

云南野生稻抗褐飞虱评价 及其抗性基因鉴定

邢佳鑫^{1,2}, 陈玲², 李维蛟³, 张敦宇², 钟巧芳², 程在全^{2*}

(1 云南农业大学 农学与生物技术学院, 昆明 650201; 2 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 昆明 650223; 3 云南中医药大学, 昆明 650500)

摘要: 褐飞虱是水稻生产中最严重的害虫之一, 从野生稻中发掘抗虫基因, 有利于培育具有抗虫能力强水稻新品种。该研究通过对云南野生稻进行温室和大田抗虫鉴定以及 9 个已知抗褐飞虱基因的 PCR 鉴定, 发现云南野生稻对褐飞虱表现出不同程度的抗性, 尤其疣粒野生稻和药用野生稻对褐飞虱表现出高抗, 可作为抗虫基因发掘的优良抗源材料; 不同褐飞虱抗性的云南野生稻中含有的抗褐飞虱基因差异很大, 3 种野生稻中均不含 *Bph1* 和 *Bph18(t)* 抗病基因, 景洪普通野生稻和元江普通野生稻可能含 *bph2* 基因, 东乡普通野生稻可能含 *bph2*、*Bph15* 和 *Bph27(t)* 基因, 疣粒野生稻中可能含 *bph2* 和 *bph19(t)* 基因, 药用野生稻和药用野生稻(宽叶型)中可能含 *bph2* 和 *Bph6* 基因, 药用野生稻 F₁ 中可能含 *bph2*、*Bph14* 和 *bph20(t)* 基因, 药用野生稻 F₂ 中可能含 *bph2* 和 *Bph27(t)* 基因或者其同源基因。该研究为快速发掘利用云南野生稻中的抗虫基因奠定了理论基础。

关键词: 云南野生稻; 抗褐飞虱; 连锁标记

中图分类号: Q789 文献标志码: A

Evaluation of the Brown Plant Hopper Resistance and Identification of Resistance Genes from Wild Rice in Yunnan

XING Jiaxin^{1,2}, CHEN Ling², LI Weijiao³, ZHANG Dunyu², ZHONG Qiaofang², CHENG Zaiquan^{2*}

(1 College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2 Biotechnology and Germplasm Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China; 3 Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650000, China)

Abstract: The brown plant hopper (BPH), *Nilaparvata lugens*, is one of the most destructive pests in rice production. Exploring resistance resources and developing resistance varieties of rice is a low cost and effective solution for protecting rice from BPH. Exploring BPH resistance genes from Yunnan wild rice materials could be used for developing new varieties of rice with high resistance. In this study, nine BPH resistance genes were detected in samples of Yunnan wild rice by phenotypic and PCR identification. The results showed that: Yunnan wild rice got different levels of resistance to BPH. Particularly, *O. granulata* and *O. officinalis* were highly resistant to the pest and could be used as excellent materials of insect resistance in breeding. According to PCR detection, the resistance genes *Bph1* and *Bph18(t)* were not found in all three wild rice materials. *O. rufipogon* from Yuanjiang and Jinghong probably carry *bph2*. *O. rufipogon* from

收稿日期: 2015-05-15; 修改稿收到日期: 2015-10-22

基金项目: 国家自然科学基金(31460478); 农业部转基因专项(2011ZX08001-001); 云南省科技项目(2012CH010); NSFC-云南联合重点项目(U1302265)

作者简介: 邢佳鑫(1989—), 在读硕士研究生, 主要从事水稻遗传育种研究。E-mail: xingjiaxin1019@sina.com

* 通信作者: 程在全, 博士, 研究员, 主要从事野生稻优良基因的发掘与利用研究。E-mail: czquan-99@163.com

Dongxiang probably carry *bph2*, *Bph15* and *Bph27(t)*. *O. granulata* probably carry *bph2* and *bph19(t)*. *O. officinalis* and *O. officinalis* (broadleaf) probably carry *bph2* and *Bph6*, respectively. *O. officinalis* F₁ probably carry *bph2*, *Bph14* and *bph20(t)*. *O. officinalis* F₂ probably carry *bph2* and *Bph27(t)*. These results provided a solid basis for exploring and using new BPH resistance genes from Yunnan wild rice.

Key words: Yunnan wild rice; brown plant hopper (BPH) resistance; linked marker

稻飞虱是危害水稻生产的主要虫害,对粮食安全构成严重威胁^[1]。稻飞虱包括褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)、白背飞虱(*Sogatella furcifera* Horvath)、灰飞虱(*Laodelphax striatellus* Fallén) 3种^[2],其中褐飞虱危害最为严重,是中国及亚洲稻区首要的迁飞性害虫,2005年褐飞虱大暴发,为害达1 733万hm²以上。近年来,化学杀虫剂的使用在虫害防治上发挥了重要作用,但对害虫天敌也同样存在杀伤力,有些甚至能刺激褐飞虱产卵,长期使用还使褐飞虱产生抗药性,而且,化学药剂不可避免地污染和破坏了环境,引起稻谷农药残留和品质下降^[3]。从众多措施来看,培育抗虫品种是提高水稻抗虫性的有效途径,也是最经济、有效和安全的防治手段。目前,从野生稻中发掘抗褐飞虱的抗源材料已成为研究热点。

