪 70 年代以来,水稻生产方式的改变和良种推广,导致氮肥的大量施用和品种遗传背景的日益单一,褐飞虱逐渐成为亚洲水稻的头号害虫,给水稻生产造成了严重的损失^[1]。仅 2005 年我国华东 4 省稻区的虫害大发生就造成近 25 亿 kg 稻谷损失^[2]。目前,生产上主要采取施用化学农药和利用品种抗性控制褐飞虱危害。化学农药虽能在一定程度上控制虫害的发生,但同时也造成环境污染,而且还杀死褐飞虱天敌,诱使褐飞虱产生抗药

性,最终导致褐飞虱危害更加猖獗^[3]。生产实践证明,利用水稻品种本身的抗虫性是最经济、有效和环保的控制途径。至今,已经发掘和鉴定了 21 个抗褐飞虱主效基因,其中 18 个被定位在水稻不同染色体上^[4-5],但还未见有抗褐飞虱基因被克隆的报道。

收稿日期: 2009-09-25; 修改稿收到日期: 2009-12-03。

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2006AA10Z1B7); 中央级公益性科研院所基金资助项目(2060302-2-08)。

第一作者简介: 梁云涛(1975—),男,硕士,助理研究员, E-mail: liangyt@sina.com; 王春连(1962—),女,博士,副研究员, E-mail: wangchl@mail.caas.net.cn。

在生产上, 育种家已选育了一系列含有 *Bph1*、*bph2* 和 *Bph3* 等抗褐飞虱基因的水稻品种, 它们的推广应用曾有效地控制了褐飞虱的暴发。然而, 由于褐飞虱生物型的改变, 大多数抗虫品种在长期推广应用后, 已丧失或正面临抗性丧失^[6]。因此, 必须加快培育含有抗褐飞虱新基因的水稻品种, 以满足水稻生产的需要。

由于抗虫性鉴定的复杂性和实施困难, 限制了水稻抗褐飞虱品种的育种效率。随着分子生物学的发展, 建立在 DNA 基础上的分子标记技术以其准确、快捷、不受植物生长时期限制等优点而被广泛运用于性状辅助选择、品种特征鉴定和抗源筛选等研究领域。例如, 李进波等^[7]应用分子标记选择技术, 将抗褐飞虱基因 *Bph14* 和 *Bph15* 聚合, 培育出抗褐飞虱的优良水稻株系。分子标记辅助育种技术具有选择效率高、预见性强、操作简单方便等优点, 尤其在针对较难鉴定的性状进行品种选育方面更具有明显的优势。它的应用可以大大加快育种进程, 是今后水稻育种发展的重要方向。

Bph18(t) 基因是一个广谱高抗褐飞虱的显性主效基因, 高抗我国褐飞虱种群生物型 1 和生物型 2, 在水稻抗褐飞虱育种上具有广阔的应用前景。Jena 等^[8]将该基因定位在水稻第 12 染色体上, 并找到了与该基因紧密连锁的分子标记 7312. T4A。2006 年以来, 我们利用分子标记辅助选择, 将 *Bph18(t)* 基因导入扬稻 6 号(9311)等品种并与 *Xa23*、*Pi9* 等优异抗病基因聚合以培育抗病虫的优良杂交稻恢复系。但由于 7312. T4A 标记为 CAPS 标记, 不便于在分子标记辅助育种实践中应用。因此, 本研究将 7312. T4A 标记成功转化为 1 个 STS 标记, 并构建含有 *Bph18(t)* 基因的水稻 F_2 分离群体, 随后开展 F_2 植株的分子标记和抗虫表型鉴定, 以验证新标记的有效性, 为 *Bph18(t)* 基因的快速鉴定提供便捷、有效的分子检测手段。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 水 稻 材 料

C4064 是携有抗褐飞虱基因 *Bph18(t)* 的籼稻亲本材料, 由国际水稻研究所 Jena 博士提供。扬稻 6 号是不含 *Bph18(t)* 基因的超级杂交稻恢复系, 由湖北省农业科学院戚华雄先生提供。以扬稻 6 号为母本与 C4064 杂交获得 F_1 , 自交获得 F_2 群体, 其中

