

广西农家籼稻种质抗褐飞虱基因 *Bph40(t)* 的定位

李晶莹^{1,2}, 李发活^{1,2}, 沈娟^{1,2}, 黄康顺^{1,2}, 黄福钢^{1,2}, 郭辉³, 陈灿³, 梁树辉³,
刘芳^{1,2}, 邱永福^{1,2}

(¹广西大学农学院/广西农业环境与农产品安全重点实验室/广西高校作物栽培与生理重点实验室, 南宁 530004; ²亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530004; ³广西壮族自治区农业科学院水稻研究所, 南宁 530007)

摘要: 褐飞虱是水稻生产危害中最严重的虫害之一, 发掘水稻中抗褐飞虱的新基因并培育抗性品种是现今控制该虫害最有效的举措。广西农家种质——籼稻47-1连续3年的苗期、成株期对褐飞虱都表现一致高抗, 遗传稳定性良好, 具有明显的趋避性和抗生性, 定位其抗性基因并探究其机理, 对丰富抗褐飞虱基因的多样性和培育抗性水稻品种具有重大意义。本研究通过利用抗褐飞虱材料47-1与感褐飞虱材料9311杂交构建了包含91个单株的F₂群体, 采用虫体增重法进行褐飞虱抗性表型鉴定。结果显示F₂群体抗性单株(虫体增重倍数≤1.1)与感性单株(虫体增重倍数>1.1)的数量比为61:30, 卡方检验($\chi^2=3.081 < \chi^2_{0.01,1}=3.84$)表明该性状的分离比符合1对显性基因的分离规律。基因定位在第4染色体标记04M0.453与04M3.688之间的区域内检测到一个褐飞虱抗性位点, 与克隆的*Bph40*定位区间重叠。序列分析表明, 47-1中*Bph40(t)*基因的CDS与已克隆的*Bph40* CDS仅存在3个单碱基突变, 共导致2个氨基酸差异, 系统进化树分析发现两者的亲缘关系最近, 表明该抗性基因就是*Bph40*的一个等位基因。

关键词: 水稻; 褐飞虱; *Bph40*; 基因定位; 等位基因

Mapping of Brown Planthopper Resistance Gene *Bph40(t)* from Guangxi *Indica* Rice Germplasm

LI Jing-ying^{1,2}, LI Fa-huo^{1,2}, SHEN Juan^{1,2}, HUANG Kang-shun^{1,2}, HUANG Fu-gang^{1,2}, GUO Hui³, CHEN Can³,
LIANG Shu-hui³, LIU Fang^{1,2}, QIU Yong-fu^{1,2}

(¹College of Agriculture, Guangxi University/Guangxi Key Laboratory of Agro-environment and Agric-Products safety/Key Laboratory of Crop Cultivation and Physiology, Education Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530004;

²State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning 530004, Guangxi;

³Rice Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007)

Abstract: Brown planthopper (BPH, *Nilaparvata lugens*) is one of the most disaster insects of rice. The most effective measure to prevent its damage is developing BPH resistance lines and cultivating resistant varieties. The indica rice germplasm 47-1 from Guangxi, China, is highly resistant at seedling and adult stage for three consecutive years, thus proving the genetic stability and the significant antibiosis and antixenosis against BPH. In order to enrich the gene diversity of BPH resistance and breed resistant rice varieties, it is meaningful to map its resistance gene and explore its mechanism. In this study, we developed by crossing 47-1 and a susceptible line 9311 a F₂ population containing 91 individuals, followed by identifying the insect weight gain.

收稿日期: 2023-01-14 修回日期: 2023-03-07 网络出版日期: 2023-03-20

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230114001>

第一作者研究方向为作物遗传育种, E-mail: 281026484@qq.com; 李发活为共同第一作者

通信作者: 邱永福, 研究方向为作物遗传育种, E-mail: yfqi@126.com

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目(ZY21195040); 广西创新驱动发展专项(桂科-AA22068087-3); 广西水稻遗传育种重点实验室开放课题(2022-36-Z01-KF04); 广西研究生教育创新计划项目(YCSW2021023)

Foundation projects: Central Government Guiding Local Scientific and Technological Development Foundation (ZY21195040); Guangxi Innovation-Driven Development Special Funding Project (Guike-AA22068087-3); Guangxi Key Laboratory of Rice Genetics and Breeding Program (2022-36-Z01-KF04); Innovation Project of Guangxi Graduate Education (YCSW2021023)

61 and 30 individuals, each of which showed the BPH weight increased ≤ 1.1 and > 1.1 , respectively, were obtained (Chi-square test: $\chi^2=3.081 < \chi^2_{0.01,1}=3.84$), suggesting that this locus is genetically controlled by one pair of single dominant gene. This locus was delimited to the region flanked by markers 04M0.453 and 04M3.688 on chromosome 4, where the BPH resistance gene *Bph40* is present. Three substitutions in the coding sequence of *Bph40(t)* differing with that of *Bph40* were detected in variety 47-1, which resulted in two amino acid substitutions in the protein. Phylogenetic tree analysis showed that the *Bph40(t)* haplotype from 47-1 was closely related to the *Bph40*. Collectively, these results implied that the BPH resistance gene in 47-1 is a novel allele of *Bph40*.

