

广西农家籼稻种质抗褐飞虱基因 *Bph40* (t) 的定位李晶莹^{1,2,3}, 李发活^{1,2,3*}, 沈娟^{1,2,3}, 黄康顺^{1,2,3}, 黄福钢^{1,2,3}, 郭辉⁴, 陈灿⁴, 梁树辉⁴, 刘芳^{1,3}, 邱永福^{1,2,3}

(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, 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广西高校作物栽培学与耕作学重点实验室, 南宁 530004; ⁴广西农科院水稻研究所, 南宁 530004)

摘要: 虫害每年都造成水稻巨大的产量和经济损失, 褐飞虱是其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 高抗褐飞虱, 连续 3 年的苗期、成株期抗虫都表现一致高抗, 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抗性机理, 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 F_2 作图群体, 采用虫体增重法进行褐飞虱抗性表型鉴定。结果显示 F_2 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。基因定位发现在第 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, 与已经克隆的 *Bph40* 定位区间重叠, 可能是 *Bph40* 的等位基因。序列分析表明, 47-1 中 *LOC_Os04g08390* 基因的 CDS 序列与已克隆的 *Bph40* CDS 序列仅存在 3 个碱基的差异, 均为单碱基突变, 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 (*Nilaparvata lugens*); *Bph40*; 基因定位; 等位基因

Mapping of Brown Planthopper Resistance Gene *Bph40* (t) from Guangxi *Indica* rice germplasmLI Jing-ying^{1,2,3}, LI Fa-huo^{1,2,3*}, SHEN Juan^{1,2,3}, HUANG Kang-shun^{1,2,3}, HUANG Fu-gang^{1,2,3}, GUO Hui⁴, CHEN Can⁴, LIANG Shu-hui⁴, LIU Fang^{1,3}, QIU Yong-fu^{1,2,3}

(¹College of Agriculture, Guangxi University / Cultivation Base of Guangxi Key Laboratory for Agro-Environment and Agro-Product Safety, Nanning 530004; ²State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangxi Nanning 530004; ³Key Laboratory of Crop Cultivation and Tillage, Guangxi Colleges and Universities, Nanning 530004; ⁴Rice Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530004)

Abstract: Insect pests annually cause large rice yield and economic loss. 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 resistance mechanism. In this study, we developed by crossing 47-1 and a susceptible line 9311 a F_2 population containing 91 individuals, followed by identifying the insect weight gain. 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 *LOC_Os04g08390* 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 *Os04g08390* haplotype from

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: yfqu@126.com

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目(桂科 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).

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*.

Keywords: 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,可以有效将已经定位与克隆的褐飞虱的抗性基因应用于改良水稻品种,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^[7]等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,定位到一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,是一份从广西融水收集的农家品种,其在褐飞虱蔓延的田间植株依然生长健康、分蘖旺盛、采收正常,对褐飞虱表现出高抗特性。本研究采用连续 3 年(2020、2021 和 2022 年)的 6 月份对材料进行了抗褐飞虱稳定性鉴定,其一致性良好,对褐飞虱抗性的遗传稳定性好。同时以 47-1 为抗虫父本,感性材料 9311 为母本进行杂交获得 F_1 , F_1 自花授粉构建包含 91 个单株的 F_2 分离群体,其分离群体抗褐飞虱差异表现明显。2022 年 5 月将 F_2 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 $27 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $75 \pm 5\%$ 玻璃温室种植的感性材料 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]描述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 ($d = 15\text{ cm}$, $h = 12\text{ cm}$), 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 (7d 左右) 搬出室外进行炼苗; 3 叶 (12d 左右) 即进行褐飞虱接虫, 接虫前对瘦弱、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]评价水稻对褐飞虱抗性评分标准, 每株分别评分 0~9 (整数) 级 (0 为植株无叶片危害, 9 为整株死亡), 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 12-14d 的两个亲本植株分别移栽到不同塑料桶中 ($d = 29\text{ cm}$, $h = 20\text{ cm}$), 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。