已鉴定的抗稻褐飞虱主效基因中,近年新发现的抗性基因大部分来自野生稻,这是因为野生稻在长期的进化过程中,经受了病虫害等各种逆境胁迫的自然选择,具有丰富的遗传多样性以及抗病虫等许多优良的抗逆遗传特性及其基因库^[4]。但从云南野生稻中发掘稻飞虱抗源还未见报道。

经过多年努力,科学家在抗褐飞虱基因的鉴定和定位研究方面取得了很大成绩,截至2015年,经国际注册确认和报道的水稻抗褐飞虱基因共27个,已定位的有20个,已成功克隆的只有*Bph14*^[5]。此外,还鉴定了一些重要的抗性QTLs。*Bph14*是水稻中第一个从带有药用野生稻背景的基因渗入系B5中克隆的显性抗虫基因,*Bph14*基因在不同遗传背景下抗性比较稳定^[5]。通过鉴定云南野生稻对褐飞虱的抗性,可以从中发掘含有*Bph14*基因的抗源材料;*Bph1*^[6]、*bph2*^[7]、*Bph6*^[8]、*Bph15*^[9]、*Bph18(t)*^[10]、*bph19(t)*^[11]、*bph20(t)*^[12]、*Bph27(t)*^[13] 8个水稻抗褐飞虱基因的定位,可为水稻抗褐飞虱基因的分子标记辅助育种提供基础。郑康乐等^[14]认为,分子标记与目的基因的遗传距离要小于5cM。如烟草育种中,高玉龙等^[15]筛选出的N2标记与TMV基因的遗传距离为4.3cM,经验证该标记与品种TMV抗性的吻合率可达97.62%,可靠性非

常高。利用连锁标记对云南野生稻的这些抗褐飞虱基因进行鉴定,是一种筛选育种用抗源材料的方便快捷并且很实用的方法。

抗褐飞虱种质资源鉴定是水稻抗稻飞虱品种育种的基础。为此我们在温室及大田中进行了云南野生稻的褐飞虱抗性鉴定评价;根据已克隆的*Bph14*基因CDS区设计特异引物,并利用已定位抗虫基因的连锁标记,对云南野生稻中的抗褐飞虱基因进行鉴定和分析。本试验中所利用的8个连锁标记与目标基因的遗传距离都很小,有的甚至与目的基因共分离,可靠性较高。通过这些实验筛选出优良的抗源材料,为今后利用云南野生稻培育抗褐飞虱水稻新品种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

试验材料有景洪普通野生稻,东乡普通野生稻,元江普通野生稻,药用野生稻与93-11杂交后代F₁、F₂,药用野生稻,药用野生稻(宽叶型),疣粒野生稻,栽培稻‘日本晴’和93-11,其中‘日本晴’和93-11为感褐飞虱的对照品种。所有材料都收集于云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所温室内。

1.2 褐飞虱的采集与培养

褐飞虱采集于云南省玉溪市元江县(101°39′~102°22′E、23°18′~23°55′N)的水稻试验田,在温室内用感褐飞虱品种93-11稻苗进行隔离培养。

1.3 温室野生稻成株期模拟自然种群鉴定法

在温室中,在野生稻成株期将培养好的褐飞虱释放于每一个改良的通风透气的网罩培养室里。这一改良的设施,使得褐飞虱及水稻的生存环境为模拟大田环境,保证褐飞虱的温室生活环境与大田生活环境一致,从而避免因环境的改变影响褐飞虱的取食习性,确保实验调查的准确性。对温室中的每个野生稻供试材料进行网罩培养,每样品5盆,在分蘖中期每盆平均接褐飞虱密度为10~12头,当对照品种死苗率为95%左右时,调查和记录各供试材料的受害程度和死苗率,调查方法参照(表1)方法。根据受害程度和死苗率评定抗性级别。设立感褐飞

虱水稻品种为对照。继续常规的水肥和栽培管理,苗期至收获期不施任何农药。

1.4 大田药用野生稻成株期自然种群鉴定法

试验设在云南省元江县农业技术推广站基地(101°39'~102°22'E,23°18'~23°55'N)。海拔平均380 m,年均气温 23.8 °C,属于“天然温室”气候。试验点选在药用野生稻异位保护区,每株稻桩为一个样品,每个样品 3 个重复。在每一个药用野生稻稻桩旁边 100 cm 处,种植感褐飞虱品种作为对照。

感褐飞虱水稻种子经催芽播种 25 d 后移栽,正常水肥管理,水稻生长前期,在试验区周围的保护行多施 1 次氮肥,以诱发褐飞虱发生。不再施用任何对褐飞虱有影响的农药,以利褐稻虱的发生。通过目测法调查记录每丛稻株上的褐飞虱成虫数量,方法参考稻飞虱测报调查规范(GB/T15794-200X)^[16]。