Key words: rice; brown planthopper (*Nilaparvata lugens*); *Bph40*; gene mapping; allelic gene

虫害对水稻的生长发育和产量的影响极大,而褐飞虱是水稻生产危害最严重的虫害之一。褐飞虱是专一性寄主水稻的一种同翅目飞虱科(*Homoptera: Delphacidae*)昆虫^[1],通过刺吸式口器直接刺穿水稻维管束韧皮部吸取汁液,使植株萎蔫、茎丛腐烂,并传播水稻病害,导致水稻减产甚至绝收^[2]。水稻苗期遭遇褐飞虱危害,会导致植株体内大量的营养物质丧失,叶片变黄,植株生长矮小迟缓,呈现萎蔫死亡性状;孕穗或抽穗期遭遇褐飞虱危害,植株的叶片变黄变枯,植株倒伏,严重时田间呈现飞虱火烧的现象^[3]。

近年来,随着分子标记的发展和水稻高密度连锁图谱的构建,分别在水稻第2、3、4、6、10、11和12号染色体定位了42个水稻抗褐飞虱主效基因,并克隆了10多个水稻抗褐飞虱基因^[4]。利用水稻褐飞虱的抗性基因,通过杂交、回交以及分子标记辅助选择的方式,可以将已经定位与克隆的褐飞虱的抗性基因应用于水稻品种改良,有效抑制了褐飞虱的蔓延与危害。只是单一性褐飞虱抗性基因的应用,难以克服褐飞虱的选择进化,抗性品种推广种植几年后抗性就逐渐丧失,如*Bph1*、*Bph2*或*Bph4*^[5]。因此,发掘水稻中更多的抗褐飞虱基因并通过聚合育种的方式培育更多的抗性品种是现今最有效控制该虫害的举措^[6]。

水稻褐飞虱抗性鉴定方法众多,通用的有苗期集团法、强制取食法、成株期抗虫法等。其中邓钊等^[7]采用褐飞虱的蜜露分泌量、虫体增重量和增重比值作为表型值,定位了4个抗褐飞虱QTL,并且与苗期集团法鉴定结果高度一致。本研究参考邓钊等^[7]的表型鉴定方法,利用褐飞虱抗性亲本籼稻47-1与感性亲本9311为材料,通过褐飞虱虫体增重方法鉴定群体表型、分子标记确定基因型,对褐飞虱抗性基因扫描定位,定位到1个褐飞虱的抗性位点,丰富了抗褐飞虱基因和抗源的多样性,为培育抗褐飞虱品种奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 种质资源 本研究所用的抗褐飞虱水稻材料—籼稻品系47-1由广西农业科学院水稻所提供,是一份从广西省柳州市融水苗族自治县收集的农家品种,其在褐飞虱蔓延的田间依然生长健康、分蘖旺盛、结实正常,对褐飞虱表现出高抗特性。本研究于连续3年(2020、2021和2022年)的6月份在广西大学试验基地对材料进行了抗褐飞虱鉴定。在同一基地于2021年5月份以47-1为抗虫父本,感性材料9311为母本进行杂交获得F₁,2021年10月份F₁自花授粉构建包含91个单株的F₂分离群体,其分离群体抗褐飞虱差异表现明显。2022年5月份将F₂群体种植于广西大学试验基地。

1.1.2 试验用虫 褐飞虱取自中国广西南宁市水稻田,在温度27±2℃、相对湿度75%±5%的玻璃温室中种植的感性材料9311上繁育。

1.2 表型鉴定

1.2.1 苗期和成株期抗虫鉴定 参考Qiu等^[8]的苗期抗虫鉴定法分别对47-1、9311于2020年6月、2021年6月、2022年6月在广西大学实验基地进行褐飞虱抗性鉴定,每次鉴定设置3个重复。具体方法如下:将两个亲本材料发芽种子播种于同一个塑料桶中(直径(d)=15 cm,高度(h)=12 cm),中间隔开分别在左右两个小区各播种40粒发芽种子。植株生长至2叶期(7 d左右)搬出室外进行炼苗;3叶(12 d左右)进行褐飞虱接虫,接虫前对瘦弱病及死苗进行剔除,每个小区留下30株健壮的水稻苗。接虫2~3龄褐飞虱若虫(按照苗虫比1:8),然后罩住纱网袋防止褐飞虱逃出。当感性材料9311死亡率达到90%以上时,根据植株受害情况,按照Qiu等^[8]褐飞虱抗性评分标准,每株分别根据0~9(整数)级(0为植株无叶片危害,9为整株死亡)评分,取平均级别为该株系抗性级别,即抗性值。成株期抗虫鉴定

具体方法如下: 苗龄为 12~14 d 的两个亲本植株分别移栽到不同塑料桶中 ($d=29$ cm, $h=20$ cm), 每桶 4 株苗。同时使用纱网罩将塑料桶罩住, 防止褐飞虱入侵。植株长至孕穗期, 将 600 头褐飞虱投入每个纱网罩中。当感性材料 9311 死亡率达到 90% 以上时, 统计抗性值。采用 SPSS 20.0 分析数据。所有数据均采用单因素方差分析, 并在 1% 的显著性水平上用最小显著性差异 (LSD, least significant difference) 进行比较。

1.2.2 褐飞虱宿主选择试验 苗龄为 12~14d 的两个亲本植株移栽到同一个塑料桶 ($d=29$ cm, $h=20$ cm), 每桶 4 株苗 (抗、感各 2 株, 同一亲本对角线移栽), 同时使用纱网罩将塑料桶罩住, 防止褐飞虱入侵。植株长至 30 d 时, 将 100 头褐飞虱投入每个纱网罩中, 并在接虫后 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d 统计植株上着虫数, 试验设置 5 个重复。数据处理同上。

1.2.3 褐飞虱存活试验 苗龄为 12~14 d 的两个亲本植株移栽到同一个塑料杯中 ($d=10$ cm, $h=16$ cm), 将小一号的塑料杯 ($d=8$ cm, $h=10$ cm) 底部打上圆孔, 将水稻苗穿过圆孔罩住。植株长至 30 d 时, 从圆孔处接入 10 头 2~3 龄的褐飞虱若虫, 并用脱脂棉堵住圆孔防止褐飞虱飞出。连续 8 d 统计水稻苗上存活的褐飞虱数目。每个亲本设置 8 个重复。数据处理同上。