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 ($d = 29\text{ cm}$, $h = 20\text{ cm}$), 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, 将 100 头褐飞虱投入每个纱网罩中, 并在接虫后 1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d、8d 统计植株上着虫数, 试验设置 5 个重复。

1.2.3 褐飞虱存活试验 苗龄为 12-14d 的两个亲本植株移栽到同一个塑料杯中 ($d = 10\text{ cm}$, $h = 16\text{ cm}$), 将小一号的塑料杯 ($d = 8\text{ cm}$, $h = 10\text{ cm}$) 底部打上圆孔, 将水稻苗穿过圆孔罩住。植株长至 30d 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 8d 统计水稻苗上存活的褐飞虱数目。每个亲本设置 8 个重复。

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 ($3.5\text{ cm} \times 3\text{ cm}$) 绑在苗龄为 40d 的水稻茎部, 并用吸管在长方形蜡袋里面接一头已称重的 3 龄褐飞虱若虫, 接虫 48h 后在十万分之一精度的天平称量褐飞虱虫重^[9], 虫体增重倍数公式如下: $48\text{h 虫体增重倍数} = \text{褐飞虱取食后重量} / \text{褐飞虱取食前重量}$ 。每个单株接虫重复 3 次以上, 确保取得可重复准确的结果。通过 48h 虫体增重倍数的多重复平均值评价 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 CTAB 提取法提取 DNA^[10]。参照集团分离分析法 (Bulked Segregation Analysis, BSA) 筛选与抗性相关的分子标记, 具体方法如下: 从 91 个 F_2 家系中挑选 10 个极端抗虫和 10 个极端感虫单株分别提取基因组 DNA, 分别测量各样品 DNA 的浓度, 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 μL 为: $2\times\text{Taq Master Mix } 5\text{ }\mu\text{L}$ 、正、反向引物各 0.4 μL 、DNA 1.0 μL 、dd H_2O 3.6 μL 。PCR 反应扩增程序为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, $55^\circ\text{C}\sim 58^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 72°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。

1.4 遗传连锁群构建与 QTL 位点检测 基于 F₂ 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 F₂ 单株的基因型进行检测。利用软件 Join Map 3.0 构建 F₂ 群体的局部遗传连锁图谱并获得分子标记间的遗传距离。接着基于抗虫鉴定获得的 F₂ 群体表型数据以及基因型数据，使用软件 ICIM 对 F₂ 群体中的抗性 QTL 位点进行检测。

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

标记 Maker	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 Initial location	结束物理位置 End location
L1:04M0.453	CATTTCCTCTGTCTTCCA	AATCTCCATTAAGCTCCTCC	441997	442098
L2:04M6.387	GTAGAGGAGGGTGACGGC	CATCCTCCTCCCACCATC	6156077	6156205
L3:04M04514	TGATTTAACCGTAGATTGGA	TCCAACATATTCCTCAAAAC	8215220	8215085
L4:04M3.688	CATTGGACAGTCACATGTTT	TGGTCCAATGACTAAACACA	4643332	4643475
L6:04M10.677	GTCATGGAGTAGGTCGAACA	TCATTGGGTAAGCAAACCTCT	10701910	10702060
BPH40-CDS	ATGCTTTGGGAGAGCTTTTATG	TCACCAGAGAAGAGAGCATCTG	4490101	4484997

注：物理位置参考“日本晴”基因组。
Note: Physical location based on ‘Nipponbare’ genome sequenc.

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 28 s 带后使用超微量分光光度计进行 RNA 质量及质量鉴定,RNA 鉴定合格后使用试剂盒 HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)（购自诺唯赞，货号：R323）反转录为 cDNA。

1.6 数据统计分析 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 5%或 1%的显著性水平上用最小显著性差异（Least Significant Difference, LSD）进行比较。

2 结果与分析

2.1 籼稻 47-1 是一份高抗褐飞虱的种质资源

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 次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，植株表现依然健壮并呈正常绿色，2020 年抗性值为 2.17~2.16，均值为 2.49±0.30；2021 年抗性值为 2.00~2.75，均值为 2.80±0.40；2022 年抗性值为 2.43~3.03，均值为 2.80±0.32（表 2）。9311 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±0.17；2021 年抗性值为 7.90~8.30，均值为 8.12±0.20；2022 年抗性值为 8.03~8.43，均值为 8.18±0.22(图 1A，图 1B 和表 2)。成株期抗虫结果与苗期抗性一致，具体抗性值如

