

药用野生稻抗褐飞虱基因的 RAPD 标记研究

梁肖仍¹, 金科¹, 龙章德³, 申佩弘¹, 蒋承建¹, 武波^{1,2*}

(1. 广西大学 生命科学与技术学院 微生物及植物遗传工程教育部重点实验室 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 南宁 530005; 2. 广西民族大学 化学与生态工程学院, 南宁 530007; 3. 广西中烟工业有限责任公司技术中心, 南宁 530005)

摘要: 以药用野生稻 1665(*O. officinalis*)和栽培稻桂 99 远缘杂交的抗褐飞虱近等基因系 B₃F₄ 分离群体为材料, 利用随机引物对其抗褐飞虱基因进行了 RAPD 标记研究, 获得 3 个与抗褐飞虱基因表现连锁的 RAPD 分子标记(S229₇₀₃、S403₇₈₃和 S11591₄₀₈)。采用 MAPMAKER/EXP. Version 3.0 分析, 结果表明 3 个 RAPD 分子标记与抗褐飞虱基因属于同一连锁群, 覆盖大小为 18.1 cm, 标记间平均距离为 4.53 cm, 为下一步水稻抗褐飞虱基因的精确定位和克隆奠定坚实的基础。

关键词: 药用野生稻; 褐飞虱; 抗褐飞虱基因; RAPD 标记

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)06-0865-04

RAPD mapping of a brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) resistance gene from *Oryza officinalis*

LIANG Xiao-Reng¹, JIN Ke¹, LONG Zhang-De³,
SHEN Pei-Hong¹, JIANG Cheng-Jian¹, WU Bo^{1,2*}

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Key Laboratory of Ministry of Education for Microbial and Plant Genetic Engineering, Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization, Nanning 530005, China; 2. College of Chemistry and Ecology Engineering, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530007, China; 3. Technology Center, China Tobacco Guangxi Industrial Co., Ltd., Nanning 530005, China)

Abstract: B₃F₄, a near-isogenic line(NIL)with *Bph*, was screened by distant hybridization of *Oryza officinalis* 1665 and *Oryza sativa* Gui99, three molecular markers, S229₇₀₃, S403₇₈₃ and S11591₄₀₈, linked to *Bph*, were obtained through RAPD analysis of B₃F₄ with random primers. The result of MAPMAKER/EXP. Version 3.0 analysis showed that these three molecular markers were belonged to the same linkage group with *Bph*, the covered range was 18.1cM and the average distance between markers was 4.53cM. This result will facilitate the further accurate localization and cloning the *Bph* gene.

Key words: *Oryza officinalis*; *Nilaparvata lugens*; *Bph*; RAPD marker

水稻是世界上最重要的粮食作物,随着全球人口的急剧增加,解决粮食问题已迫在眉睫。褐飞虱(*Nilaparvata lugens*, 简称 *BPH*)是一种以水稻为寄主的单食性害虫,是亚洲稻区最严重的病虫害之一(苏昌潮等,2003),而且近年褐飞虱危害越来越严

重(祝莉莉等,2004)。目前,利用寄主抗性被认为是防止褐飞虱最经济而有效的方法(刘宇锋等,2007)。野生稻含丰富的抗性资源,从野生稻品种中发掘新的抗褐飞虱基因,已引起水稻育种学家的广泛关注。近年来从野生稻和栽培稻中已陆续发现了许多

收稿日期: 2009-11-26 修回日期: 2010-04-13

基金项目: 国家“863”高新技术计划课题(2007AA10Z191)[Supported by the High-tech Plan Funding Issues of State“863”(2007AA10Z191)]

作者简介: 梁肖仍(1985-),女,广西玉林人,硕士研究生,生物化学与分子生物学专业,(E-mail)liangxiaoreng@163.com。

*通讯作者(Author for correspondence): 武波,男,博士,博士生导师,教授,从事农业微生物学和环境微生物学研究,(E-mail)wubogxu@gxu.edu.cn。