2 个 F_2 群体(分别编号为 4023 和 4027)用于本试验。用于抗虫鉴定实验的感虫对照 TN1 是不含抗褐飞虱基因的感虫水稻材料; 抗虫对照品种 Mudgo 和 IR56 分别含有 *Bph1* 和 *Bph3* 抗虫基因。

1.1.2 褐 飞 虱 虫 源

2007 年 9 月从浙江富阳田间采集的田间褐飞虱种群室内繁殖 6~7 代后用于本实验。

1.1.3 PCR 引 物

本研究使用了 3 条 PCR 引物。其中 CAPS 标记 7312. T4A 的 1 对引物 7312. T4AF(5'-ACGGC GGTGAGCATTGG-3') 和 7312. T4AR(5'-TACA GCGAAAAGCATAAAGAGTC-3') 由 Jena 等^[8]开发。本研究设计了另一条引物 KC1F(5'-GCCA GAGGAACATGCGCTAT-3')。KC1F 与 7312. T4AR 组合成 1 对标记引物, 可在水稻品种扬稻 6 号等遗传背景中特异检测 *Bph18(t)* 基因, 从而成功将 CAPS 标记 7312. T4A 转化为 STS 标记(命名为 KC1)。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取和 PCR 扩 增

参考 McCouch 等^[9]的方法提取水稻苗期叶片的 DNA。PCR 反应体系(总体积 20 μ L): 10 \times buffer(含 $MgCl_2$) 2 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1.2 μ L, 10 μ mol/L 正、反向引物各 0.3 μ L, 5 U/ μ L *Taq* 酶 0.2 μ L, 100 ng/ μ L DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 15 μ L。扩增反应程序: 94 $^{\circ}$ C 下预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 下变性 1 min, 55~60 $^{\circ}$ C 下退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 下延伸 1 min, 循环 35 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 下再延伸 10 min。扩增反应均在 PTC-200 PCR 扩增仪上完成。根据片段大小差异, 扩增产物在不同浓度的琼脂糖凝胶电泳中检测。

1.2.2 *Hinf* I 酶切反应

用 7312. T4A 标记分别扩增水稻亲本 C4064 和扬稻 6 号基因组 DNA, 取 8 μ L 扩增产物用于琼脂糖凝胶电泳检测; 余下 10 μ L 扩增产物进行限制性内切酶 *Hinf* I 酶切反应, 反应体系(总体积 20 μ L): *Hinf* I 酶 1 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, PCR 产物 10 μ L, ddH₂O 7 μ L。将反应液混匀, 在 37 $^{\circ}$ C 下酶切 3 h。用 1.2% 琼脂糖凝胶检测酶切产物。