1.2.4 褐飞虱虫体增重试验 亲本与 91 个 F_2 分离群体植株种植方法与宿主选择试验一致。具体操作如下: 将一个用 Parafilm 封口膜制成的长方形蜡袋 (3.5 cm \times 3 cm) 绑在苗龄为 40 d 的水稻茎部, 并用

吸管在长方形蜡袋里面接一头经十万分之一精度的天平称量的 3 龄褐飞虱若虫, 接虫 48 h 后再称量褐飞虱虫重^[9], 虫体增重倍数公式如下: 48 h 虫体增重倍数=褐飞虱取食后重量 / 褐飞虱取食前重量。每个单株接虫重复 3 次以上, 确保取得可重复的、准确的结果。通过 48 h 虫体增重倍数的多重复平均值评价亲本和 F_2 每个单株的抗虫水平。

1.3 抗感池构建及连锁标记筛选

采集新鲜的水稻叶片 200 mg 磨成细粉, 参照 Murray 等^[10]CTAB 提取法提取 DNA。参照集团分离分析法 (BSA, bulked segregation analysis) 筛选与抗性相关的分子标记, 具体方法如下: 采用褐飞虱取食 48 h 后的虫体增重倍数作为表型值, 以虫体增重倍数 ≤ 0.9 , $0.9\sim 1.1$ 和 > 1.1 水平划分为高抗褐飞虱 (HR), 抗褐飞虱 (R) 和高感褐飞虱 (HS), 从 91 个 F_2 家系中挑选 10 个高抗 (HR) 褐飞虱和 10 个高感 (HS) 褐飞虱单株分别提取基因组 DNA 并测量浓度, 然后将等量的单个基因组 DNA 进行混合构建抗感池。基于本实验室 1559 对 SSR 和 InDel 引物进行 PCR 扩增, PCR 反应体系 10 μ L 为: $2\times$ Taq Master Mix 5 μ L、50 pmol/ μ L 的正、反向引物各 0.4 μ L、150 ng/ μ L 的 DNA 1.0 μ L、dd H₂O 3.2 μ L。PCR 反应扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55~58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 反应产物用 SDS-PAGE 电泳检测, 胶液浓度为 8%, 银染, 记录带型结果, 筛选获得亲本间多态性引物。再用多态性引物扩增两个抗、感 DNA 池, 筛选获得多态性标记, 多态性标记引物信息见表 1。

表 1 47-1 基因定位的主要引物信息

Table 1 Main primer information of 47-1 gene mapping

引物名称 Primer name	正向引物 (5'—3') Forward primers (5'—3')	反向引物 (5'—3') Reverse primers (5'—3')	起始物理位置 (bp) Initial location	结束物理位置 (bp) End location
04M0.453	CATTTCTCCTCTGTCTTCCA	AATCTCCATTAAGCTCCTCC	441997	442098
04M3.688	CATTGGACAGTCACATGTTT	TGGTCCAATGACTAAACACA	4643332	4643475
04M6.387	GTAGAGGAGGGTGACGGC	CATCCTCCTCCCACCATC	6156077	6156205
04M04514	TGATTAAACCGTAGATTGGA	TCCAACATATTCCCAAAAAC	8215220	8215085
04M10.677	GTCATGGAGTAGGTCAACA	TCATTGGGTAAGCAAACCTCT	10701910	10702060
<i>Bph40</i> -CDS	ATGCTTTGGGAGAGCTTTTATG	TCACCAGAGAAGAGAGCATCTG	4490101	4484997

物理位置参考日本晴基因组

Physical location based on Nipponbare genome sequence

1.4 遗传连锁群构建与 QTL 位点检测

基于 F_2 单株表型值构建的抗、感池间已获得有多态性的引物, 在其位置附近筛选更多亲本间存在多态性的引物, 使用获得的多态性引物对作图群体

中 91 个 F_2 单株的基因型进行检测。利用软件 Join Map 3.0 构建 F_2 群体的局部遗传连锁图谱并获得分子标记间的遗传距离。基于抗虫鉴定获得的 F_2 群体表型数据以及基因型数据, 使用软件 ICIM 对 F_2

群体中的抗性QTL位点进行检测。

1.5 RNA提取和反转录

温室采集新鲜亲本叶片,剪碎置于锡纸中,短期保存于液氮,长期保存-80℃冰箱。水稻RNA提取采用TRIzol法。TRIzol购买自全式金公司(TransZol Up货号:ET111)。提取的RNA置于冰上,用1.5%的琼脂糖凝胶对RNA进行质量鉴定。观测到明亮28s带后使用超微量分光光度计进行RNA浓度及质量鉴定,RNA鉴定合格后使用诺唯赞试剂盒HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)(货号:R323)反转录为cDNA。

1.6 序列比对与系统进化树构建

参考已知*Bph40*的CDS序列设计扩增引物(表1)克隆47-1中*LOC_Os04g08390*基因的CDS区域进行测序,以Fasta格式保存各基因的序列。使用软件TBtools将其CDS转化成氨基酸序列并保存。基因和氨基酸序列均利用软件DNAMAN进行序列比对。以47-1中*LOC_Os04g08390*基因的氨基酸序列为基础在NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行BLASTP搜索,并将8个同源度达到90%以

上,3个同源度在30%~60%的氨基酸序列通过软件Mega6邻接法进行序列分析,构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 籼稻47-1抗性鉴定

通过连续3年对籼稻47-1进行褐飞虱抗性的鉴定,发现其遗传稳定性较好。3年苗期接虫结果表明籼稻47-1对广西南宁田间的褐飞虱自然群体具有高抗性,植株表现健壮并呈正常绿色,2020年抗性值为2.17~2.76,均值为2.49;2021年抗性值为2.37~3.17,均值为2.80;2022年抗性值为2.43~3.03,均值为2.80(表2)。9311苗期出现整株叶片枯萎,呈现死亡症状,2020年抗性值为8.00~8.33,均值为8.16;2021年抗性值为7.90~8.30,均值为8.12;2022年抗性值为8.03~8.43,均值为8.18(表2)。成株期抗虫结果与苗期抗性一致(表2、图1)。3年抗虫结果表明两亲本在苗期和成株期的褐飞虱抗性上存在显著的差异(表2),且47-1褐飞虱抗性十分稳定,是一份高抗褐飞虱的水稻种质资源。