1.5 供试材料 DNA 的提取

取水稻新鲜嫩叶片剪碎放入干净的 2 mL 离心管中,液氮充分冷冻后,用研钵将其磨碎,直至被研磨的样品呈粉末状。在磨碎样品解冻前,加入 900 μL 65 °C 预热的 2% CTAB 提取缓冲液,轻轻转动离心管使研磨的粉末在提取液中均匀分散,放入 65 °C 的水浴锅中温浴 30 min,期间不时轻轻转动离心管。30 min 后拿出离心管,自然状态下冷却至室温后加入等体积的氯仿/异戊醇(24 : 1),轻轻来回颠倒几次,使管内的混合物均匀混合,室温下 12 000 r/min 离心 15 min。吸取上清液至另一新的 2 mL 离心管中,重复第 3 步骤。吸取上清液至另一新的 1.5 mL 离心管中,弃去留有沉淀物的离心管,加入

等体积的提前预冷好的异丙醇,轻轻混匀,放置-20 °C 冰箱沉淀 10~30 min。10 000 r/min 离心 5 min,去上清,用 75% 乙醇清洗沉淀。10 000 r/min 离心 2 min,除去 75% 乙醇,再用无水乙醇清洗沉淀。10 000 r/min 离心 2 min,除去无水乙醇,自然风干,加 50 μL ddH₂O 溶解。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。长期保存于-20 °C 备用。

1.6 PCR 扩增

1.6.1 Bph14 基因的扩增 *Bph14* 基因的 4 个特异性引物序列详见表 2,PCR 反应体系为 10×PCR 反应缓冲液(含 Mg²⁺) 2 μL,4×dNTP 溶液(2.5 mmol/L)1.6 μL,引物(10 pmol/μL)0.8 μL,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,模板 DNA 2 μL,加 ddH₂O 补足反应体系 20 μL。PCR 程序参照文献^[17]方法,94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,52~54 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 30~60 s,72 °C 延伸 10 min,40 个循环。

1.6.2 其它抗褐飞虱基因的扩增 其它抗褐飞虱基因及其连锁标记的引物序列详见表 3,PCR 反应体系,为 10×PCR 反应缓冲液(含 Mg²⁺) 2 μL,4×dNTP 溶液(2.5 mmol/L)1.6 μL,引物(10 pmol/μL)0.8 μL,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,模板 DNA 2 μL,加 ddH₂O 补足反应体系 20 μL。反应程序为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,退火温度参照表 3,30 s,72 °C 延伸 30~60 s,72 °C 延伸 10 min,40 个循环。

1.7 数据分析

采用 Excel 软件进行数据分析。

表 1 水稻材料抗褐飞虱鉴定评价标准

Table 1 Assessment scale for plant hopper resistance in rice

抗性级别 Resistance score	受害程度 Damaged level	死苗率 Mortality rate/%	抗性水平 Resistance level
0	未受害 Undamaged	<1.0	高抗 High resistant(HR)
1	受害极轻微 Damaged very slightly	1.1~10.0	抗 Resistant(R)
3	大部分植株第 1,2 叶部分黄色 Partly yellow in first and second leaves of most plants	10.1~30.0	中抗 Middle resistant(MR)
5	明显黄化萎缩或近半数植株枯死 Clearly yellow atrophied or nearly half plants died	30.1~50.0	中感 Middle susceptible(MS)
7	半数以上植株枯死 More than half of the plants died	50.1~70.0	感 Susceptible(S)
9	全部植株枯死 All died	>70.1	高感 High susceptible(HS)

表 2 Bph14 基因的 4 个特异性引物^[17]

Table 2 Sequences of specific primer pairs to *Bph14* gene^[17]

引物 Primer	正向引物 Forward sequence	反向引物 Reverse sequence	预期片段大小 Fragment size/bp
M1	ATGGCGGAGCTAATGGCCACCA	AGAGTTCTTTATATCATGGAAGTCA	1 491
M2	GATCATGAGATTGACGTGAAA	AAGTCACTTAGCTTTGGTG	1 541
M3	AGTCGATGGAAGTCCAAGGG	GATGAGTATGCTTGAGGCC	1 025
M4	AATCTTGCTTAGGAGAGCTCGC	CTACTTCAAGCACATCAGC	919

表 3 抗褐飞虱基因及其连锁标记^[6-13]
Table 3 Brown plant hopper resistance genes and functional markers^[6-13]