1.2.3 抗 虫 鉴 定 材 料 的 田 间 布 局

抗虫鉴定在中国水稻研究所富阳实验基地完成。 F_2 分离群体 4023 和 4027、抗感亲本 C4064 和扬稻 6 号以及抗感虫对照材料同时催芽播种, 先在

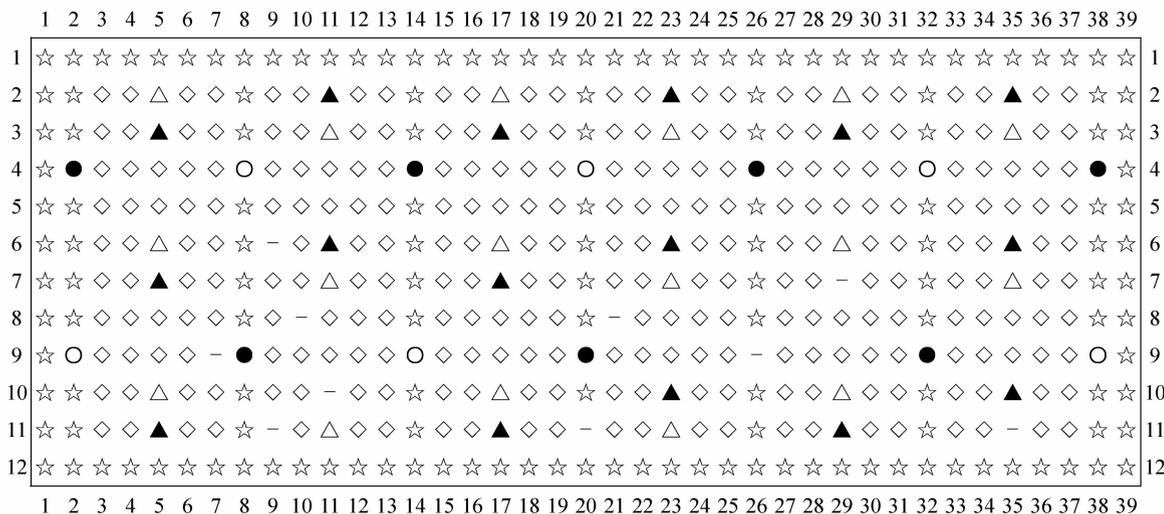


图 1 F₂ 群体及其亲本的布局

Fig. 1. Distribution of F₂ plants, and the control variety plants in field.

☆—TN1; ●—Mudgo; ○—IR56; △—抗虫亲本 C4064; ▲—感虫亲本扬稻 6 号; ◇—4023 群体的 F₂ 植株; “—” — 缺苗。上下方数字为列号,左右方数字为行号。

☆, TN1; ●, Mudgo; ○, IR56; △, C4064(resistant parent); ▲, Yangdong 6(9311)(susceptible parent); ◇, Individuals of the F₂ population 4023; “—”, Seedlings died. Numbers around the map represent serial number of rows or lines.

无虫网室育苗,不使用任何杀虫剂,按常规水稻育苗方式进行肥水管理。

25 d 秧龄时,单株移栽至褐飞虱鉴定圃中,移栽密度约 10 cm×20 cm,其中 4023 群体及其亲本对照置于同一个鉴定池中(图 1),4027 及其亲本置于另一个鉴定池,布局同 4023 群体。移栽好的鉴定池罩上防虫网防止其他害虫进入。接虫前,每株稻苗剪取 1~2 片叶片,编号后保存于-80℃冰箱中供分子检测。

1.2.4 接虫方法及抗虫评价标准

稻苗移栽约 15 d 后完全成活,接入初羽化褐飞虱成虫,密度为每株(分蘖)水稻接 1 头雌虫和 1~2 头雄虫。接虫后 3 d 内,每天用小木棒轻轻扫动稻苗以使鉴定圃中的虫口尽量分布均匀。试验期间,

若试虫死亡而虫口密度过低,需适当补充虫源。

按表 1 标准,待感虫对照 TN1 受害达 7 级时,开始每日记载各供试水稻及其对照品种的受害级别和达到 9 级的日期,直至 TN1 及感虫亲本受害级别达 9 级。各供试稻株及对照抗虫级别的判断以距离最近的 TN1 受害级别达到 9 级时为准。

实验中,抗感亲本均设置多次重复,在统计分析其受害级别时,通过计算平均受害等级评价其总体抗虫性,计算公式如下:

$$M = \frac{(N_1 \times L_1 + N_2 \times L_2 + \dots + N_x \times L_x)}{(N_1 + N_2 + \dots + N_x)}$$

其中,M 为平均受害等级;L_x 为亲本单株受害等级的实验观察值;N_x 为表现为相同受害等级 L_x 的亲本植株数。

表 1 褐飞虱为害后稻苗受害等级评定标准

Table 1. Standard for assessing victimization levels of rice damaged by brown planthopper.