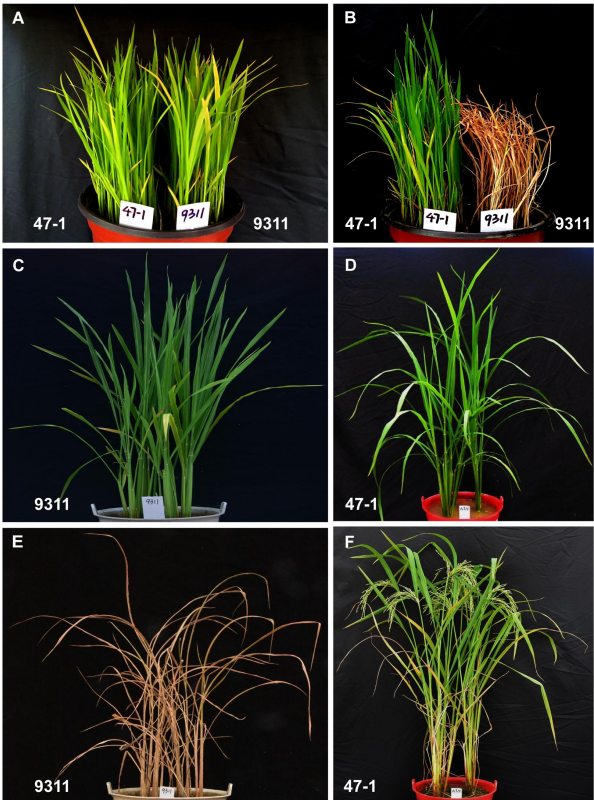
表 2（图 1C-图 1F）。3 次抗虫结果表明两亲本在苗期和成株期的褐飞虱抗性上存在显著的差异（表 2），且 47-1 褐飞虱抗性十分稳定，是一份高抗褐飞虱的水稻种质资源。

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 Year	时期 Periodr	编号 Number	平均值±标准差 (%) Mean ± SD (%)	极大值 (%) Max. (%)	极小值 (%) Min. (%)	标准误 SE
2020. 6	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. 6	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. 6	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

注：**表示差异极显著（ $P<0.01$ ）；下同。
Note: ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$); The same as below.



A：苗期抗虫接虫前；B：苗期抗虫接虫后； C： 9311 成株期接虫前； D： 47-1 成株期接虫前； E： 9311 成株期接虫后； F： 47-1 成株期接虫后。

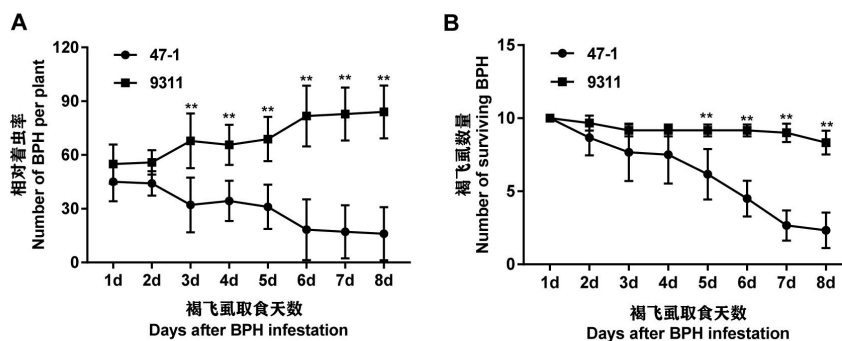
A: Befor BPH infestation in seeding stage; B: After BPH infestation in seeding stage; C: Befor BPH infestation in 9311 adult stage; D: Befor BPH infestation in 47-1 adult stage; E: After BPH infestation in 9311 adult stage; F: After BPH infestation in 47-1 adult stage.