抗虫基因。迄今为止,已报道了25个抗稻飞虱主效基因(包括4对重复命名的基因),其中14个为显性基因(*Bph*),11个为隐性基因(*Bph*),21个已定位。*Bph1*, *Bph2*, *Bph9*, *Bph10*, *Bph18*(t), *Bph19*(t)和*Bph21*(t)定位在12染色体上;*Bph3*和*Bph4*定位在6染色体上;*Bph11*(t), *Bph13*, *Bph14*, *Bph17*和*Bph19*(t)定位在3染色体上;*Bph12*, *Bph12*, *Bph15*, *Bph16*, *Bph18*(t)和*Bph20*(t)定位在4染色体上;*Bph13*(t)定位在2染色体上(Alam & Cohen, 1998; Chen 等, 2006; Huang 等, 2001; Jena 等, 2006; Xu 等, 2002; Yang 等, 2004; Rahman 等, 2009; 李容柏等, 2006; Tishii 等, 1994; Hirabayashi 等, 1999; 刘国庆等, 2001)。本研究以广西农业科学院获得的近等基因系 B_3F_4 分离群体为材料,应用 RAPD 标记技术,对来自药用野生稻 1665 的抗褐飞虱基因进行分子标记研究,筛选与抗褐飞虱基因紧密连锁的分子标记,构建分子标记与水稻抗褐飞虱基因的连锁遗传图谱,从而为下一步精确定位和克隆该抗褐飞虱基因打下坚实的基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验材料为药用野生稻 1665 与栽培稻桂 99 通过远缘杂交,连续回交、自交获得的 B_3F_4 抗感分离群体,共 122 株(秦学毅等, 2002),其中不抗植株 47 株(分别编号 1-47#),抗性植株 75 株(分别编号 48-122#)。

1.2 近等基因系(NIL)混合抗感 DNA 池的构建

采用 CTAB 法提取该群体各水稻单株基因组 DNA,分别溶于 $1 \times TE$ 中, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用(武波等, 2001)。根据 B_3F_4 单株的抗性鉴定结果,分别选取 10 株抗性级别最高和最低的植株,分别混合其基因组 DNA 构建近等基因系的抗性 DNA 混合池和不抗 DNA 混合池。

1.3 与抗褐飞虱基因连锁的 RAPD 标记筛选

选用 282 个 10 bp 随机引物,分别以抗 DNA 混合池和不抗 DNA 混合池为模板,进行 RAPD 引物的筛选。PCR 反应所需的 TaqDNA 聚合酶和随机引物购自宝生物工程(大连)有限公司, dNTP 购自 Promega 公司, PCR 仪为 PE 公司 9600 型。PCR 扩增反应体系为 $10 \times \text{buffer } 2\text{ }\mu\text{L}$, 2.5 mmol/L dNTP $2\text{ }\mu\text{L}$, 10 pmol/L RAPD primer $1\text{ }\mu\text{L}$, 基因组

DNA($20\sim 50\text{ ng}/\mu\text{L}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, Ex Taq($0.5\text{ u}/\mu\text{L}$) $2\text{ }\mu\text{L}$, 加 ddH₂O 补足至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序为 $95\text{ }^\circ\text{C}$, 5 min ; $94\text{ }^\circ\text{C}$, 30 s ; $36\text{ }^\circ\text{C}$, 30 s ; $72\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min , 40 个循环; $72\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min 。

PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色检测, 并记录每条扩增带谱在琼脂糖凝胶上的位置, 筛选具有抗褐飞虱基因多态性的随机引物, 然后利用具有多态性的引物对 B_3F_4 分离群体进行 RAPD 标记分析, 电泳图谱中存在 RAPD 标记的记为 a, 不存在的则为 b。

1.4 RAPD 标记与抗褐飞虱基因的局部连锁遗传图谱构建

结合近等基因系 B_3F_4 单株表型抗性鉴定结果和 RAPD 标记实验数据, 应用连锁遗传图绘制软件 MapDraw 2.1, 根据 MAPMAKER/EXP. Version 3.0 分析结果, 绘制 RAPD 标记与抗褐飞虱基因的局部连锁遗传图谱。

2 结果与分析

2.1 筛选与抗褐飞虱基因连锁的 RAPD 标记

选用 282 个随机引物, 分别以抗性 DNA 混合池和不抗 DNA 混合池作为模板, 进行 RAPD 引物的筛选。通过 4 轮筛选, 发现随机引物 S229、S403 和 S1159 在抗性 DNA 混合池和不抗 DNA 混合池中具有多态性, 并且条带清晰, 重复性好。筛选的随机引物序列如表 1 所示。从电泳凝胶中, 分别回收具有 RAPD 标记片段 S229、S403 和 S1159。回收片段连接到 pGEM-T Easy 载体上, 送测序, 标记 S229、S403 和 S1159 大小分别为 703、783、1 408 bp。