稻苗受害等级	稻苗受害状况
Damage scale of rice	Damage status of rice
0	未受害 No damage
1	受害轻微 Slight damage
3	植株第一、二片叶黄化 The first and second leaves of plant yellowing
5	明显黄化或矮化,近半数分蘖萎焉或枯死 Plant obviously yellowed or stunted, and nearly half of the tillers wilted or withered
7	半数以上分蘖枯死,其余严重萎焉或矮化 Over half of tillers of plant withered, the rest of which wilted or seriously stunted
9	植株完全枯死 Plant completely withered

稻苗的抗虫性是一个相对指标。相对于感虫对照 TN1 的感虫性,本研究中的感虫亲本扬稻 6 号和抗虫亲本 C4064 都具有抗虫性,但 C4064 的抗性明显强于扬稻 6 号。因此,为了准确鉴别含有 *Bph18(t)* 基因的 F₂ 抗虫植株,我们将同一鉴定池中的抗感虫亲本对照和 F₂ 分离群体作为一个独立小区,以同一小区中的感虫亲本扬稻 6 号为参照,根据各单株的抗虫存活时间确定其抗虫性,抗性表现优于扬稻 6 号的 F₂ 单株被认定含有 *Bph18(t)* 基因。同时,本研究依据各植株的抗虫表现推算出 F₂ 单株的抗虫指数(R),定量分析植株的抗虫性。抗虫指数计算公式如下:

$$R = (A - B) / (C - B)$$

其中,R 为抗虫指数;A 为 F₂ 单株受害等级达 9 级时的时间(接虫至达 9 级时的天数,下同);B 为 TN1 受害等级达 9 级时的时间;C 为扬稻 6 号受害等级达 9 级时的时间。

当抗虫指数 R 值大于 1 时,说明植株的抗虫性强于感虫对照扬稻 6 号,为含有 *Bph18(t)* 基因的抗虫植株;其余植株被划分为感虫单株。

2 结果与分析

2.1 7312. T4A 标记的亲本多态性分析

用 CAPS 标记 7312. T4A 的引物对亲本 C4064 和扬稻 6 号进行 PCR 扩增,电泳检测显示均产生 1 条约 1 kb 的扩增带,无多态性(图 2-A)。将扩增产物进行 *Hinf* I 酶切,琼脂糖凝胶电泳检测显示两亲本间表现有差异。扬稻 6 号的 PCR 扩增产物酶切后电泳显示为 1 条约 1 kb 的特异带,而 C4064 的扩增产物被酶切成大小分别约为 600 bp 和 400 bp 的 2 条片段(图 2-B)。结果表明,CAPS 标记 7312. T4A 在亲本材料扬稻 6 号和 C4064 间检测表现有多态性,能在它们的杂交后代中跟踪检测 *Bph18(t)* 基因,可以用于扬稻 6 号遗传背景中 *Bph18(t)* 基因的分子标记辅助选择。

2.2 STS 标记 KC1 的开发

由于 7312. T4A 为 CAPS 标记,需要 PCR 扩增和 *Hinf* I 酶切,不仅操作烦琐,而且费用高,不便于在分子标记辅助育种中的大规模应用。因此,我们尝试将 7312. T4A 标记转化为 STS 标记。首先用 7312. T4A 标记引物分别对亲本材料 C4064 和扬稻 6 号进行扩增,琼脂糖凝胶电泳检测,将扩增的约 1 kb 特异片段回收测序,再通过 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)将 2 条序列与

日本晴基因组序列进行比对,显示 C4064 和扬稻 6 号的扩增序列与编号为 AL935072 的 BAC 克隆上 28 218—29 212 bp 序列的同源性达到 90% 以上,证明 PCR 扩增位点位于该 BAC 克隆。7312. T4A 标记扩增片段大小与位点位置均与 Jena 等^[8] 的报道结果相符,说明上述扩增片段是与 *Bph18(t)* 基因紧密连锁的目标片段。