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

2.2 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生性特征,我们通过对褐飞虱虫体的宿主选择和存活试验来进行衡量。宿主选择试验的结果表明,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,抗性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生性。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: 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

2.3 籼稻 47-1 中存在一个主效显性基因

褐飞虱增重试验表明,亲本 47-1 和 9311 对褐飞虱群体分别表现出极抗和极感表型,平均虫体增重倍数为 0.83 和 1.32。在 F_2 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(表 3)。褐飞虱虫体增重鉴定结果表明,定位群体中 91 个 F_2 单株的抗感分离情况如图 3, F_2 群体抗性单株增重倍数范围 ≤ 1.1 , 倍数抗性值按 (≤ 0.9) 和 ($0.9 \sim 1.1$) 水平划分为抗 (RR 和 Rr) 两种类型与倍数抗性值 (> 1.10) 的感 (rr), 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 4)。该结果说明群体中存在一个抗褐飞虱的主效显性基因。

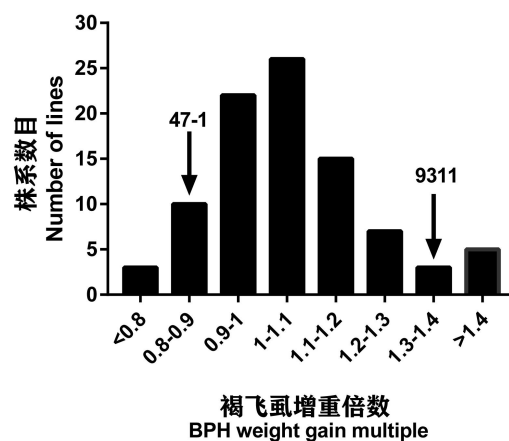


图 3 47-1/9311 F₂群体的虫体增重倍数分布

Fig. 3 Determination of BPH weight gain; B: Distribution of BPH weight increased multiple of F₂ population derived from the cross of

表 3 亲本及 F₂的虫体增重表现

Table. 3 BPH weight of observed traits in the parents and F₂ population

性状 Trait	亲本 Parent		F ₂ 群体 F ₂ Population		
	47-1	9311	平均值±标准差 Mean ± SD	偏度 Skewness	变幅 Range
虫体增重倍数 BPH weight increased multiple	0.83	1.32	1.07±0.18	1.23	0.67~1.75

表 4 47-1/9311 F₂群体对褐飞虱的抗性分离

Table. 4 Segregation of BPH resistance in 47-1/9311 F₂ population

F ₂ 基因型 F ₂ genotypes	F ₂ 个体数 Number of F ₂ individuals	F ₂ 家系表型 Phenotype of F ₂ line
RR	13	≤0.9
Rr	48	0.9~1.1
rr	30	>1.1

注: RR: 纯合抗虫; Rr: 杂合抗虫; rr: 纯合感虫。

Note: RR: Homozygous resistance; Rr: Heterozygous resistance; rr: Homozygous susceptibility.

2.4 籼稻 47-1 抗褐飞虱 QTL 检测

通过 1599 对分布在水稻 12 条染色体上的分子标记, 对亲本 47-1 和 9311 进行多态性筛选, 结果共获得 236 个具有多态性的标记。基于褐飞虱虫体增重法从 F₂群体中选取 10 个极端抗虫家系和 10 个极端感虫单株构建抗感 DNA 池, 标记筛选发现在第 4 染色体上发现有 3 个多态性标记。利用 91 个 F₂单株和分布在第 4 染色体在亲本间有多态性的 5 个分子标记, 构建局部染色体连锁图谱。结合 F₂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 染

色体的分子标记 04M0.453 与 04M3.688 间检测到一个明显的 QTL 位点，最大 LOD 值 5.9，在群体中对抗褐飞虱表型贡献率达到 25.9%（图 4），显然存在一个褐飞虱抗性位点，暂命名为 *Bph40(t)*。