表2 3年47-1和9311苗期及成株期褐飞虱取食后抗性值

Table 2 BPH resistance score of 47-1 and 9311 by BPH infestation in three years

年份	时期	编号	平均值±标准差	极大值	极小值	标准误
Year	Period	Number	Mean±SD	Max.	Min.	SE
2020	苗期	47-1	2.49±0.30**	2.76	2.17	0.17
		9311	8.16±0.17	8.33	8.00	0.10
	成株期	47-1	2.25±0.25**	2.50	2.00	0.14
		9311	8.50±0.25	8.75	8.25	0.14
2021	苗期	47-1	2.80±0.40**	3.17	2.37	0.23
		9311	8.12±0.20	8.30	7.90	0.12
	成株期	47-1	2.33±0.38**	2.75	2.00	0.22
		9311	8.50±0.43	8.75	8.00	0.25
2022	苗期	47-1	2.80±0.32**	3.03	2.43	0.19
		9311	8.18±0.22	8.43	8.03	0.13
	成株期	47-1	1.92±0.29**	2.25	1.75	0.17
		9311	8.33±0.14	8.50	8.25	0.08

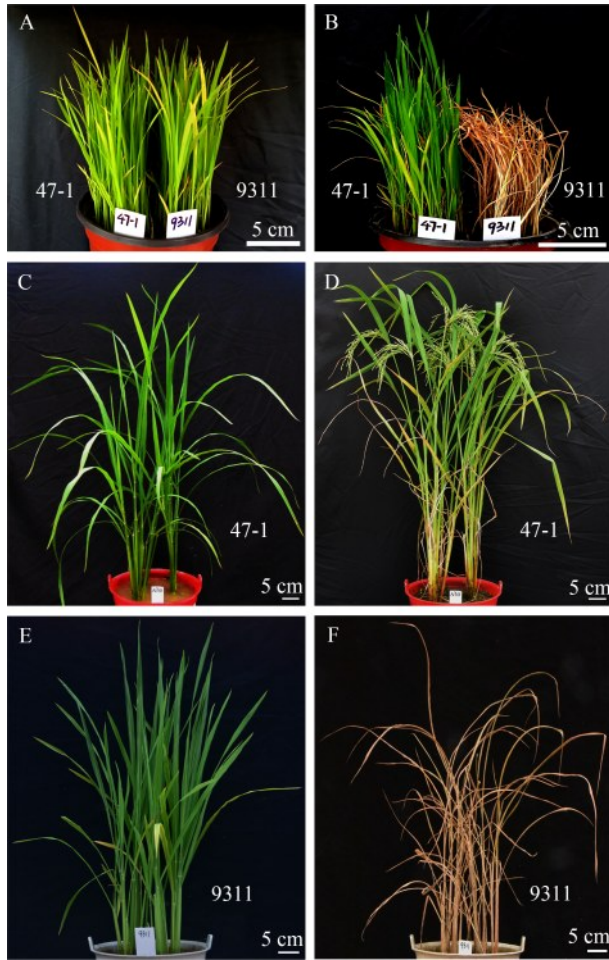
**表示差异极显著($P<0.01$);下同

** indicates extremely significant difference ($P<0.01$);The same as below

2.2 籼稻47-1对褐飞虱的生理抗性特征

为了进一步探讨抗性材料47-1对褐飞虱的趋避性和抗性特征,本研究通过对褐飞虱虫体的宿主选择和存活试验来进行衡量。宿主选择试验结果表明,接虫后8d内,抗性材料47-1植株上的褐飞虱数量均低于感性材料9311,在第3天后一直达到显著水平,并且相对着虫率呈下降趋势,感性材料9311反之;第8天时47-1植株上褐飞虱平均相对着虫率仅为16%,9311植株上为84%,表明抗性材料

47-1对褐飞虱具有显著的趋避性(图2A)。褐飞虱存活试验表明,接虫8d内,抗性植株茎秆上的褐飞虱存活数量均低于感性植株9311,并且在第5天后一直达到显著水平,抗感材料褐飞虱存活数目均下降,但抗性材料47-1下降速度更快;第8天47-1平均存活数量仅为2头,9311存活达到8头(图2B),表明抗性材料47-1对褐飞虱具有显著的抗性。以上结果均证明47-1通过对褐飞虱强的趋避性,以及影响褐飞虱正常生长来达到对褐飞虱的高抗作用。



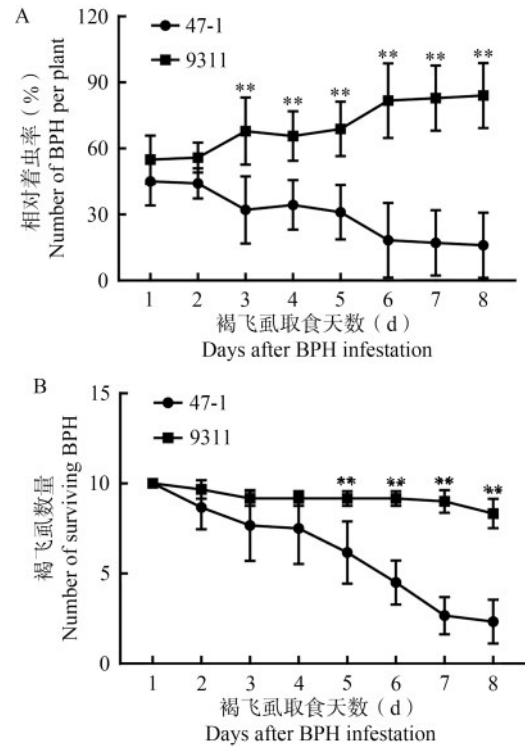
A: 苗期接虫前; B: 苗期接虫后; C: 47-1 成株期接虫前; D: 47-1 成株期接虫后; E: 9311 成株期接虫前; F: 9311 成株期接虫后
 A: Before BPH infestation in seedling stage; B: After BPH infestation in seedling stage; C: Before BPH infestation in 47-1 adult stage; D: After BPH infestation in 47-1 adult stage; E: Before BPH infestation in 9311 adult stage; F: After BPH infestation in 9311 adult stage