通过比对 C4064 和扬稻 6 号特异片段的序列,发现它们之间存在单核苷酸突变差异(图 3)。以 C4064 材料的基因组序列为模板,根据引物设计最优化原则,在其中一处差异位点设计正向引物 KC1F,序列为 5'-GCCAGAGGAACATGCGCTAT-3'(图 3)。将 KC1F 和反向引物 7312. T4AR 组合成一对标记引物,对 C4064 和扬稻 6 号基因组 DNA 进行扩增。琼脂糖凝胶电泳检测显示,在 C4064 中扩增出 1 条大小为 708 bp 的特异片段,而在扬稻 6 号中未见扩增产物,扩增结果与设计相符(图 4)。结果表明,*Bph18(t)* 基因紧密连锁的 CAPS 标记成功转化为 STS 标记,新标记被命名为 KC1。

2.3 新标记 KC1 的有效性验证

为了检验新标记 KC1 的有效性,我们对抗虫亲

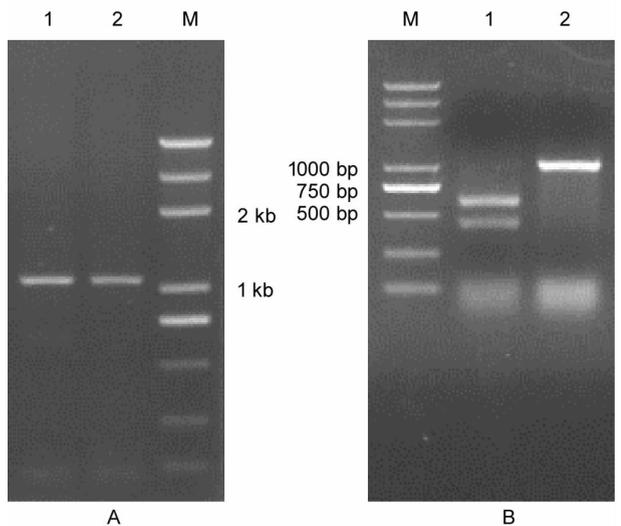


图 2 7312. T4A 标记的亲本多态性分析

Fig. 2. PCR amplification for C4064 and Yangdao 6 with the primers of the marker 7312. T4A.

A—7312. T4A 标记引物对抗虫亲本 C4064 和感虫亲本扬稻 6 号的 PCR 扩增; B—PCR 扩增产物的 *Hinf* I 酶切结果。M—DNA 分子量标准; 1—C4064; 2—扬稻 6 号。

A, PCR amplification for C4064 and Yangdao 6 with the primers of the marker 7312. T4A; B, Result of *Hinf* I digestion of PCR products. M, DL2000 Plus ladder marker; 1, C4064; 2, Yangdao 6.

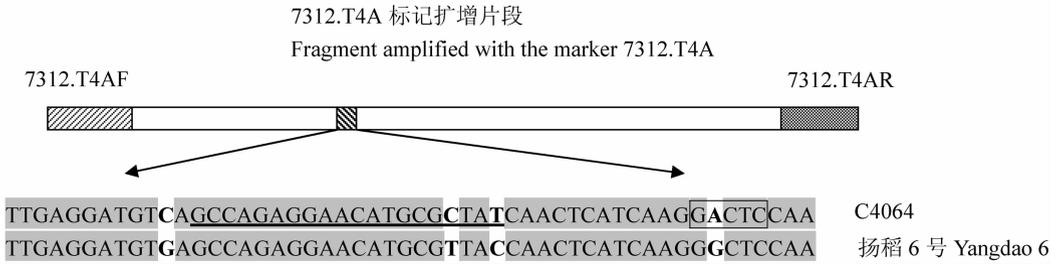


图 3 新引物位点及序列信息

Fig. 3. Location of the new primer KC1F and its sequence.

带下划线部分为设计 KC1F 引物的模板序列; 方框内为 *Hinf* I 酶切位点。

Sequence of the primer KC1F was underlined; Sequence in the box was recognized by the restriction endonuclease *Hinf* I.