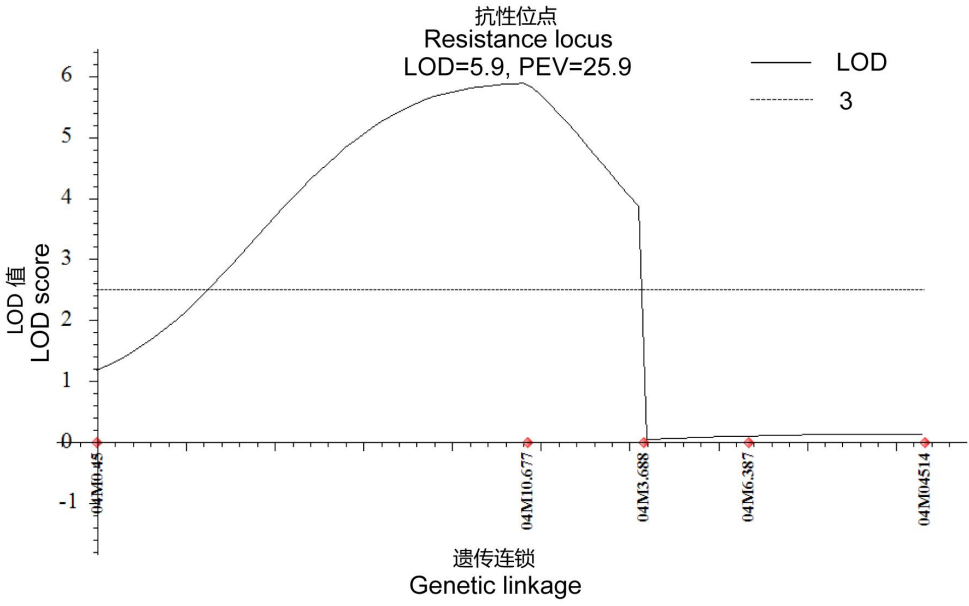
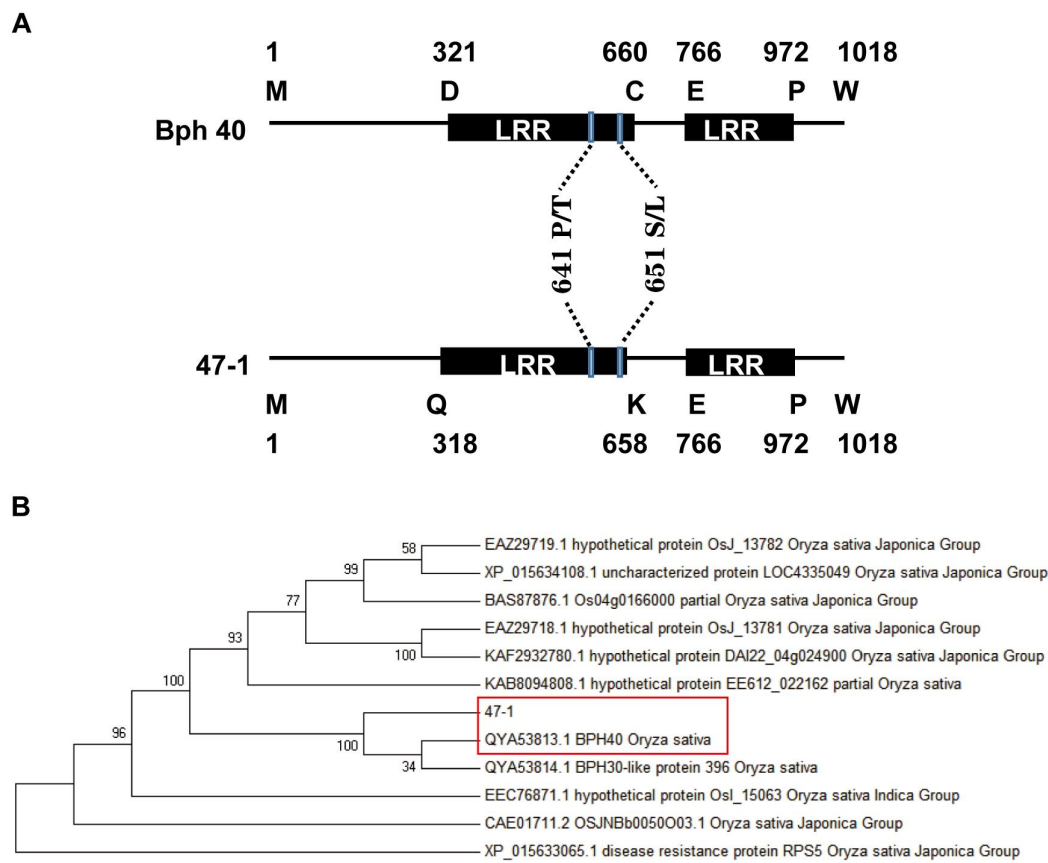