图1 抗感材料苗期和成株期抗虫表型

Fig.1 BPH resistant phenotype of resistant and susceptible materials at seedling and adult stage

2.3 籼稻 47-1 抗性位点检测

本研究采用褐飞虱取食 48 h 后的虫体增重倍数作为表型值,对亲本和 91 个 F₂ 单株进行褐飞虱增重试验,结果表明,亲本 47-1 和 9311 对褐飞虱群体分别表现出高抗和高感表型,平均虫体增重倍数为 0.83 和 1.32。F₂ 群体单株中抗虫性变异较广,虫体增重倍数最小值为 0.67,最大值为 1.75,平均值为 1.07。褐飞虱虫体增重鉴定结果表明,定位群体中 91 个 F₂ 单株的抗感分离呈连续性分布(图 3),F₂ 群体抗感单株数比为 61:30,经过卡方检验($\chi^2=3.081 < \chi^2_{0.01,1}=3.84$)表明该性状的分离比符合 1 对基因的分离规律(表 3)。该结果说明群体中存在 1 个抗褐飞虱的主效显性基因。



A: 宿主选择试验; B: 虫体存活试验
 A: BPH host choice test; B: Number of BPH survival

图2 籼稻 47-1 对褐飞虱的生理抗性特征

Fig.2 Physiological resistance characterization of indica rice 47-1 resistance to BPH

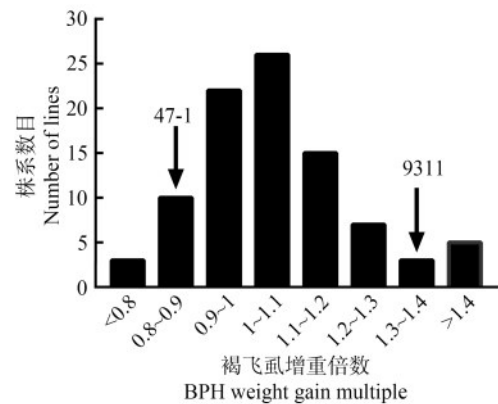


图3 47-1/9311 F₂ 群体的虫体增重倍数分布

Fig.3 Distribution of BPH weight increased multiple of 47-1/9311 F₂ population

表3 47-1/9311 F₂ 群体对褐飞虱的抗性分离

Table 3 Segregation of BPH resistance in 47-1/9311 F₂ population

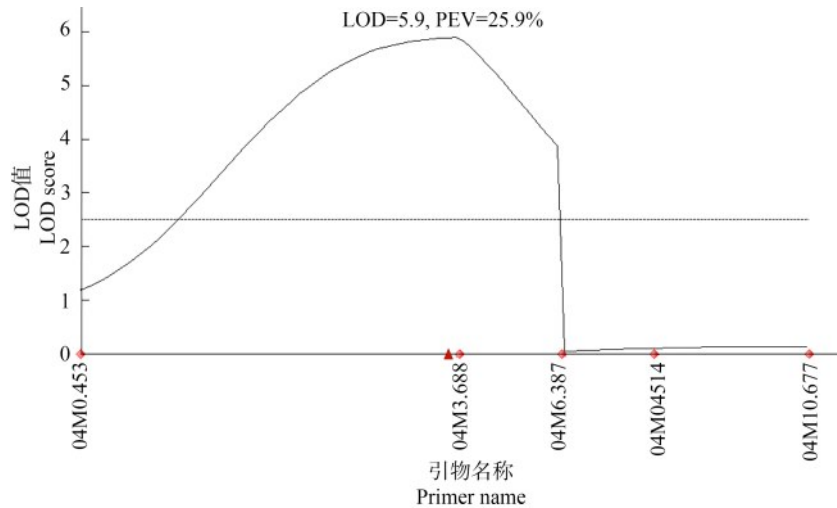
F ₂ 表型 F ₂ phenotype	F ₂ 个体数 Number of F ₂ individuals	F ₂ 家系虫体增重倍数 BPH weight increased multiple of F ₂ line
高抗 HR	13	≤0.9
抗 R	48	0.9~1.1
高感 HS	30	>1.1

HR: High resistance; R: resistance; HS: High susceptibility

2.4 籼稻 47-1 抗褐飞虱 QTL 检测

使用亲本 47-1 和 9311 筛选水稻 12 条染色体上分布的 1599 对分子标记,结果两亲本间共获得 236 个具有多态性的标记。基于褐飞虱虫体增重法从 F_2 群体中选取 10 个高抗单株和 10 个高感单株构建抗感 DNA 池,标记筛选发现在第 4 号染色体上发现 3 个多态性标记。在 3 个标记附近增加 2 个多态性标记,获取 91 个 F_2 单株在这 5 个多态性标记上的基

因型,构建局部染色体连锁图谱。结合 F_2 群体的表型和基因型数据,利用软件 ICIM 分析抗性位点所在染色体区段的具体位置。结果表明,在第 4 号染色体的分子标记 04M0.453 与 04M3.688 间检测到 1 个明显的 QTL 位点,最大 LOD 值为 5.9,在群体中对抗褐飞虱表型贡献率达到 25.9% (图 4),显然存在 1 个褐飞虱抗性位点。