基因 Gene	供体品种 Donor	染色体 Chr.	连锁标记 Linked marker	与基因距离 DG/cM	引物序列(5'→3') Sequence of primer	退火温度 TM/°C	产物长度 Produce length/bp
<i>Bph1</i> ^[6]	Mudgo	12	pBPH9	0.0	F:AGCGCTGGTCGTTGGGGTTGTAGT R:ATTAAGAGTGATCGCAGCCGTTTCG	58	536(R) 773(S)
<i>bph2</i> ^[7]	ASD7	12	RM463	7.2	F:TTCCCTCCTTTTATGGTGC R:TGTTCCTCAGTCACTGCG	55	195(R)
<i>Bph6</i> ^[8]	Swarnalata	4	RM119	—	F:CATCCCCTGCTGCTGCTGCTG R:CGCCGGATGTGTGGGACTAGCG	55	166(R)
<i>Bph15</i> ^[9]	<i>O. officinalis</i>	4	MS5	<0.3	F:TTGTGGGTCTCATCTCCTC R:TGACAACTTGTGCAAGATCAAA	55	200(R)
<i>Bph18(t)</i> ^[10]	<i>O. rufipogon</i>	4	RM273	6.0	F:GAAGCCGTCGTGAAGTTACC R:GTTTCTACCTGATCGCGAC	55	230(R)
<i>bph19(t)</i> ^[11]	<i>O. rufipogon</i>	12	RM17	16.7	F:TGCCCTGTTATTTTCTTCTCTC R:GGTGATCCTTTCCATTTC	55	180(R)
<i>bph20(t)</i> ^[12]	<i>O. minuta</i>	6	BYL7	1.3	F:AAGCTAGGAATCAGCGGTTA R:TGTGGCATGCACTCACTCAC	57	142(R)
<i>Bph27(t)</i> ^[13]	<i>O. rufipogon</i>	4	RM16852	0.0	F:GTAGCCTTGCACTCGACCGTACC R:ACCAACTGCGCAATGCATCC	55	97(R)

注:—表示不知与目的基因的距离;R表示抗病带型;S表示感病带型。

Note:—No idea about the distance;R. Resistant;S. Susceptible.

2 结果与分析

2.1 温室中野生稻对褐飞虱的抗性表型

不同野生稻材料对褐飞虱表现出不同的抗性表型。药用野生稻与93-11的后代F₁、药用野生稻、药用野生稻(宽叶型)和疣粒野生稻植株4种材料均未受到褐飞虱危害,生长依旧旺盛,植株的茎基部至第一叶基部之间未见到褐飞虱侵害的寄生痕迹(图1,A),表现出高抗褐飞虱的性状,抗性表型为高抗(HR),抗性级别为0级(图1,B)。景洪普通野生稻、东乡普通野生稻、元江普通野生稻和药用野生稻F₂代4种材料均受到褐飞虱侵害,在植株茎基部至第一叶基部之间可观察到褐飞虱侵害的取食痕迹及褐飞虱为繁衍后代所产卵处的黑褐色痕迹(图1,A),抗性表型分别为中抗(MR)、中感(MS)、抗(R)、中抗(MR)。对照品种‘日本晴’(图1,C)和93-11(图1,D)几乎已经枯死,在叶部的叶柄处可观察到褐飞虱幼虫及若虫的排泄物的痕迹(图1,C、D),表现高感(HS)。

2.2 大田中药用野生稻对褐飞虱的抗性

在药用野生稻及栽培稻93-11抽穗期,93-11上的褐飞虱虫口密度极高,平均每片叶子上有15头以上的褐飞虱(图2,A、C),在93-11植株的茎部及叶片有多处褐飞虱侵害的症状及寄居的痕迹,危害后的症状同温室中接虫后的症状一致(图1,D)。而药用野生稻(图2,B)的叶子上只有1头褐飞虱或者没有,并且植株上很少有褐飞虱侵害的症状及寄居的

痕迹。大田中的调查结果与温室中鉴定的结果(图2,C)一致。温室和大田褐飞虱抗性表型鉴定结果均表明药用野生稻对褐飞虱具有较强的抗性。

2.3 云南3种野生稻褐飞虱抗性基因的鉴定

2.3.1 *Bph14* 基因的分子检测

用4个覆盖整个*Bph14* CDS区域的特异引物扩增供试材料(图3)。M1分析表明,只有疣粒野生稻品未扩增出1491 bp左右的片段,其它材料都扩增出了目的片段;M2分析表明,药用野生稻F₂、药用野生稻和药用野生稻(宽叶型)未扩增出1541 bp左右的片段,其它材料都扩增出了目的片段;M3分析表明,药用野生稻F₁、F₂和药用野生稻(宽叶型)扩增出了1025 bp左右的片段,其它材料未扩增出目的片段;M4分析表明,日本晴、93-11、药用野生稻F₁和F₂扩增出了919 bp左右的片段,其它材料未扩增出目的片段。综上所述(表4),4个引物都在药用野生稻F₁中扩增出了目的条带,其余材料只是部分引物扩增出目的条带,所以表明了药用野生稻F₁含有*Bph14*基因或其同源基因。

2.3.2 其它抗褐飞虱基因的分子标记检测

利用分别与*Bph1*、*bph2*、*Bph6*、*Bph15*、*Bph18(t)*、*bph19(t)*、*bph20(t)*和*Bph27(t)*基因紧密连锁标记检测供试材料含有抗褐飞虱基因的情况(图4)。*Bph1*基因的连锁标记pBPH9分析表明,10个供试材料都未扩增出536 bp左右的片段,即都不含*Bph1*基因(图4,A)。*bph2*基因的连锁标记RM463分析表明,10个供试材料都扩增出195 bp