图 4 构建的局部遗传连锁图及抗性 QTL 位置
Fig. 4 Construction of local genetic linkage map and location of resistance QTL.

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 间有一个已经克隆的抗褐飞虱基因 *Bph40*^[11]。于是我们直接对 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 序列仅存在 3 处碱基的差异，均为单碱基突变。而氨基酸比对则存在 2 处氨基酸差异且在第一个 LRR 结构域上，分别在第 641 和 651 个氨基酸位置处。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* 同源度最高（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* 的一个新等位基因。



A: *Bph40* 和 47-1 中 *LOC_Os04g08390* 氨基酸序列比较; B: 基于 *Bph40* 氨基酸序列及其同源序列构建的系统发育树。方框内为已克隆 *Bph40* 及抗源 47-1 中等位基因对应的氨基酸序列。

A: Amino acid sequence comparison of *LOC_Os04g08390* in *Bph40* and 47-1; B: Phylogenetic tree developed with amino acid sequence of *Bph40* and its homologous sequences. Box means amino acid sequence of cloned *Bph40* and allelic gene derived from resistance accession 47-1.

图 5 *Bph40* 和 47-1 中 *LOC_Os04g08390* 氨基酸序列分析

Fig. 5 Amino acid sequence analyse of *LOC_Os04g08390* in *Bph40* and 47-1

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^[13]等研究表明，*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* 是一个等位型十分丰富的基因，Guo^[14]等定了来源于不同水稻材料的 *Bph6* 等位基因，将不同类型的 SNP 差异划分为 80 种等位型。因此，快速发掘抗褐飞虱基因（新的主效基因和等位）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。

目前水稻褐飞虱抗性鉴定常用的方法——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^[7]和刘光杰^[15]等均利用 F_2 分离群体的单株通过褐飞虱增重和蜜露量来评价水稻对褐飞虱的抗性鉴定来进行 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）的籼稻 47-1 与 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^[7]等人鉴定方法,我们采用褐飞虱取食 48h 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褐飞虱重量难以一致的误差。结合 F₂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 间检测到一个显著的 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,该区间包含一个已经克隆的抗褐飞虱基因 *Bph40*^[11]。鉴于此,我们根据已经克隆的 *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 *LOC_Os04g08390* 基因的 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,但均在第一个 LRR 结构域上。与此同时 47-1 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* 的一个新的等位基因。

Bph40 与 *Bph30* 均定位在 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 4 号染色体上定位克隆的抗褐飞虱基因最多。例如在 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 4.1Mb,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^[17-20]。

本研究通过褐飞虱增重试验,利用籼稻 47-1 和 9311 构建的 F₂ 分离群体,采用褐飞虱取食 48h 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* 的一个新的等位基因。本研究通过褐飞虱增重法鉴定水稻 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] Hibino H., 1989, Insect-borne viruses in rice, In: Harris K.F. (ed.), *Advances in disease vector research*, Springer-Verlag, New York, USA, pp.209-241
- [2] 程遐年, 吴进才, 马飞. 褐飞虱研究与防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 27-58.
Cheng XN, Wu JC, Ma F. Research and control of brown planthopper[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2003: 27-58.
- [3] Backus EA, Serrano MS, Ranger CM. Mechanisms of hopperburn: an overview of insect taxonomy, behavior, and physiology. *Annu. Rev. Entomol.* 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., and Qiu Y.F., 2019, High resolution mapping and breeding application of a novel brown planthopper resistance gene derived from wild rice (*Oryza rufipogon* Griff), *Rice*, 12(1): 41
- [5] Jairin J., Phengrat K., Teangdeerith S., Vanavichit A., and Toojinda T., 2007, Mapping of a broad-spectrum brown planthopper resistance gene, *Bph3*, on rice chromosome 6, *Molecular Breeding*, 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[J]. *中国科学: 生命科学*, 2021, 51(10): 1435-1446.
Deng YW, Liu YQ, Wang J, Chen XW, He ZH. Strategic thinking and research on crop disease and pest resistance in China[J]. *Scientia*

