

水稻穗顶部退化基因 *PAA2* 的精细定位

李 真¹, 毛毕刚², 衡月芹¹, 王久林¹, 程治军¹, 万建民¹

(¹中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ²湖南杂交水稻研究中心, 长沙 410125)

摘要: 鉴定和克隆水稻穗顶部退化突变体新基因, 对研究小穗顶部退化的分子机制及克服育种和生产实践中因穗顶部退化引起的产量损失具有重要的理论和现实意义。本研究报道了一个来源于中花 11 的穗顶部退化突变体, 暂命名为 Panicle Apical Abortion 2(*paa2*)。该突变体的穗顶部小穗发育异常、退化, 后期退化部分脱落, 稻穗形成秃尖, 使穗粒数减少。遗传分析表明该突变体受 1 个显性基因控制。利用群体分离分析法(BSA, bulked segregation analysis)将 *PAA2* 基因定位在 2 号染色体的长臂端 L2-33 和 L2-50 之间, 物理距离为 80 kb 的范围内。该研究结果为 *PAA2* 基因的图位克隆奠定了基础。

关键词: 水稻; 穗; 顶部退化; 遗传分析; 基因定位

Fine Mapping of the Panicle Apical Abortion *PAA2* in Rice(*Oryza sativa*)

LI Zhen¹, MAO Bi-gang², HENG Yue-qin¹, WANG Jiu-lin¹, CHENG Zhi-jun¹, WAN Jian-min¹

(¹Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

²Hunan Hybrid Rice Research Center, Changsha 410125)

Abstract: The identification and cloning of novel gene controlling rice panicle apical abortion (PAA) is meaningful to understand the molecular mechanism of the trait and reduce grain yield losses caused in rice production. We reported the result of fine mapping of a rice mutant, *paa2*, derived from tissue culture of Zhonghua 11. Phenotypic analysis found that the mutant panicle apical was abnormal growth and development, gradually degraded and shed during the later period, formed barren tip and resulted the grain number reduction. Genetic analysis revealed that the *paa2* was caused by single dominance gene mutation. Using the BSA method, the *PAA2* gene was finally mapped within the interval of 80 kb on chromosome 2, flanked between the newly developed markers L2-33 and L2-50. The results provided here would be beneficial for the map-based cloning of *PAA2* gene.

Key words: rice; panicle; apical abortion; genetic analysis; gene mapping

稻穗产量是形成水稻产量的最基本单元, 优良的穗部性状是水稻育种家追求的重要育种目标^[1-2]。穗顶部退化在现实水稻生产中时有发生, 尤其是遇到低温、干旱等不利环境条件时, 稻穗顶部退化更为明显, 导致了不可预知的产量损失。克隆穗顶部退化基因, 明确导致穗顶部退化的分子机制, 从基因型的源头避免穗退化的产生, 对育成品种产量潜力的稳定表现至关重要。

穗退化主要包括基部小穗退化和顶部小穗退化 2 种。由于退化程度易受穗分化期间温度、湿度等

环境条件的影响, 加大了研究者在遗传及分子生物学上的研究难度, 因此目前相关研究较少^[3-5]。在穗基部退化研究方面, J. Yamagishi 等^[6]在第 1、10 和 11 染色体上发现了 3 个关于开花前水稻穗基部小花败育的主效 QTL。S. Li 等^[7]报道了一个调控花序结构内枝梗及穗长度相关基因 *SPI*, 该突变体枝梗原基能正常分化, 但在发育过程中基部枝梗和小花退化死亡。K. Komatsu 等^[8]和 K. Ikeda 等^[9]报道的稀穗基因 *LAX* 和小穗基因 *APOL* 也与水稻穗发育异常相关。在穗顶部退化方面, 目前只有 QTL 初定

收稿日期: 2014-04-01 修回日期: 2014-05-05 网络出版日期: 2014-08-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140807.1021.013.html>

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2010CB125904)