虚线 LOD 值=2.5。PEV 表示基因位点解释了 F_2 群体中抗褐飞虱表型变异的 25.9%,红色三角形表示抗性位点

The dotted line indicates LOD score =2.5. PEV indicated that the gene locus explained 25.9% of the phenotypic variation of BPH resistance in F_2 population. The red triangle represents the resistance gene locus

图 4 构建的局部遗传连锁图及抗性 QTL 位置

Fig.4 Construction of local genetic linkage map and location of resistance QTL

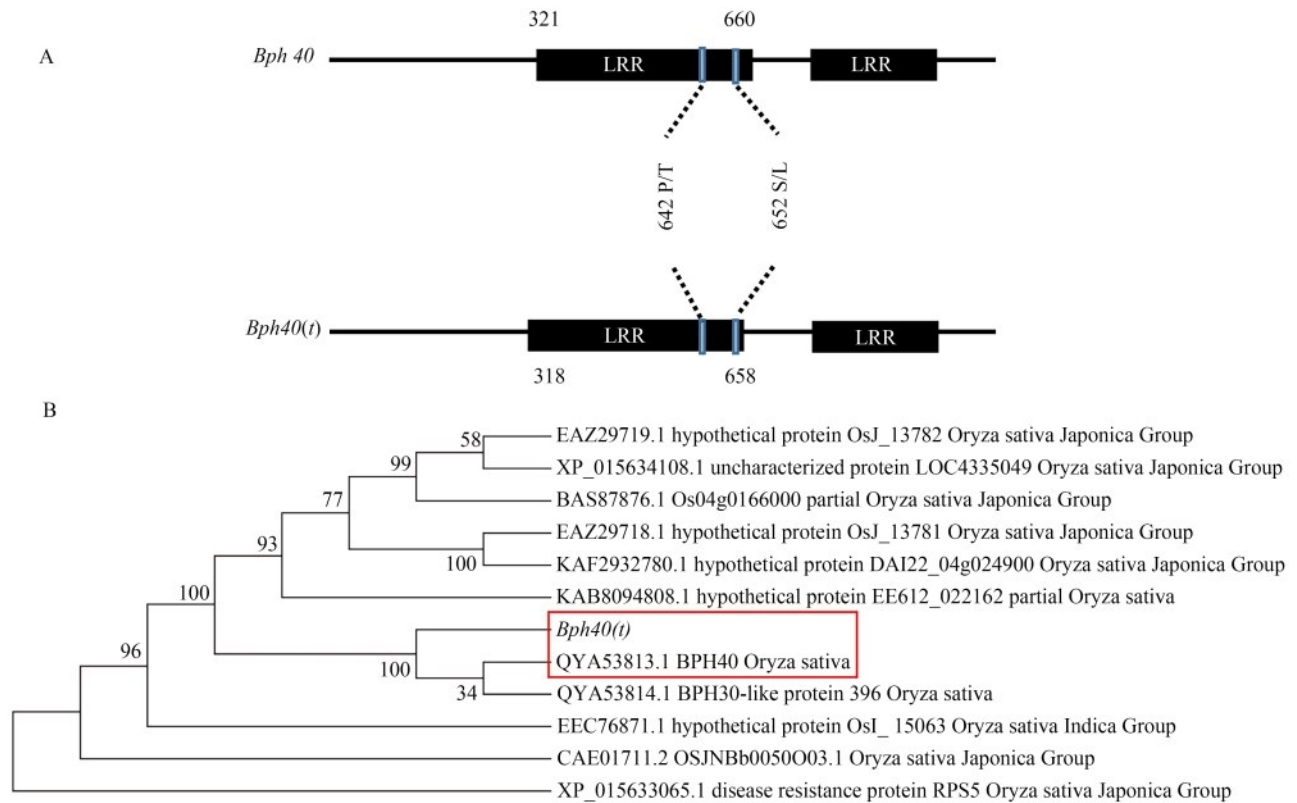
2.5 *Bph40(t)* 为 *Bph40* 的 1 个新等位基因

根据已知的日本晴和 9311 基因组的信息,其分子标记 04M0.453 与 04M3.688 间有 1 个已经克隆的抗褐飞虱基因 *Bph40*^[11]。于是对 47-1 中 *Bph40* 等位基因的 CDS 进行测序。通过两者 CDS 和氨基酸序列比对表明,47-1 中 *LOC_Os04g08390* 基因的 CDS 序列与已克隆的 *Bph40* CDS 序列存在 3 处碱基的差异,均为单碱基突变,暂命名为 *Bph40(t)*。氨基酸比对存在 2 处氨基酸差异且同在第一个 LRR 结构域上,*Bph40(t)* 相较于 *Bph40* 在第 642 位氨基酸处由原来的苏氨酸(T)变为了脯氨酸(P),而第 652 位氨基酸处由原来的亮氨酸(L)变为了丝氨酸(S)。47-1 的氨基酸序列相较 *Bph40* 改变 2 个氨基酸后,其第一个 LRR 结构域由第 321 位到 660 位氨基酸的位置提前到第 318 位到 658 位氨基酸(图 5A)。基于 47-1 中 *LOC_Os04g08390* 基因推测的氨基酸序列在 NCBI 上进行氨基酸序列比对,将 8 个同源度达到 90% 以上,3 个同源度在 30%~60% 的氨基酸序列通过邻接法进行序列分析。分析结果表明,47-1 中

LOC_Os04g08390 与 *Bph40* 和 *Bph30* 同源度较高(图 5B)。根据定位区间以及氨基酸序列比较分析,推测 *Bph40(t)* 可能为 *Bph40* 的 1 个新等位基因。