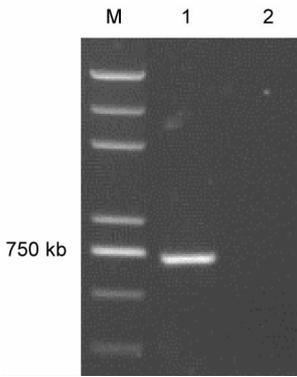


图 4 KC1 标记扩增抗感亲本 C4064 和扬稻 6 号的电泳结果

Fig. 4. Results of PCR amplification for C4064 and Yangdao 6 with the primers of KC1F and 7312. T4AR.

M—DNA 分子量标准; 1—C4064; 2—扬稻 6 号。

M, DL2000 Plus ladder marker; 1, C4064; 2, Yangdao 6.

本 C4064 和感虫亲本扬稻 6 号以及它们的 F₂ 分离单株进行田间接虫鉴定和分子标记检测。接虫鉴定结果显示, 当经典感虫对照品种 TN1 受害等级达到 9 级时, F₂ 群体 4023 和 4027 小区中的亲本 C4064 植株平均受害等级分别为 1.0 级和 1.8 级, 表现高抗; 但此时感虫亲本扬稻 6 号也表现一定抗虫性, 4023 和 4027 小区中扬稻 6 号的平均受害等级分别为 1.7 级和 3.8 级, 说明扬稻 6 号相对于 TN1 也有一定的抗虫性, 但其抗虫性明显弱于 C4064。

以感虫亲本扬稻 6 号为参照, 当其受害程度达到 9 级时, 抗虫亲本 C4064 仍表现高抗, 两个小区中 C4064 单株的平均受害等级分别为 1.2 级和 1.8 级, 说明抗虫亲本 C4064 对我国的褐飞虱田间种群具有很强的抗性。两个小区中 F₂ 群体表现抗虫的单株 ($R > 1$) 有 292 株, 感虫单株 ($R \leq 1$) 有 84 株, 卡平方分析表明抗、感单株符合 3 : 1 分离比例 ($\chi^2 = 1.25, P = 0.264$), 说明分离群体中有 1 个显性主效

基因, 即 *Bph18(t)* 基因, 控制分离群体的抗虫性。

为了检验 KC1 标记跟踪 *Bph18(t)* 基因的效率, 用 KC1 标记引物对 4023 和 4027 分离群体的 F₂ 单株进行 PCR 扩增检测。由于部分植株摘取的叶片量太少以及叶片枯黄等原因, 影响了基因组 DNA 的提取质量, 导致部分植株无 PCR 检测结果。在所检测的 155 个抗虫 F₂ 单株中, 有 128 株分子检测表现为阳性, 扩增出预期的 708 bp 目标特异片段 (图 5), 由此计算出标记 KC1 的选择效率为 82.6% (表 2)。结果表明, 在扬稻 6 号的遗传背景下, 可利用 KC1 标记对抗虫基因 *Bph18(t)* 进行分子标记辅助选择。

3 讨论

分子标记辅助选择育种的前提是必须开发出与目标基因紧密连锁、便于操作的分子标记。*Bph18(t)* 基因是一个抗稻褐飞虱的显性主效基因, Jena 等^[8] 使用 SSR 分子标记技术将其精细定位在水稻第 12 染色体登录号为 AL935072 的 BAC 克隆上, 并开发出 1 个紧密连锁标记 7312. T4A。但 7312. T4A 是一个 CAPS 标记, 检测 *Bph18(t)* 基因时需先进行 PCR 扩增然后酶切才能产生多态性, 操作复杂、成本高, 难以进行大规模的分子检测, 制约了其

表 2 F₂ 群体 155 个抗虫单株的分子标记检测

Table 2. PCR identification of 155 F₂ plants with the resistance to brown planthopper (BPH) with the molecular marker KC1.