第一作者研究方向为作物遗传育种。E-mail: 18210005337@163.com

通信作者: 程治军, 研究方向为水稻功能基因组。E-mail: chengzhijun@caas.cn

位的研究报道。徐华山等^[10]在日本晴和 9311 代换系群体中检测到了 5 个 QTL, 分别位于第 1、2、4、7 和 9 染色体上, 其中第 9 染色体的 ds-9 位点对水稻穗顶部退化的效应较大。C. J. Tan 等^[11]研究发现位于第 3 染色体和第 9 染色体的穗顶部退化 QTL 存在互作效应。王斌等^[3]利用重组自交系群体, 发现了 6 个控制穗顶部退化的 QTL, 分别位于第 1、2、3、5、6 和 7 染色体上。高素伟等^[12]利用穗顶部退化突变体 *L-05261*, 发现了 5 个控制穗顶部退化的 QTL, 分布在第 3、4、5、8 染色体上。Z. Cheng 等^[13]进一步将一个受光照条件影响的穗顶部退化 QTL *qPAA8* 定位在 68kb 的区间内, 并发现穗顶部退化与过氧化氢的积累有关。在玉米生产上, 育种家也常将穗顶端退化视为不良性状。孟昭东等^[14]发现玉米的穗顶部退化由 2 对显性基因控制, 退化程度受环境条件的影响。向道权等^[15]报道了玉米的第 10 和第 4 染色体上存在 2 个影响穗顶部退化的主效 QTL。到目前为止, 所知的 QTL 定位信息可能由于受环境条件和遗传背景的影响, 其准确性都还不能用于基因克隆研究。根据多年的研究经验以及综合前人的研究发现, 如要克隆这一复杂性状的基因, 只能从单基因突变体入手, 对精细定位的结果需要反复验证。在此基础上, 本研究从一个水稻穗顶部退化突变体 *paa2* 入手, 开展了穗顶部退化关键基因的精细定位研究, 并将突变基因精细定位在物理距离约为 27 kb 的范围内, 为进一步克隆 *PAA2* 基因奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻穗顶部退化材料来自中花 11 的组培突变体, 表现为穗顶部退化。经多代自交观察, 其突变性状遗传稳定。为了精细定位突变的基因, 2011 年春在海南以穗正常的籼稻品种岳晚籼为父本与 *paa2* 杂交, 配制籼×粳杂交组合, F_1 在中国农业科学院作物科学研究所昌平试验基地正季繁殖后, 2012 年春将 F_2 遗传群体种植于海南三亚南繁基地。同年夏, 在北京配制粳稻品种 IRAT129 与 *paa2* 的杂交组合, 经海南南繁后, 2013 年夏季在北京正季播种 F_2 遗传作图群体。在正季的生长条件下, 成熟时随机各选 10 株 *paa2* 突变体和野生型, 考察株高、分蘖数、主穗长、每穗实粒数、初级枝梗数、次级枝梗数、千粒重等相关农艺性状。

1.2 基因连锁分析

在 F_2 群体中分别选取 10 株正常单株和 10 株突

变单株, 构成正常基因池和突变基因池。按 CTAB 法^[16-17]提取亲本、基因池 DNA。参照 <http://www.gramene.org> 网站公布的 SSR 和 Indel 序列信息, 由北京博迈德生物技术公司合成引物。采用 10 μ L 的 PCR 扩增体系, 其中含 10 ng DNA 模板, 4 nmol 引物, 0.5 mmol dNTP, 1 μ L 10 × buffer (不含 Mg^{2+}), 15 mmol $MgCl_2$ 和 0.5 U *Taq* 聚合酶。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 35 个循环: 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s; 72 °C 延伸 5 min。扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 快速银染后观察^[18]。