Sinica(Vitae), 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 WD5515 中抗褐飞虱 QTL 的定位研究[J]. 作物学报, 2016, 42(3):353-360.
- Deng Z, Shi SJ, Wang HY, Shang-Guan XX, Liu BF, Jing SL, Du B, Chen RZ, Zhu LL, He GC. Analysis of QTLs for Brown Planthopper in Indica Rice WD15515[J]. Acta Agronomica Sinica, 2016, 42(3):353-360.
- [8] Qiu YF, Guo JP, Jing SL, Zhu LL, He GC. High-resolution mapping of the brown planthopper resistance gene BPH6 in rice and characterizing its resistance in the 9311 and Nipponbare near isogenic backgrounds[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121: 1601-1611.
- [9] Lin JB, Wang XY, Li Y, Bi FG, Cheng L, Huang FK, Li RB, Qiu YF. Fine mapping, candidate genes analysis, and characterization of a brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene in the rice variety ARC5984[J]. Euphytica, 2020, 216:13.
- [10] Murray M.G., and Thompson W.F., 1980, Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA, Nucleic Acids Res., 8 (19):4321-4325.
- [11] Shi S, Wang H, Nie L, Tan D, Zhou C, Zhang Q, Li Y, Du B, Guo J, Huang J, Wu D, Zheng X, Guan W, Shan J, Zhu L, Chen R, Xue L, Walling LL, He G (2021) Bph30 confers resistance to brown planthopper by fortifying sclerenchyma in rice leaf sheaths. Molecular Plant 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[J]. 南京农业大学学报, 2019, (01): 14-20.
- Tao R, Pan G, Jiang L, Cheng DN, Liu YQ, Wan JM. Genetic analysis and gene mapping of brown planthopper resistance in Indica rice variety 'BP360e' [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2019, (01): 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., 2016, Allelic diversity in an NLR gene BPH9 enables rice to combat planthopper variation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 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., and He G.C., 2018, Bph6 encodes an exocyst-localized protein and confers broad resistance to planthoppers in rice, Nature Genetics, 50(2): 297-306.
- [15] 刘光杰, 郑宜才, 桂丽琴, 沈君辉. 水稻品种抗稻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. Zhejiang Agric Sci, 1999, 11: 306 - 310. (in Chinese)
- [16] Ramalingam J, Vera Cruz CM, Kukreja K, Chittoor JM, Wu JL, Lee SW, Baraoidan M, George ML, Cohen MB, Hulbert SH. Candidate Defense Genes from Rice, Barley, Land Maize and Their Association with Qualitative and Quantitative Resistance in Rice. Mol Plant-Microbe Interact. 2003, 16(1): 14-24.
- [17] Chen JW, Wang L, Pang XF, Pan QH. Genetic analysis and fine mapping of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene bph19(t). Mol Genet Genomics. 2006, 275: 321-329.
- [18] Monna L, Lin HX, 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. Theor Appl Genet. 2002, 104: 772-778.
- [19] Ramalingam J, Vera Cruz CM, Kukreja K, Chittoor JM, Wu JL, Lee SW, Baraoidan M, George ML, Cohen MB, Hulbert SH. Candidate Defense Genes from Rice, Barley, Land Maize and Their Association with Qualitative and Quantitative Resistance in Rice. Mol Plant-Microbe Interact. 2003, 16(1): 14-24.
- [20] Wang GL, Mackill DJ, Bonman JM, McCouch SR, Champoux MC, Nelson RJ. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. Genetics. 1994, 136: 1421-1434.