3 讨论

随着农药防治的大规模推广,褐飞虱“生物型”也出现更多的变异,通过大量人力物力培育的抗性品种逐渐失去抗性,例如携带 *Bph1* 的 IR26、携带 *Bph2* 的 IR36 和 IR42^[12]。等位基因多样性对物种多样性和抗性品种的培育具有重要意义,而基因同源序列多态性在水稻褐飞虱抗虫中普遍存在。Zhao 等^[13] 研究表明,*Bph9* 与另外 7 个等位基因 *Bph1*、*Bph2*、*Bph7*、*Bph10*、*Bph18*、*Bph21* 和 *Bph26* 可以分为 4 种等位基因类型。*Bph6* 是一个单倍型十分丰富的基因,Guo 等^[14] 定位了来源于不同水稻材料的 *Bph6* 等位基因,根据不同的 SNP 划分为 80 种单倍型。因此,快速发掘抗褐飞虱基因(新的主效基因和等位基因)并通过多基因聚合育种选育新品种已经成为防治褐飞虱危害的重要工作。



A: *Bph40(t)* 和 *Bph40* 氨基酸序列比较; 数字代表氨基酸位置; LRR 为亮氨酸富集的重复序列缩写; P 为脯氨酸, T 为苏氨酸, S 为丝氨酸, L 为亮氨酸; B: 基于 *Bph40(t)* 氨基酸序列及其同源序列构建的系统发育树; 方框内为 *Bph40(t)* 及已克隆 *Bph40* 的氨基酸序列

A: Amino acid sequence comparison of *Bph40(t)* and *Bph40*; Numbers represent amino acid positions; LRR is the abbreviation of leucine rich repeat; P is proline; T is threonine; S is serine; L is leucine; B: Phylogenetic tree developed with amino acid sequence of *Bph40(t)* and its homologous sequences; Box means amino acid sequence of *Bph40(t)* and cloned *Bph40*

图5 *Bph40(t)* 和 *Bph40* 氨基酸序列分析

Fig.5 Amino acid sequence analyse of *Bph40(t)* and *Bph40*

目前水稻褐飞虱抗性鉴定常用的方法为苗期集团法,存在制备 F_3 群体的时间长,耗费种子量大、需要褐飞虱虫量大等缺点。邓钊等^[7]和刘光杰等^[15]均通过褐飞虱增重和蜜露量对 F_2 分离群体的水稻单株评价褐飞虱抗性,从而进行 QTL 定位,且结果与传统苗期集团法鉴定结果高度一致。本研究基于具有显著趋避性和抗生性(图2)的抗性亲本 47-1 与感性亲本 9311 构建的 F_2 分离群体,采用虫体增重法对单株水稻进行褐飞虱抗性鉴定。通过借鉴邓钊等^[7]的鉴定方法,本研究采用褐飞虱取食 48 h 后的虫体增重倍数作为表型值,此举措是为了消除试验中所接种的褐飞虱重量难以一致的误差。结合 F_2 群体的表型和基因型数据,在第 4 号染色体的分子标记 04M0.453 与 04M3.688 间检测到 1 个显著的 QTL 位点,最大 LOD 值为 5.9,在群体中对抗褐飞虱表型贡献率达到 25.9%(图4)。根据报道,该区间包含 1 个已经克隆的抗褐飞虱基因 *Bph40*^[11]。根据已经克隆的 *Bph40* 序列设计(表1)引物对抗性材料 47-

1 进行扩增。通过核苷酸和氨基酸序列比对,47-1 中的 *Bph40(t)* 的 CDS 序列与已克隆的 *Bph40* CDS 序列存在 3 处单碱基突变,引起的氨基酸改变只有 2 处,且均在第一个 LRR 结构域上。与此同时 *Bph40(t)* 相较 *Bph40*,其第一个 LRR 结构域由第 321 位到 660 位氨基酸的位置提前到第 318 位到 658 位氨基酸(图5)。据此推测,*Bph40(t)* 为 *Bph40* 的 1 个新的等位基因。

Bph40 与 *Bph30* 均定位在第 4 号染色体上,是同一类编码具有 2 个 LRR 结构域的抗性基因。目前水稻第 4 号染色体上定位克隆的抗褐飞虱基因最多。例如在第 4 号染色体上的 2 个区段内定位了 7 个具有褐飞虱抗性的主效基因:其中一个区段在分子标记 C946 和 RM5953 之间,物理距离约 4.9 Mb,覆盖了 *Bph12(t)*、*Bph15*、*Bph17* 和 *Bph20(t)* 4 个基因;另一个区段在分子标记 G271 和 RM273 之间,物理距离约 4.1 Mb,覆盖了 *Bph12*、*Bph18(t)* 和 *Bph6*^[4]。随着研究的深入,越来越多结果证明,水稻中的抗病

基因也存在成簇分布在染色体区段上的现象^[16]。有多种假说来解释这种现象:一种认为这些成簇分布的基因是紧密连锁在一起的不同位点;一种认为它们是同一位点的不同等位基因;还有一种认为它们是能对不同褐飞虱生物型表现出不同反应的同一等位基因^[17-19]。

本研究通过褐飞虱虫体增重试验,利用籼稻47-1和9311构建的F₂分离群体,采用褐飞虱取食48 h后的虫体增重倍数作为表型值发掘了1个抗褐飞虱的主效基因,通过氨基酸序列分析表明该基因是*Bph40*的1个新的等位基因。本研究通过褐飞虱虫体增重法鉴定水稻F₂遗传群体的表型值,具有时间短、见效快、操作简单等特点,为快速发掘抗褐飞虱基因提供一定参考基础,同时定位的新主效基因*Bph40(t)*,为多基因聚合育种选育新品种提供了抗源多样性,一定程度促进了防治褐飞虱危害工作的进步。