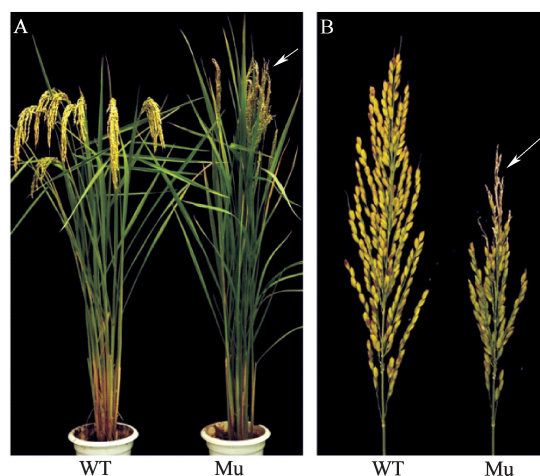
1.3 基因表达分析

使用 TIANGEN 公司的 RNA 试剂盒, 提取水稻幼穗部位 RNA。取 4 μ g 总 RNA 作模板, 再使用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (购于 Takara 公司) 合成 cDNA。将合成的 cDNA 稀释液 (5 ×) 作为 Real-time PCR 反应模板, 以水稻多聚泛素酶基因 (UBQ) 为内参, 正向序列为 5'-GCTC-CGTGGCGGTATCAT-3', 反向序列为 5'-CGGCAGTT-GACAGCCCTAG-3', 在 7900HT Real-Time PCR 仪 (Applied Biosystems) 上进行扩增, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算基因的相对表达量^[19]。

2 结果与分析

2.1 *paa2* 突变体的表型分析

paa2 为中花 11 组织培养过程中产生的突变体, 表现穗顶部退化 (图 1)。突变体在幼穗发育早



A: 野生型 (WT) 和突变体 (Mu) 植株; B: 野生型 (WT) 和突变体 (Mu) 小穗, 小穗箭头指向突变体退化的穗
A: Plants of wild type and *paa2* mutant; B: Spikelets of wild type and *paa2* mutant, the aborted spikes indicated by arrow

图 1 野生型 (WT) 和突变体 (Mu) 的表型

Fig. 1 Phenotype of wild type and *paa2* mutant

期和正常植株并无明显差异,在孕穗后期,稻穗顶部的小穗退化死亡。抽穗后,突变体的退化小穗发白、变干,最后连同退化的枝梗一起掉落,收获时与正常穗相比突变体的稻穗小、穗粒数减少。在北京和海南不同生长季节和种植环境,此表型能稳定遗传。

2.2 农艺性状调查

在成熟期,调查了野生型和突变体的农艺性状,结果如表 1 所示。*paa2* 突变体与野生型在分蘖数和千粒重上没有显著的变化。但比野生型植株矮,主穗短,每穗实粒数少,初级枝梗数少,二级枝梗数也少,且差异显著。

表 1 野生型与突变体农艺性状比较(2013 年,北京)
Table 1 Agronomic traits comparison between wild type and mutant

农艺性状 Agronomic traits	野生型 Wild type	突变体 Mutant
株高(cm) Plant height	120.7 ± 2.11	109.0 ± 1.91 **
分蘖数 Tiller number	8.3 ± 0.98	8.2 ± 1.13
主穗长(cm) Main panicle length	22.6 ± 1.30	14.9 ± 1.37 **
每穗实粒数 Grain number per panicle	133.2 ± 25.21	83.2 ± 18.92 **
初级枝梗数 No. of primary branch	16.75 ± 0.96	13.5 ± 0.80 **
二级枝梗数 No. of secondary branch	37.25 ± 0.58	16.9 ± 6.44 **
千粒重 1000-kernel weight	25 ± 0.98	24.4 ± 0.36

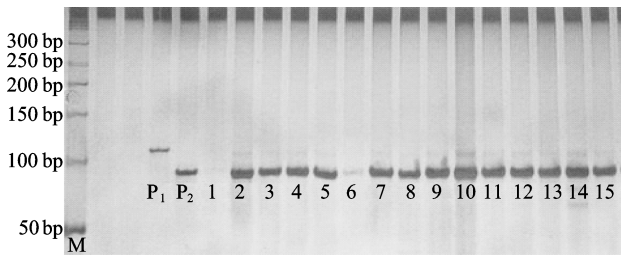
** 表示在 0.01 水平上差异显著
** represents significance at *P* = 0.01 level