表 1 具有多态性的随机引物

Table 1 Arbitrary primers of product polymorphism

引物编号 No. of primer	引物序列(5'-3') Sequence of primer	多态性条带数 No. of polymorphorsm band
S229	TGTACCGTC	1
S403	GGGGGATGAG	1
S1159	GTTCTCGGAC	1

随后以 3 个具有多态性引物, 分别对 122 株个体进行 RAPD 标记分析, 部分个体的 RAPD 标记分析图谱见图 1、图 2 和图 3。RAPD 标记的分析结果(表 2)表明, 这 3 个 RAPD 标记在近等基因系群体中与抗褐飞虱基因有比较好的连锁关系, 分别命名为 S229₇₀₃、S403₇₈₃ 和 S1159₁₄₀₈。

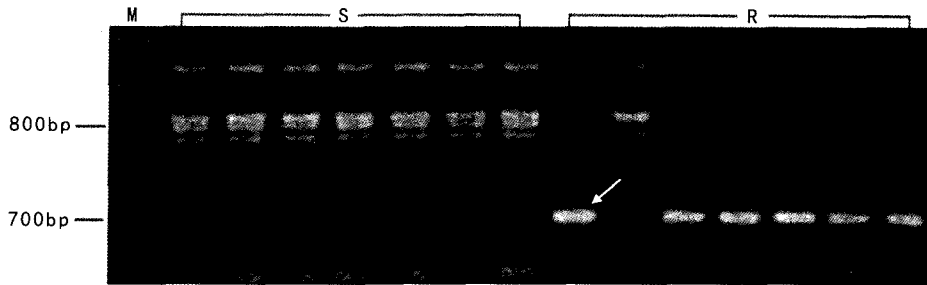


图 1 引物 S229 对部分抗、感个体的 RAPD 标记电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis profiles of PCR amplification by RAPD primer S229 among some resistant and susceptible individuals

M; 100bp DNA maker; S; Susceptible individuals; R; Resistant individuals; Arrow; Polymorphic bands.

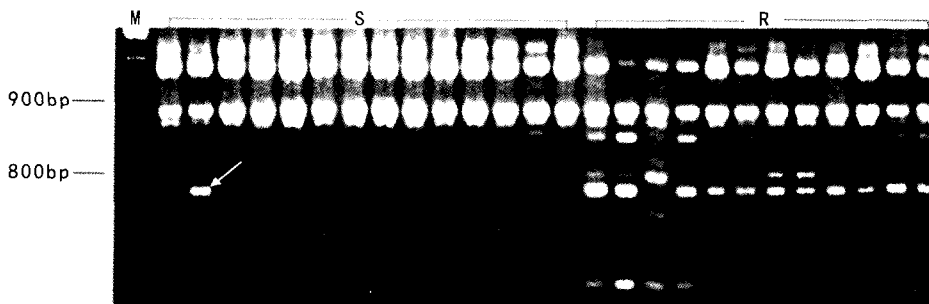


图 2 引物 S403 对部分抗、感个体的 RAPD 标记电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis profiles of PCR amplification by RAPD primer S403 among some resistant and susceptible individuals

M; 100 bp DNA maker; S; Susceptible individuals; R; Resistant individuals; Arrow; Polymorphic bands.

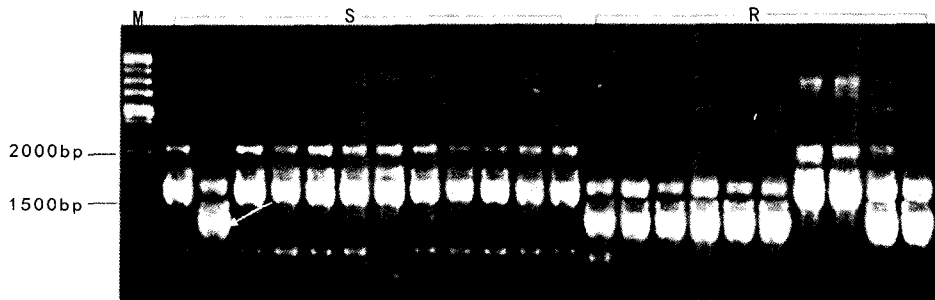


图 3 引物 S1159 对部分抗、感个体的 RAPD 标记电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis profiles of PCR amplification by RAPD primer S1159 among some resistant and susceptible individuals

M; 1 kb DNA maker; S; Susceptible individuals; R; Resistant individuals; Arrow; Polymorphic bands.