左右的片段,即都含 *bph2* 基因或同源基因(图 4, B)。 *Bph6* 基因的连锁标记 RM119 分析表明,药用野生稻和药用野生稻(宽叶型)都扩增出 166 bp 左右的片段,即含 *Bph6* 基因或同源基因(图 4, C)。 *Bph15* 基因的连锁标记 MS5 分析鉴定,东乡普通野生稻扩增出 200 bp 左右的片段,即含 *Bph15* 基

因或同源基因(图 4, D)。 *Bph18(t)* 基因的连锁标记 RM273 分析表明,10 个供试材料都未扩增出 230 bp 左右的片段,即都不含 *Bph18(t)* 基因或同源基因(图 4, E)。 *bph19(t)* 基因的连锁标记 RM17 分析表明,疣粒野生稻扩增出 180 bp 左右的片段,即含 *bph19(t)* 基因或同源基因(图 4, F)。 *bph20(t)* 基

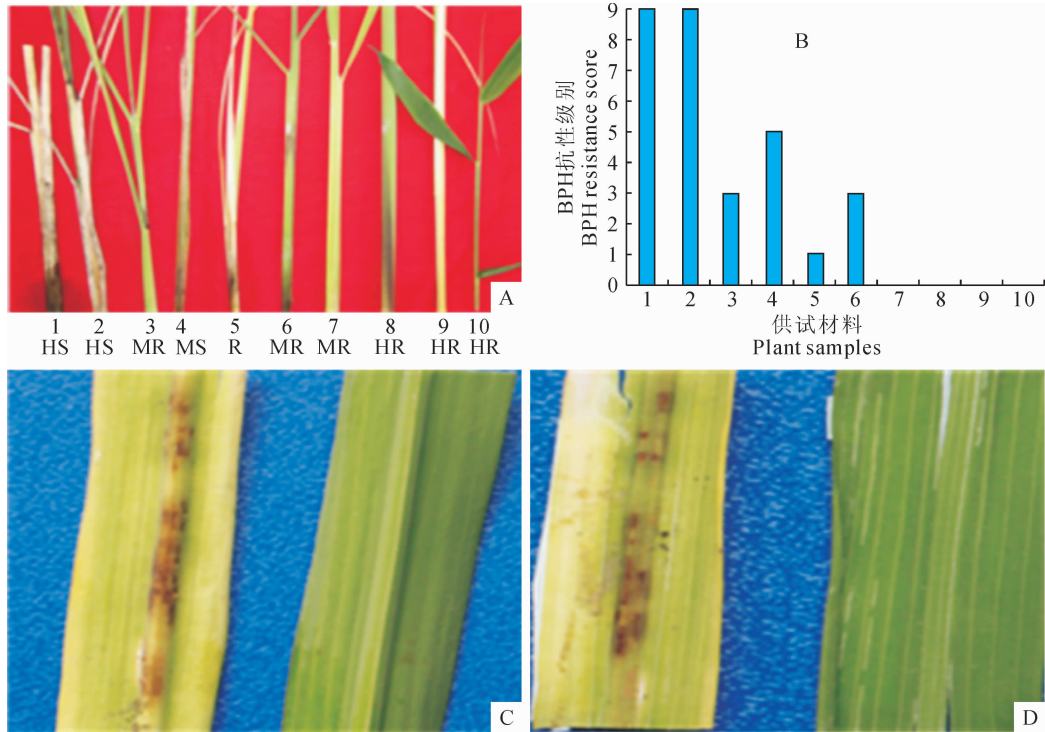


图 1 温室中褐飞虱对野生稻及对对照的危害症状

1. 日本晴;2. 93-11;3. 景洪普通野生稻;4. 东乡普通野生稻;5. 元江普通野生稻;6. 药用野生稻 F₁;7. 药用野生稻 F₂; 8. 药用野生稻;9. 药用野生稻(宽叶型);10. 疣粒野生稻;HS. 高感;MR. 中抗;MS. 中感;R. 抗;HR. 高抗;BPH. 褐飞虱;下同

Fig. 1 Symptom of wild rice and CK were infested with BPH in the greenhouse

1. Japonica; 2. 93-11; 3. *O. rufipogon* from Jinghong; 4. *O. rufipogon* from Dongxiang; 5. *O. rufipogon* from Yuanjiang; 6. *O. officinalis* F₁; 7. *O. officinalis* F₂; 8. *O. officinalis*; 9. *O. officinalis* (broadleaf); 10. *O. granulata*; HS. High Susceptible; MR. Middle Resistant; MS. Middle Susceptible; R. Resistant; HR. High Resistant; BPH. Brown planthopper (PH); The same as below