F ₂ 群体代号 Code of F ₂ population	抗虫单株 BPH-resistant F ₂ plants		分子检测符合率 MAS efficiency /%
	PCR 阳性 PCR positive	PCR 阴性 PCR negative	
	4023	80	
4027	48	4	92.3
合计 Total	128	27	82.6

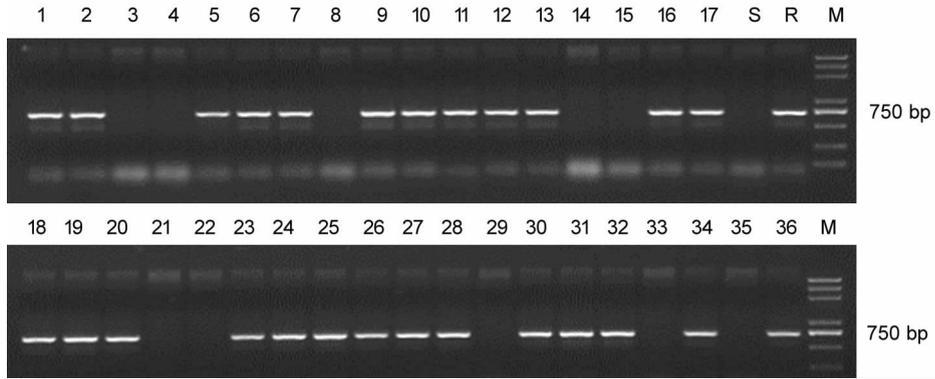


图 5 KC1 标记在扬稻 6 号、C4064 及部分 F₂ 代单株的扩增结果

Fig. 5. Result of amplification with the primers of the marker KC1 for Yangdao 6, C4064 and some of their F₂ plants.

R—抗虫亲本 C4064; S—感虫亲本扬稻 6 号; 3,4,8,14,15,21,22,29,33 和 35 为 F₂ 感虫单株; 其余数字编号为 F₂ 抗虫单株; M—DNA 分子量标准。

R, C4064; S, Yangdao 6; Lanes 1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 34, and 36, BPH-resistant F₂ plants derived from Yangdao 6/C4064; Lanes 3, 4, 8, 14, 15, 21, 22, 29, 33, and 35, F₂ plants susceptible to BPH; M, DL2000 Plus ladder marker.

在分子标记辅助育种中的应用。本研究通过标记扩增片段的测序和利用 SNP 重新设计引物, 将 7312. T4A 标记转化为只需简单 PCR 扩增和电泳检测便表现多态性的 STS 标记, 节约了检测成本, 提高了效率, 在水稻抗虫分子标记辅助育种领域有着广阔的应用前景。

水稻抗褐飞虱鉴定易受环境和其他外界因素影响。本研究应用分蘖期筛选法鉴定供试水稻材料抗虫性, 并选择在 5—8 月夏季开展抗虫鉴定, 充足的光照有利于稻苗的健康生长, 进而保证鉴定的准确性。鉴定结果显示, 亲本扬稻 6 号[不带 *Bph18(t)* 基因]也具有一定的抗虫性, 但抗性水平低于亲本 C4064[含有 *Bph18(t)* 基因]; 当经典感虫对照 TN1 受害等级达 9 级时, 供试的 F₂ 植株绝大部分仍表现抗虫。为了能准确鉴别含有 *Bph18(t)* 基因的稻苗, 我们以扬稻 6 号受害等级达 9 级的时间为参照, 计算每个 F₂ 单株的抗虫指数, 从而判别 F₂ 单株的抗性。依据以上鉴定方法进行分析, F₂ 群体的抗感单株呈 3 : 1 分离, 符合单基因控制的分离规律, 准确反映了 *Bph18(t)* 基因在分离群体中的抗虫表现。同时, 不同鉴定池中的褐飞虱群体数量分布难以达到绝对一致, 池间的虫口压力存在差异, 导致各池的供试稻苗的受害进度不一样, 因此, 我们根据各池中亲本对照扬稻 6 号和 C4064 植株的具体受害情况来判断本池中 F₂ 植株的抗虫性, 以此最大程度地减少环境条件差异产生的鉴定误差。