参考文献

- [1] 梁云涛,王春连,刘丕庆,傅强,Kshirod K J,赵开军. 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, 129
Liang Y T, Wang C L, Liu P Q, Fu Q, Kshirod K J, Zhao K J. Research and application status of rice genes resistance to brown planthopper. Journal of Plant Genetic Resources, 2008, 9(1): 119-124, 129
- [2] 黄得润,陈洁,赖凤香,刘光杰,庄杰云. 东乡野生稻抗褐飞虱QTL分析. 作物学报, 2012, 38(2): 210-214
Huang D R, Chen J, Lai F X, Liu G J, Zhuang J Y. QTL analysis of resistance to brown planthopper in Dongxiang wild rice. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38(2): 210-214
- [3] Backus E A, Serrano M S, Ranger C M. Mechanisms of hopperburn: An overview of insect taxonomy, behavior, and physiology. Annual Review of Entomology, 2005, 50: 125-151
- [4] Li Z H, Xue Y X, Zhou H L, Li Y, Usman B, Jiao X Z, Wang X Y, Liu F, Qin B X, Li R B, Qiu Y F. High resolution mapping and breeding application of a novel brown planthopper resistance gene derived from wild rice (*Oryza rufipogon* Griff). Rice, 2019, 12(1): 41
- [5] Jairin J, Phengrat K, Teangdeerith S, Vanavichit A, Toojinda T. Mapping of a broad-spectrum brown planthopper resistance gene, Bph3, on rice chromosome 6. Molecular Breeding, 2007, 19(1): 35-44
- [6] 邓一文,刘裕强,王静,陈学伟,何祖华. 农作物抗病虫研究的战略思考. 中国科学:生命科学, 2021, 51(10): 1435-1446
Deng Y W, Liu Y Q, Wang J, Chen X W, He Z H. Strategic thinking and research on crop disease and pest resistance in China. Scientia Sinica (Vita), 2021, 51(10): 1435-1446
- [7] 邓钊,石少阶,王卉颖,上官欣欣,刘丙芳,荆胜利,杜波,陈荣智,祝莉莉,何光存. 籼稻资源WD15515中抗褐飞虱QTL的定位研究. 作物学报, 2016, 42(3): 353-360
Deng Z, Shi S J, Wang H Y, Shang-Guan X X, Liu B F, Jing S L, Du B, Chen R Z, Zhu L L, He G C. Analysis of QTLs for brown planthopper in indica rice WD15515. Acta Agronomica Sinica, 2016, 42(3): 353-360
- [8] Qiu Y F, Guo J P, Jing S L, Zhu L L, He G C. High-resolution mapping of the brown planthopper resistance gene BPH6 in rice and characterizing its resistance in the 9311 and Nipponbare near isogenic backgrounds. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121: 1601-1611
- [9] Lin J B, Wang X Y, Li Y, Bi F G, Cheng L, Huang F K, Li R B, Qiu Y F. Fine mapping, candidate genes analysis, and characterization of a brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene in the rice variety ARC5984. Euphytica, 2020, 216: 13
- [10] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 1980, 8 (19): 4321-4325
- [11] Shi S J, Wang H Y, Nie L Y, Tan D, Zhou C, Zhang Q, Li Y, Du B, Guo J P, Huang J, Wu D, Zheng X H, Guan W, Shan J S, Zhu L L, Chen R Z, Xue L J, Walling L L, He G C. Bph30 confers resistance to brown planthopper by fortifying sclerenchyma in rice leaf sheaths. Molecular Plant, 2021, 14: 1714-1732
- [12] 陶蓉,潘根,江玲,程遐年,刘裕强,万建民. 籼稻品种'BP360e'抗褐飞虱遗传分析及基因定位. 南京农业大学学报, 2019, 42(1): 14-20
Tao R, Pan G, Jiang L, Cheng D N, Liu Y Q, Wan J M. Genetic analysis and gene mapping of brown planthopper resistance in Indica rice variety 'BP360e'. Journal of Nanjing Agricultural University, 2019, 42(1): 14-20
- [13] Zhao Y, Huang J, Wang Z Z, Jing S L, Wang Y, Ouyang Y D, Cai B D, Xin X F, Liu X, Zhang C X, Pan Y F, Ma R, Li Q F, Jiang W H, Zeng Y, Shangguan X X, Wang H Y, Du B, Zhu L L, Xu X, Feng S Q, He S Y, Chen R Z, Zhang Q F and He G C. Allelic diversity in an NLR gene BPH9 enables rice to combat planthopper variation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113 (45): 12850-12855
- [14] Guo J P, Xu C X, Wu D, Zhao Y, Qiu Y F, Wang X X, Ouyang Y D, Cai B D, Liu X, Jing S L, Shangguan X X, Wan H Y, Ma Y H, Hu L, Wu Y, Shi S J, Wang W L, Zhu L L, Xu X, Chen R Z, Feng Y Q, Du B, He G C. Bph6 encodes an exocyst-localized protein and confers broad resistance to planthoppers in rice. Nature Genetics, 2018, 50(2): 297-306
- [15] 刘光杰,郑宜才,桂丽琴,沈君辉. 水稻品种抗褐飞虱鉴定方法的比较研究. 浙江农业学报, 1999(11): 306-310
Liu G J, Zheng Y C, Gui L Q, Shen J H. A comparative study of the rice planthopper resistance identification method. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 1999(11): 306-310

- [16] Ramalingam J, Vera Cruz C M, Kukreja K, Chittoor J M, Wu J L, Lee S W, Baraoidan M, George M L, Cohen M B, Hulbert S H. Candidate defense genes from rice, barley, land maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16 (1) : 14-24
- [17] Chen J W, Wang L, Pang X F, Pan Q H. Genetic analysis and fine mapping of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene *bph19(t)*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2006, 275: 321-329
- [18] Monna L, Lin H X, Kojima S, Sasaki T, Yano M. Genetic dissection of a genomic region for quantitative trait locus Hd3, into two loci, Hd3a and Hd3b, controlling heading date in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104: 772-778
- [19] Wang G L, Mackill D J, Bonman J M, McCouch S R, Champoux M C, Nelson R J. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics*, 1994, 136: 1421-1434