2.3 *PAA2* 基因的遗传分析

为研究穗顶部退化突变体的遗传特性,用 *paa2* 作父本分别与野生型的岳晚粳和 IART129 杂交,结果表明,*F*₁均表现为穗顶部退化,是一个显性性状;穗顶部退化表型在 *F*₂分离,统计结果显示:*paa2* 与岳晚粳杂交获得的 *F*₂群体中,退化植株数为 1850 株,正常植株数为 597 株,经卡方检验符合 3:1 的分离比;*paa2* 与 IART129 杂交获得的 *F*₂群体中,退化植株数为 925 株,正常株数 311 株,经卡方检验也符合 3:1 的分离比。结果表明穗顶部退化表型是由 1 对显性基因控制的。

2.4 标记筛选与初定位结果分析

选取具有穗顶部退化表型的 *F*₂极端个体 10 株构建混池。用亲本(岳晚粳和 *paa*)DNA 作对照,选用实验室已有的 565 对均匀分布于 12 条染色体上的 SSR 和 Indel 引物,对 2 个亲本进行多态性分析,筛选出多态性引物 230 对,多态性频率 24.6%。多态性标记 L2-20 的连锁电泳结果如图 2 所示。



M:50bp DNA 标记;P₁:IART129;P₂:*paa*;
1 ~ 15:*F*₂中表型为穗顶端退化的单株
M:50bp DNA marker, P₁:IART129, P₂:*paa*,
1 - 15: *F*₂ individuals showed panicle apical abortion phenotype

图 2 多态性标记 L2-20 的连锁电泳图
Fig. 2 The chain electrophoresis figure of polymorphism markers L2-20

2.5 *PAA2* 基因的定位

由于利用混池并未发现连锁,改为对 10 株 *F*₂ 极端个体分别进行单株验证。结果发现,*PAA2* 基因与水稻第 2 染色体长臂端的标记 L2-20 和 L2-44 连锁(图 2)。根据 <http://www.gramene.org/> 网站上的 SSR 标记图谱,在 L2-20 和 L2-44 标记之间又重新开发了 7 对 SSR 标记(表 2)。结果表明 L2-26、L2-33、L2-59、L2-36、L2-40、L2-50、L2-54 这 7 个标记在亲本间具有多态性,利用这 7 个标记对“*paa2* × 岳晚粳”杂交组合 *F*₂群体中的 926 个极性单株进行分析。结果在 L2-20、L2-26、L2-33、L2-59、L2-36、L2-40、L2-44 这 8 个标记位点的交换单株数分别为 62、9、2、6、17、33、106。*PAA2* 基因初步定位在标记 L2-33 和 L2-59 之间。同时利用 924 个极性单株在标记 L2-33 和 L2-59 之间进一步开发标记定位,结果显示,L2-50 和 L2-54 这 2 个标记在亲本间有多态性,L2-33、L2-50、L2-54、L2-59 标记的交换单株数分别为 6、9、18、34。最后,*PAA2* 基因精细定位在标记 L2-33 和 L2-50 之间,物理距离为 80 kb 的范围内(图 3)。

为了进一步确定精细定位的结果,本研究又利用新的遗传背景更为单纯的“*IART129* × *paa2*”(粳 × 粳)群体,对该突变基因重新进行精细定位。利用该组合的 *F*₂群体,初步将目标基因定位在 2 号染色体的 SSR 标记 L2-20 和 RMR525 之间。根据 <http://www.gramene.org/> 网站上的 SSR 标记图谱,在 L2-20 和 RM525 标记之间开发 SSR 标记中具有多态性的标记有 6 对(表 2)。在初定位基础上,利用多态性标记把 *PAA2* 基因重新定位在标记 L27-3 和 L27-4 之间,遗传距离为 126 kb(图 4)。