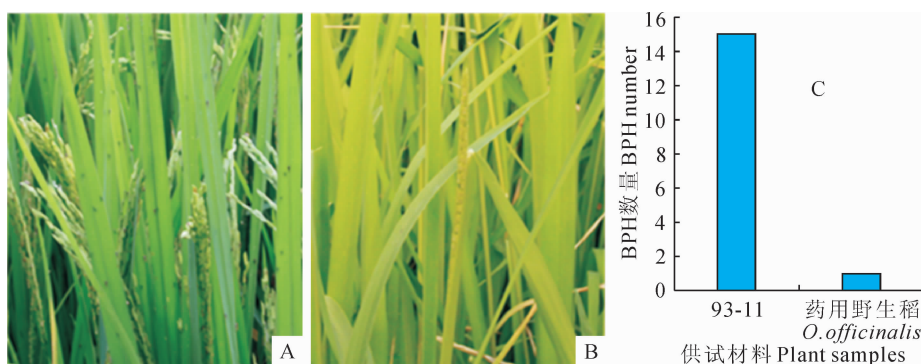


图 2 田间药用野生稻对褐飞虱的抗性表型

A. 对照 93-11; B. 药用野生稻; C. 褐飞虱头数

Fig. 2 Reaction of *O. officinalis* to BPH in the field

A. CK 93-11; B. *O. officinalis*; C. BPH number

表 4 4 个特异性引物 PCR 扩增情况
Table 4 PCR results of 4 specific primers

样品名称 Material	M1(1 491 bp)	M2(1 541 bp)	M3(1 025 bp)	M4(919 bp)
日本晴 Japonica	✓	✓		✓
93-11	✓	✓		✓
景洪普通野生稻 <i>O. rufipogon</i> from Jinghong	✓	✓		
东乡普通野生稻 <i>O. rufipogon</i> from Dongxiang	✓	✓		
元江普通野生稻 <i>O. rufipogon</i> from Yuanjiang	✓	✓		
药用野生稻 F ₁ <i>O. officinalis</i> F ₁	✓	✓	✓	✓
药用野生稻 F ₂ <i>O. officinalis</i> F ₂	✓		✓	✓
药用野生稻 <i>O. officinalis</i>	✓			
药用野生稻(宽叶型) <i>O. officinalis</i> (broadleaf)	✓		✓	
疣粒野生稻 <i>O. granulata</i>		✓		

注: M1、M2、M3 和 M4 分别为 *Bph14* 基因的 4 个特异性引物; 下同。✓. 扩增到目的条带。

Note: M1, M2, M3, M4. The 4 specific primers of *Bph14*; The same as below. ✓. Bands can be amplified.

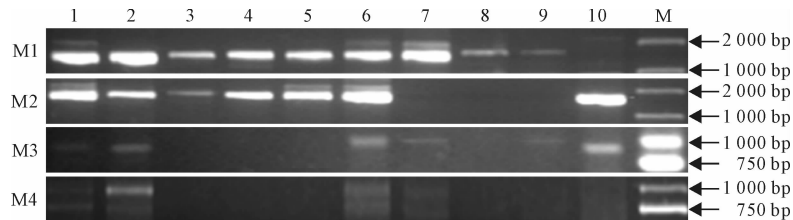


图 3 *Bph14* 特异性引物 PCR 扩增电泳图

M1~M4 同表 4; 1~10 同图 1; M. DL2000

Fig. 3 PCR products were amplified by specific primers of *Bph14*

M1-M4. The same as Table 4; 1-10. The same as Fig. 1; M. DL2000

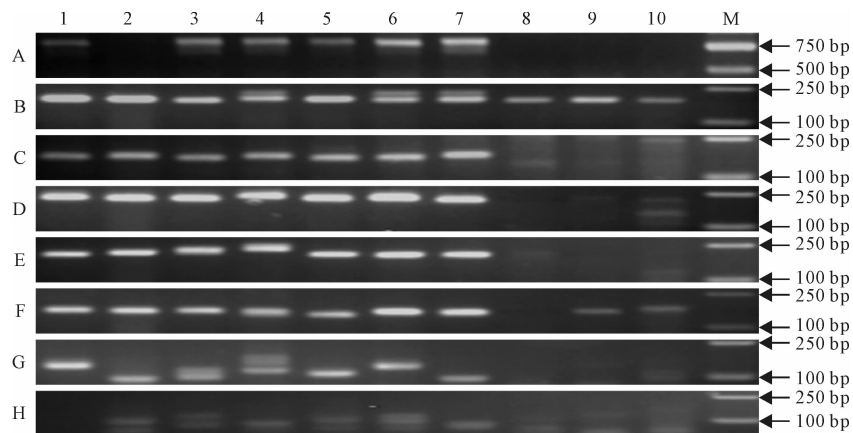


图 4 连锁标记的 PCR 扩增电泳图

A~H 分别为连锁标记 pBH9、RM463、RM119、MS5、RM273、RM17、BYL7、RM16852 的扩增结果; 1~10 同图 1; M. DL2000