2.2 RAPD 标记与抗褐飞虱基因的局部连锁遗传图谱构建

将 3 个 RAPD 标记 (S229₇₀₃、S403₇₈₃ 和 S1159₁₄₀₈) 在近等基因系 B₃F₄122 个单株的分析数据, 结合近等基因系 B₃F₄ 单株表型抗性鉴定结果, 采用 MAPMAKER/EXP. Version 3.0 软件, 与抗

褐飞虱基因进行连锁分析。结果表明 3 个分子标记和抗褐飞虱基因覆盖大小为 18.1cM, 标记间平均距离为 4.53cM。

根据 MAPMAKER/EXP. Version 3.0 的分析结果, 应用遗传连锁图绘制软件 MapDraw2.1, 绘制 RAPD 标记与抗褐飞虱基因的局部连锁遗传图谱。

分析表明 3 个分子标记和抗褐飞虱基因属于同一连锁群(图 4),并位于抗褐飞虱基因的两端。其中标记 S403₇₈₃ 与抗褐飞虱基因的遗传距离最近,为 4.9 cm。

表 2 近等基因系群体的 RAPD 标记分析结果
Table 2 Results of RAPD marker analysis of NIL

标记编号 No.	不抗个体存在 在标记编 No. of nonresistance has marker	抗性个体缺失标记编号 No. of resistance hasn't marker
S229 ₇₀₃	25	51, 81, 8, 112, 113, 114, 115, 119, 122
S403 ₇₈₃	21	65, 76, 88, 106, 113, 117, 119, 122
S1159 ₁₁₀₈	—	54, 55, 63, 68, 72, 75, 98, 102, 119

3 讨论

RAPD 标记是以 PCR 为基础的分子标记技术,它是以短的随机寡核苷酸序列作为引物进行 PCR 扩增,产生不连续的片段,以揭示生物的遗传多态性,其不依赖种属特异性和基因组结构,合成的随机引物可用于不同生物的基因组分析。此外,一次 RAPD 标记的 PCR 扩增可检测多个基因位点,检测的范围可覆盖整个基因组区域。与传统经典的形态学标记、细胞学标记以及生化标记相比,具有极大的优越性。与 RFLP 标记相比,RAPD 标记对 DNA 需要量和质量要求不高,操作简单易行,且不需要接触放射性物质,实验周期短,甚至可以检测 RFLP 标记所不能检出的重复序列区,因此可以作为 RFLP 标记图谱的补充,也可以作为单独的分子标记方法作连锁遗传图谱(方宣钧等,2000)。

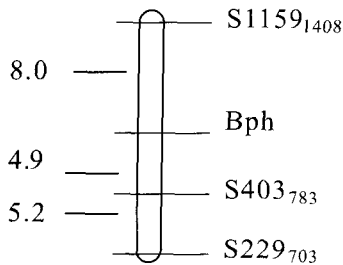


图 4 抗褐飞虱基因与 RAPD 标记的局部连锁遗传图

Fig. 4 Regional linkmap among *Bph* and RAPD markers

Left: genetic distance; Right: marker site.

到目前为止,RAPD 标记已广泛应用于稻属的研究。Cha 等(2008)应用 RAPD 标记技术从籼稻

品种 cheongcheongbyeozhong 中获得 3 个 RAPD 标记,进一步精确定位 *Bph1*。韦东等(2005)选用 282 个随机引物从药用野生稻 1665 中筛选到 2 个与抗褐飞虱基因表现连锁的 RAPD 标记,其中 BS303 与抗褐飞虱基因的遗传距离为 0.8 cm。在此基础上,本研究利用 RAPD 标记技术对来源于药用野生稻 1665 的抗褐飞虱基因进行研究,获得另外 3 个具有多态性的 RAPD 引物,3 个分子标记和抗褐飞虱基因属于同一连锁群,覆盖大小为 18.1 cm,标记间平均距离为 4.53 cm。对来源于药用野生稻 1665 的抗褐飞虱基因进行了进一步的精细定位,从而为下一步水稻褐飞虱基因的精确定位和克隆分离打下了坚实的基础。

参考文献:

- 方宣钧,吴为人,唐纪良. 2000. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京:科学出版社:25-27
- 刘国庆,彦辉煌,傅强,等. 2001. 栽培稻的紧穗野生稻抗褐飞虱主效基因的遗传定位[J]. 科学通报,46(9):738-742
- Alam SN, Cohen MB. 1998. Durability of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, resistance in rice variety IR64 in greenhouse selection studies[J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 89:71-78
- Cha YS, Ji H, Yun DW, et al. 2008. Fine mapping of the rice *Bph1* gene, which confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*), and development of STS markers for marker-assisted selection[J]. *Mol Cell*, 26:146-151
- Chen JW, Wang L, Pang XF, et al. 2006. Genetic analysis and fine mapping of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) resistance gene *Bph19(t)*[J]. *Mol Gen Genomics*, 275:321-329
- Huang Z, He G, Shu L, et al. 2001. Identification and mapping of two brown planthopper resistance genes in rice[J]. *Theor Appl Genet*, 102:929-934
- Hirabayashi H, Ogawa T. 1999. Identification and utilization of DNA markers linked to genes for resistance to brown planthopper (*BPH*) in rice (in Japanese)[J]. *Recent Adv Breed Sci*, 41:71-74
- Jena KK, Jeung JU, Lee JH, et al. 2006. High-resolution mapping of a new brown planthopper (*BPH*) resistance gene, *Bph18(t)*, and marker-assisted selection for *BPH* resistance in rice (*Oryza sativa*)[J]. *Theor Appl Genet*, 112:288-297
- Liu YF(刘宇锋), Li RB(李容柏), Yang L(杨朗), et al. 2007. Advances in resistance gene of brown planthopper in rice(水稻褐飞虱抗性基因研究进展)[J]. *Guangxi Agric Sci(广西农业科学)*, 38(1):11-15
- Li RB(李容柏), Li LS(李丽淑), Wei SM(韦素美), et al. 2006. The evaluation and utilization of new genes for brown planthopper resistance in common wild rice (*Oryza rufipogon*) (普通野生稻抗褐飞虱新基因的鉴定与利用)[J]. *Mol Plant Breeding(分子植物育种)*, 4(3):365-371

(下转第 824 页 Continue on page 824)

References:

- Chen PC. 1963. Genera Muscorum Sinicorum(1)[M]. Beijing: Science Press; 1-304
- Chen PC. 1978. Genera Muscorum Sinicorum(2)[M]. Beijing: Science Press; 1-331
- Dixon HN. 1933. Mosses of Hong Kong; with other Chinese mosses[J]. *Hong Kong Nat*, Suppl 2: 1-31
- Evans AW. 1919. A taxonomic study of *Dumortiera*[J]. *Bull Torrey Bot Club*, 46: 167-182
- Goebel K. 1910. Archegoniaten-Studien XIII [J]. *Monosolenium tenerum Griffith Flora*, 101: 43-97
- He ZX, Zhang L, Xie GZ, et al. 2004. A preliminary list of mosses from Shimantai Nature Reserve, Guangdong[J]. *J Trop Subtrop Bot*, 12(6): 541-551
- Jia Y, Wu PC, Wang MZ. 2001. Bryoflora of Mt. Wutong, Shenzhen City, South China[J]. *Guizhou Sci*, 19(4): 16-22
- Li ZH. 1987. A checklist of bryophytes of Heishiding Nature Reserve, Fengkai County[J]. *Ecol Sci*, 1-2: 184-190
- Li ZH, Liao WB, Huang WJ. 1998. Bryophytes of National Nanling Nature Reserve, Guangdong Province, South China[J]. *Chenia*, 5: 147-159
- Li ZH, Piippo S. 1994. Preliminary list of bryophytes of Heishiding Nature Reserve, Guangdong Province, China [J]. *Trop Bryol*, 9: 35-41
- Lin PJ, Yang YY, Li ZH. 1982. A study of the bryophytes of Ding-Hu-Shan[J]. *Trop Subtrop For Ecosys*, 1: 58-76
- Liu WQ, Lei CY, Dai XH. 2007. Bryophyte communities in the forest of Heishiding Nature Reserve, Guangdong, China[J]. *J Trop Subtrop Bot*, 15(6): 538-544
- Liu WQ, Zan QJ, Liao WB, et al. 1999. Study on the bryophytes of Neilingding Island Nature Reserve, Guangdong Province, China[J]. *Guihaia*, 19(4): 303-307
- Mitten W. 1891. An enumeration of all species of Musci and Hepaticae recorded from Japan[J]. *Trans Proc Linn Soc London ser 2*, 3: 153-206
- Paris EG. 1901. Muscinées de Quang Tcheou Wan[J]. *Rev Bryol*, 28: 37-38
- Paris EG. 1909. Muscinées de l'Asie Orientale, 10[J]. *Rev Bryol*, 36: 88-91
- Paris EG. 1911. Mousse de l'Asie Orientale, 12[J]. *Rev Bryol*, 38: 53-60
- Redfearn Jr PL, Tan BC, He S. 1996. A newly updated and annotated checklist of Chinese mosses[J]. *J Hattori Bot Lab*, 79: 163-357
- Reimers H. 1931. Beitrage zur moosflora Chinas I[J]. *Hedwigia*, 71: 1-77
- Renauld F, Cardot J. 1905. Musci exotici novi vel minus cogniti, X [J]. *Mem Soc Roy Bot Belgique*, 41: 7-122
- Salmon ES. 1900. On some mosses from China and Japan[J]. *J Linn Soc Bot*, 34: 449-474
- Wu H, Lin PJ, Zhang L, et al. 1992. Bryophytes of National Chebaling Nature Reserve, Guangdong Province[M]//Xu YQ(eds). Collected papers for investigation in National Chebaling Nature Preserve. Guangdong: Science and Technology Publishing House; 187-198
- Zeng GQ, Lin BJ. 2001. Mosses in limestone area in Northern Guangdong[J]. *J Trop Subtrop Bot*, 9(2): 113-122
- Zeng ZX, Huang WF. 2001. Natural geography of Guangdong [M]. Guangdong: Guangdong People Publisher, 1-385
- Zhao ZT, Cao T. 1998. Flora Bryophytorum Shandongicorum[M]. Shandong: Shandong Science and Technology Press, 1-339
- Zhu RL, Hu RL, Guo XH. 1992a. A study on epiphyllous liverworts from Babao Shan, Guangdong[J]. *Acta Bot Yunnanica*, 14(3): 264-268
- Zhu RL, Wang YF. 1992b. A preliminary revision of epiphyllous liverworts from Dinghushan[J]. *J East China Normal Univ (Nat Sci Edi)*, (2): 90-97