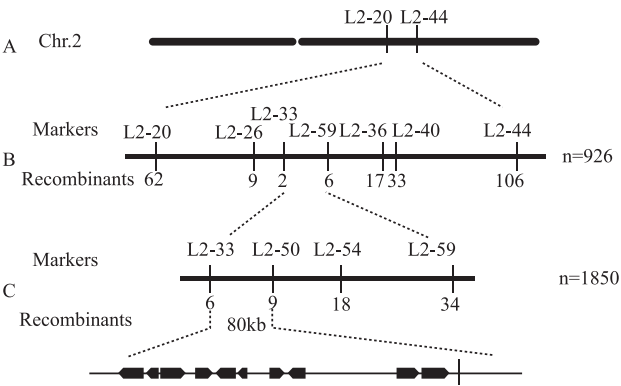


图 3 用“岳晚粳 × *paa2*” F_2 群体精确定位 *PAA2* 基因

Fig. 3 Fine mapping of *PAA2* locus using “Yuewanxian × *paa2*” mapping population

A; Established linking genetic markers with *PAA2* locus using bulked segregant analysis, B; Preliminary mapping of *PAA2* locus using “*paa2* × IART129” population, C; Fine mapping of *PAA2* locus. Numerals above the bar represent the SSR and Indel markers used and the numerals below the bar represent recombinants. n represents the number of panicle apical abortion plants used for the gene mapping

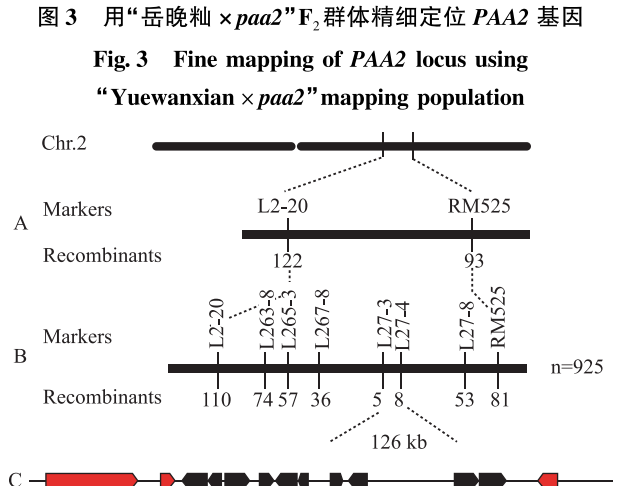


图 4 *PAA2* 基因的初定位和精确定位

Fig. 4 Preliminary and fine mapping of *PAA2* gene

A; Establish linked genetic markers with *PAA2* locus using bulked segregant analysis, B; Preliminary mapping of *PAA2* locus using “*paa2* × IART129” population. Numerals above the bar represent the SSR and Indel markers using in fine mapping, and the numerals below the bar represent recombinants. n represents the number of panicle apical abortion plants used for the gene mapping

比较 2 个定位区间发现, 2 次定位基本相同, 所不同的是, 利用粳 × 粳杂交的组合确定的区间较大,

定位区间多包含了 3 个基因(图 4C 的红色 ORF), 重新定位的结果也验证了 80 kb 定位区间的正确性。根据 Gramene 网站分析 80 kb 的定位区间内的注释基因发现, 该区域共有 10 个开放阅读框, ORF1 至 ORF10 分别编码 1 个假定蛋白、3 个表达蛋白、6 个功能蛋白(表 3)。

表 2 新开发的用于 *PAA2* 基因定位的多态性引物

Table 2 New developed polymorphism markers for mapping *PAA2*

引物 Primer	正向序列 Forward sequence(5' - 3')	反向序列 Reverse sequence(5' - 3')
L2-20	TGTCCATTACTCCCAGCACA	ATAGCGGAAATGTGGAATGC
L2-26	TCCGCATATTCGATAAGTCGT	CCGGTCGAATGTCGTAGACT
L2-33	GCTGCCGCTAGCTTTTCTA	GCCCTGTTCATCCAAAGAGA
L2-50	TAACCGGTTCCAGGTTTTTG	AGGACGGAGGGAGCTCTAAA
L2-54	AGTGACTCGTTAGCGCTTGA	CCTCAGCGTTCGAGATTAGC
L2-59	TCACCCACAAGACAGCAAGA	CCACCCCACTTCTCTTTAG
L2-36	TAATTGGACCAAGCCACCTC	ATGCCCATGAACACATCAAA
L2-20	TGTCCATTACTCCCAGCACA	ATAGCGGAAATGTGGAATGC
L263-8	CCGAGTTCTCTCCACCTCTG	CCTCCCCAATCCCTCTACTC
L265-3	CAGGTCGATCGTTCTTTCC	GCCCTGGTGGTTAGTACGAG
L267-8	AGGTCAGGAGGAGCATTTGA	GTGCGATTGAAATGGGAAAA
L27-3	TCTGATCTCAGAGTCACAT	AAGATAGGGGTGAACACTTG
L27-4	CTCCTTCCTTTGCGCTCTCATCTACC	CCACCCCACTTCTCTTTAG
L27-8	TAATTGGACCAAGCCACCTC	ATGCCCATGAACACATCAAA
RM525	CACCTCATCCCCATCTCATC	AAAAAAGTCCGCGAAATTTCA