Fig. 4 PCR products amplified by linked markers

A-H. PCR products amplified by linked markers(pBH9, RM463, RM119, MS5, RM273,

RM17, BYL7, RM16852); 1-10. The same as Fig. 1; M. DL2000

因的连锁标记 BYL7 分析表明, 药用野生稻 F₁ 扩增出 142 bp 左右的片段, 即含 *bph20(t)* 基因或同源基因(图 4, G)。*Bph27(t)* 基因的连锁标记 RM16852 分析表明, 东乡普通野生稻和药用野生稻 F₂ 扩增出 97 bp 左右的片段, 即含 *Bph27(t)* 基因或同源基因

(图 4, H)。

上述检测(表 5; 图 1, A)结果表明, 云南野生稻所含抗褐飞虱的基因各不相同, 景洪普通野生稻和元江普通野生稻含有基因 *bph2*, 表型检测结果显示景洪普野为中抗, 元江普野为抗。而东乡普通野生

表 5 云南野生稻对褐飞虱的抗性基因
Table 5 Resistance genes of Yunnan wild rice

品种 Cultivar	携带的抗虫基因 Resistance gene
日本晴 Japonica	<i>bph2</i>
93-11	<i>bph2</i>
景洪普通野生稻 <i>O. rufipogon</i> from Jinghong	<i>bph2</i>
东乡普通野生稻 <i>O. rufipogon</i> from Dongxiang	<i>bph2, Bph15, Bph27(t)</i>
元江普通野生稻 <i>O. rufipogon</i> from Yuanjiang	<i>bph2</i>
药用野生稻 F ₁ <i>O. officinalis</i> F ₁	<i>bph2, bph20(t), Bph14</i>
药用野生稻 F ₂ <i>O. officinalis</i> F ₂	<i>bph2, Bph27(t)</i>
药用野生稻 <i>O. officinalis</i>	<i>bph2, Bph6</i>
药用野生稻(宽叶型) <i>O. officinalis</i> (broadleaf)	<i>bph2, Bph6</i>
疣粒野生稻 <i>O. granulata</i>	<i>bph2, bph19(t)</i>

稻可能含有基因 *bph2*、*Bph15* 和 *Bph27(t)*, 其表型检测为中感, 这说明在景洪普通野生稻和元江普通野生稻中可能含有其它本研究中没有鉴定的抗虫基因。药用野生稻 F₂ 可能含有基因 *bph2* 和 *Bph27(t)*, 表现为中抗。药用野生稻和药用野生稻(宽叶型)中可能含有基因 *bph2* 和 *Bph6*, 疣粒野生稻中可能含有基因 *bph2*、*bph19(t)*, 药用野生稻 F₁ 中可能含有基因 *bph2*、*Bph14* 和 *bph20(t)*, 三者均表现为高抗。

3 讨论

温室接虫鉴定及大田调查鉴定结果表明云南 3 种野生稻具有不同程度的抗褐飞虱性状, 尤其疣粒野生稻与药用野生稻表现出高抗褐飞虱的性状。抗褐飞虱种质资源鉴定的抗性选择是水稻抗褐飞虱品种育种的基础。刘光杰等^[18]进行了水稻品种不同褐飞虱抗性鉴定方法的比较研究, 从苗期和分蘖盛期稻苗对褐飞虱的抗性反应得出, 苗期群体筛选、苗期单株接虫鉴定及分蘖期单株接虫鉴定抗性表现是一致的。因此, 本实验仅对野生稻分蘖盛期接褐飞虱的抗性表型进行调查, 所得到的结果可以准确的代表并判断云南野生稻对褐飞虱的抗性水平。在定位新的抗褐飞虱基因时, 抗性表型鉴定的准确

性也是精确定位目的基因的关键因素, 褐飞虱与水稻间的相互作用过程复杂, 使得抗性鉴定受环境影响较大, 评价标准不易量化, 现采用的鉴定方法均存在各自的缺点, 须进行针对性的优化, 进一步提高抗虫表型水平的精度, 以满足下一步基因克隆的需要。

已鉴定的抗稻褐飞虱主效基因大部分来自野生稻, 这是因为野生稻长期处于野生状态, 经受了各种病虫害的自然选择, 抗病虫性较强, 具有丰富的遗传多样性。*Bph14* 基因是从药用野生稻中克隆出来的, 本研究从普通野生稻和疣粒野生稻中未检测出 *Bph14* 基因, 而 3 份药用野生稻中也并不是都检测出 *Bph14* 基因的特异标记引物, 说明 *Bph14* 基因在不同的材料中差异较大。本研究只从药用野生稻 F₁ 材料中检测出该基因, 且表型鉴定为中抗褐飞虱, 而其亲本栽培稻 93-11 为高感型, 这说明了药用野生稻 F₁ 的抗性来自亲本药用野生稻, 进一步验证了从野生资源发掘抗褐飞虱基因, 用于培育抗虫水稻品种的可行性。将该材料的抗虫基因克隆后转化到栽培稻, 或者通过与栽培水稻远缘杂交胚挽救后进一步选育, 可以培育抗稻飞虱水稻新品种。