(上接第 868 页 Continue from page 865)

- Qin XY(秦学毅), Wei SM(韦素美), Wu B(武波), et al. 2002. Inheritance of resistance to brown planthopper in *Oryza officinalis* and its utilization(药用野生稻抗源对褐稻虱的抗性遗传及利用研究)[J]. *Southwest China J Agric Sci*(西南农业学报), 15(4): 62-65
- Rahman ML, Jiang W, Chu SH, et al. 2009. High-resolution mapping of two rice brown planthopper resistance genes, *Bph20(t)* and *Bph21(t)*, originating from *Oryza minuta*[J]. *Theor Appl Genet*, 119: 1 237-1 246
- Su CC(苏昌潮), Cheng XN(程遐年), Zhai HQ(翟虎渠), et al. 2003. Progress in studies on genetics of resistance to rice brown planthopper(*Nilaparvata lugens*) of resistant cultivars(水稻抗褐飞虱遗传和育种研究)[J]. *Hybrid Rice*(杂交水稻), 18(4): 1-6
- Tishii T, Brar DS, Multani DS. 1994. Molecular tagging of genes for brown planthopper resistance and earliness introgressed from *Oryza australiensis* into cultivated rice, *O. sativa*[J]. *Genome*, 37: 217-221
- Wu B(武波), Wei D(韦东), Qin XY(秦学毅), et al. 2001. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of wild rice and cultivated rice(野生稻和栽培稻的随机多态 DNA(RAPD)分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), 21(4): 339-343
- Wei D(韦东), Qin XY(秦学毅), Ou Q(欧倩), et al. 2005. Studies on RAPD marker of rice *Bph*(水稻抗褐飞虱基因的 RAPD 标记研究)[J]. *Southwest China J Agric Sci*(西南农业学报), 18(6): 764-766
- Xu XF, Mei HW, Luo LJ, et al. 2002. RFLP-facilitated investigation of the quantitative resistance of rice to brown planthopper (*Nilaparvata lugens*)[J]. *Theor Appl Genet*, 104: 248-253
- Yang HY, You AQ, Yang ZF, et al. 2004. High-resolution genetic mapping at the *Bph15* locus for brown planthopper resistance in rice(*Oryza sativa*)[J]. *Theor Appl Genet*, 110: 182-191
- Zhu LL(祝莉莉), Zhu CL(祝彩磊), Weng QM(翁清妹), et al. 2004. Research progress on brown planthopper resistance genes in rice(水稻抗褐飞虱基因的研究)[J]. *Hubei Agric Sci*(湖北农业科学), 1: 19-24