表 3 L2-33 和 L2-50 两个标记区间内候选基因预测

Table 3 Candidate genes in delimited region by flanking markers of L2-33 and L2-50

ORF	基因名称 Gene name	注释功能 Putative function
1	<i>Os02g45090</i>	expressed protein
2	<i>Os02g45100</i>	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17, putative, expressed
3	<i>Os02g45110</i>	MT-A70 domain containing protein, expressed
4	<i>Os02g45120</i>	expressed protein
5	<i>Os02g45130</i>	protein kinase, putative, expressed
6	<i>Os02g45140</i>	hypothetical protein
7	<i>Os02g45150</i>	expressed protein
8	<i>Os02g45160</i>	aluminum-activated malate transporter, putative
9	<i>Os02g45170</i>	helix-loop-helix DNA-binding protein, putative
10	<i>Os02g45180</i>	ORM1, putative

为了进一步确定目的基因, 本研究对这 10 个基因都进行了测序, 但突变体与野生型在这 10 个基因的编码序列上没有发现差异。之后对 10 个候选基

因进行了 RT-PCR 分析。结果表明 *Os02g45100*、*Os02g45140*、*Os02g45160* 3 个基因的表达量在突变体中明显升高(图 5)。根据基因表达结果分析,把候选基因锁定在 *Os02g45100*、*Os02g45140*、*Os02g45160* 这 3 个基因上,但对于目的基因的确定还需要下一步的转基因结果验证。

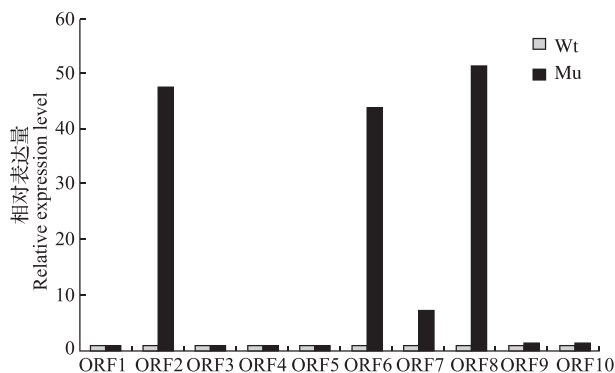


图 5 10 个精细定位区间候选基因的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of ten ORFs within fine mapping region

3 讨论

本研究报道了一个水稻穗顶部退化突变体 *paa2*, 该突变体穗部表现严重退化, 小穗的一级枝梗数、二级枝梗数和每穗粒数较野生型明显减少, 严重影响水稻产量。遗传分析表明该穗顶部退化表型由显性单基因控制。采用了岳晚粳 × *paa2* 和 *paa2* × IART129 的 2 个 F_2 遗传定位群体, 对穗顶部退化 *PAA2* 基因进行定位, 最终将基因定位在水稻 2 号染色体长臂端标记 L2-33 和 L2-50 之间, 遗传距离为 80 kb, 区间内有 10 个开放阅读框, 同时对区间内的基因全部进行测序, 结果表明, 在野生型和突变体之间没有发现核酸序列的改变。