本研究采用 4 个特异标记检测野生稻中的 *Bph14* 基因, 可以较准确地分析野生稻中的 *Bph14* 基因。为了保证辅助选育的可靠性, 对于已经克隆的基因, 可以针对目的基因序列设计多个引物, 并且设计的引物要覆盖整个编码区域。对于未克隆的基因, 想用连锁标记辅助育种, 就要寻找与目的基因紧密连锁的分子标记, 如果能在目标基因两侧找到紧密连锁的标记, 能进一步提高选择的可靠性^[19]。本试验中利用的连锁标记与目标基因的遗传距离都很小, 有的甚至与目的基因共分离, 用于选育的可靠性较高, 但也有几个标记与目标基因的遗传距离相对较远, 如 RM463 与 *bph2* 基因的遗传距离为 7.2 cM, 试验结果发现供试材料可能都含有 *bph2* 基因, 就连感虫对照‘日本晴’和 93-11 都可能含有该基因, 所以该基因的鉴定还需进一步选用与其紧密连锁的标记进行鉴定。

参考文献:

- [1] WATANABE T, KITAGAWA H. Photosynthesis and translocation of assimilates in rice plants following phloem feeding by the planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae)[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2000, **93**(4): 192-198.
- [2] MYINT K K M, FUJITA D, MATSUMURA M, et al. Mapping and pyramiding of two major genes for resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) in the rice cultivar ADR52[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2012, **124**: 495-504.

- [3] E ZH G(鄂志国), CHENG B Y(程本义), JIAO G A(焦桂爱), *et al.* Identification and application of resistance genes to brown planthopper[J]. *Acta Phytophylacica Sinica* (植物保护学报), 2008, **35**(3): 279–284(in Chinese).
- [4] CHENG Z Q(程在全), HUANG X Q(黄兴奇), QIAN J(钱 军), *et al.* Characteristics and discovery of the newly found natural live material of *Oryza officinalis* at edge of extinction in Yunnan[J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 2004, **26**(3): 267–274(in Chinese).
- [5] DU B, ZHANG W, LIU B, *et al.* Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, **106**(52): 22 163–22 168.
- [6] KIM S M, SOHN J K. Identification of a rice gene (*Bph1*) conferring resistance to brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) using STS markers[J]. *Mol. Cells*, 2005, **20**: 30–34.
- [7] SUN L H, WANG C M, *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.
- [8] 武汉大学. 水稻抗褐飞虱主效基因 *Bph6* 的分子标记及其应用(CN101914531A)[P]. 中国: 2010-12-15.
- [9] YANG H Y, YOU A Q, YANG Z F, *et al.* High-resolution genetic mapping at the *Bph15* locus for brown planthopper resistance in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2004, **110**: 182–191.
- [10] 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.) [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2006, **112**: 288–297.
- [11] CHEN J W, WANG L, PANG X F, *et al.* Genetic analysis and fine mapping of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance gene *bph19(t)* [J]. *Mol. Genet Genom.*, 2006, **1**: 1–9.
- [12] ZHAO P(赵 鹏), FENG R R(冯冉冉), XIAO Q ZH(肖巧珍), *et al.* Pyramiding brown planthopper genes, *bph20(t)* and *bph21(t)*, and rice blast resistant gene *Pi9* in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Journal of Southern Agriculture* (南方农业学报), 2003, **44**(6): 885–892(in Chinese).
- [13] HUANG D, QIU Y, ZHANG Y, *et al.* Fine mapping and characterization of *Bph27*, a brown planthopper resistance gene from wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2013, **126**: 219–229.
- [14] ZHENG K L(郑康乐), HUANG N(黄 宁). Outlook on the application of marker-assisted selection in rice improvement[J]. *Hereditas* (Beijing)(遗传), 1997, **19**(2): 40–44(in Chinese).
- [15] GAO Y L(高玉龙), XIAO B G(肖炳光), TONG ZH J(童治军), *et al.* Identification of molecular markers linked to TMV resistance gene in tobacco and its application in screening resistance varieties[J]. *Molecular Plant Breeding* (分子植物育种), 2011, **9**(5): 585–591(in Chinese).
- [16] GB/T15794-200X 褐飞虱测报调查规范[S]. Rules of investigation and forecast for the rice planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal and *Sogatalla furcifera* Horvath).
- [17] MAI P T T, HONG H T K. *Bph14* gene determining brown-planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance in rice varieties (*Oryza sativa* L.) [J]. *Annals of Biological Research*, 2012, **3**(3): 1 424–1 433.
- [18] LIU G J(刘光杰), FU ZH H(付志红), SHEN J H(沈君辉), *et al.* Comparative study on evaluation methods for resistance to rice plant hoppers (Homoptera: Delphacidae) in rice[J]. *Chinese Journal of Rice Science* (中国水稻科学), 2002, **16**(1): 52–56(in Chinese).
- [19] TANKSLEY S D, YOUNG N D, PATERSON A H, *et al.* RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science[J]. *Nature Biotechnology*, 1989, **7**: 257–264.

(编辑: 宋亚珍)