目前, 根据基因组序列的 SNP 位点设计开发标

记的研究发展十分活跃, 并取得了显著的成绩, 已广泛应用于分子指纹图谱构建、品种鉴定、标记选择、遗传连锁图谱的绘制以及基因精细定位、克隆等研究领域。Lehmensiek 等^[10] 应用高分辨率熔解 (HRM) 技术挖掘大麦基因组中的 SNP 标记, 成功开发出与坚黑穗病抗性基因紧密连锁的 SNP 标记用于分子标记辅助育种。Bao 等^[11-12] 利用水稻相关基因 *Wx*、*SBE3*、*SS II a* 内部的 SNP 位点设计引物, 开展稻米品质特征与标记间的相关性分析, 最终寻找到与表型目标性状紧密连锁的标记, 证明所开发的标记可以用于稻米品质的分子标记辅助育种实践。Hayashi 等^[13] 利用水稻抗稻瘟病基因 *PiZ* 和 *PiZ-t* 附近染色体区段内的 SNP 位点开发标记, 进行目标基因定位研究, 结果证明上述标记是适合进行基因定位的优良技术工具。前人的研究成果已证明利用基因组中 SNP 位点开发标记的可行性, 但由于抗感虫亲本基因组序列间的差异很小, 在此基础上设计的标记容易出现非特异扩增和重复性差等现象, 因此, 必须通过科学设定引物位置和方向, 合理设计引物长度以及扩增过程中的退火温度和延伸时间来保证标记扩增的特异性和稳定性。本研究中, 我们将新标记上游引物 KC1F 的 3' 末端的倒数第 1、第 4 个碱基设计在抗感虫亲本基因组差异位点上, 同时把退火温度设定为 60℃, 以此有效地保证了引物的特异性。新标记多次在抗感亲本间进行重复扩增验证, 电泳结果均未发现非特异扩增产物出现, 证明新标记有很高的可靠性。另外, 我们开发的

KC1 为显性标记,在分子检测过程中,可能有些携带 *Bph18(t)* 基因的单株由于模板 DNA 质量或其他 PCR 技术原因而未能扩增出产物,从而被误划分为感虫植株。因此,在实际应用时,利用 KC1 标记选择 *Bph18(t)* 基因的分子标记辅助选择效率可能比我们计算的 82.6% 要高。

参考文献:

- [1] 肖汉祥,李燕芳,张 扬,等. 水稻抗褐飞虱遗传和育种研究进展. 广东农业科学, 2009(7):124-127.
- [2] 朱述钧. 稻飞虱研究中几个热点问题的研究进展. 安徽农业大学学报, 2006, 33(3):343-346.
- [3] 姜 辉,林荣华,刘 亮,等. 稻飞虱的危害及再猖獗机制. 昆虫知识, 2005, 42(6):612-615.
- [4] 梁云涛,王春连,刘丕庆,等. 水稻抗褐飞虱基因研究和利用现状. 植物遗传资源学报, 2008, 9(1):119-124.
- [5] Rahman M L, Jiang 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*. *Theor Appl Genet*, 2009, 119:1237-1246.
- [6] 苏昌潮,程遐年,翟虎渠,等. 水稻抗褐飞虱遗传和育种研究. 杂交水稻, 2003, 18(4):1-6.
- [7] 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. 中国农业科学, 2006, 39(10): 2132-2137.
- [8] 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.
- [9] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1988, 76:815-829.
- [10] Lehmensiek A, Sutherland M W, McNamara R B. The use of high resolution melting (HRM) to map single nucleotide polymorphism markers linked to a covered smut resistance gene in barley. *Theor Appl Genet*, 2008, 117:721-728.
- [11] Bao J S, Corke H, Sun M. Microsatellites, single nucleotide polymorphisms and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in nonwaxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2006, 113:1185-1196.
- [12] Bao J S, Corke H, Sun M. Nucleotide diversity in starch synthase IIa and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2006, 113:1171-1183.
- [13] Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, et al. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theor Appl Genet*, 2004, 108:1212-1220.