为了进一步确定目的基因, 本研究采用野生型与突变体幼穗的 RNA 进行了 RT-PCR 分析, 结果表明 *Os02g45100*、*Os02g45140*、*Os02g45160* 3 个基因的表达量在突变体中明显升高。因此, 初步把目的基因锁定在这 3 个基因上。目前该区间内没有报道与水稻穗顶部退化表型相关的基因, 估计存在着一个新的尚未被克隆的决定穗顶部退化的基因。

穗顶部退化现象是一个显性性状, 并且受环境条件影响较大, 其中的杂合基因型和纯合显性基因型从表型上难以区分。假如取样的目标基因型是 *paa2/paa2*, 但是, 尽管选取了表型明显的穗顶部退化单株, 连锁分析表明, 约 1/4 所取样本的基因型仍然为 *paa2/PAA2*, 即杂合的基因型, 过多的杂合基因

型严重地干扰了对该性状基因的精细定位, 特别是对候选基因的判断。因此, 在今后的研究中, 不应追求过细的精细定位区间, 而是根据定位区间的单株在下一代的表型鉴定结果, 验证之前的精细定位结果, 利用后代的表型来判断上代的基因型, 在重复验证的基础上确定候选基因。

参考文献

- [1] Doi K, Yasui H, Yoshimura A. Genetic variation in rice[J]. Curr Opin Plant Biol, 2008, 11(2): 144-148
- [2] Sakamoto T, Matsuoka M. Identifying and exploiting grain yield genes in rice[J]. Curr Opin Plant Biol, 2008, 11(2): 209-214
- [3] 王斌, 刘贺梅, 毛毕刚, 等. 水稻顶部小穗退化性状的 QTL 分析[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(5): 561-564
- [4] 卢寰, 时振英. 水稻穗发育的分子生物学研究进展[J]. 植物生理学报, 2013, 49(2): 111-121
- [5] 任三娟, 孙出, 童川, 等. 水稻小穗退化突变体 *spd-hp73* 的遗传分析及基因定位[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2013, 39(3): 267-273
- [6] Yamagishi J, Miyamoto N, Hirotsu S, et al. QTLs for branching, floret formation, and pre-flowering floret abortion of rice panicle in a temperate *japonica* tropical *japonica* cross[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109(8): 1555-1561
- [7] Li S, Qian Q, Fu Z, et al. Short panicle1 encodes a putative PTR family transporter and determines rice panicle size[J]. Plant J, 2009, 58(4): 592-605
- [8] Komatsu K, Maekawa M, Ujiie S, et al. LAX and SPA: major regulators of shoot branching in rice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(20): 11765-11770
- [9] Ikeda K, Ito M, Nagasawa N, et al. Rice *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1*, encoding an F-box protein, regulates meristem fate[J]. Plant J, 2007, 51(6): 1030-1040
- [10] 徐华山, 孙永建, 周红菊, 等. 构建水稻优良恢复系背景的重叠片段代换系及其效应分析[J]. 作物学报, 2007, 33(6): 979-986
- [11] Tan C J, Sun Y J, Xu H S, et al. Identification of quantitative trait locus and epistatic interaction for degenerated spikelets on the top of panicle in rice[J]. Plant Breeding, 2011, 130(2): 177-184
- [12] 高素伟, 张玲, 毛毕刚, 等. 水稻穗顶部退化突变体 *L-05261* 的遗传分析[J]. 作物学报, 2011, 37(11): 1935-1941
- [13] Cheng Z J, Mao B G, Gao S W, et al. Fine Mapping of *qPAA8*, a gene controlling panicle apical development in rice[J]. J Integr Plant Biol, 2011, 53(9): 710-718
- [14] 孟昭东, 张发军, 丁照华, 等. 玉米果穗秃尖性状遗传分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(1): 280-285
- [15] 向道权, 曹海河, 曹永国, 等. 玉米 SSR 遗传图谱的构建及产量性状基因定位[J]. 遗传学报, 2001, 28(8): 778-784
- [16] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8(19): 4321-4325
- [17] 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 genomic regions by using segregating populations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(21): 9828-9832
- [18] 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)* [J]. Mol Genet Genom, 2006, 275(4): 321-329
- [19] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108