



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102766625 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201210260939. 2

(22) 申请日 2012. 07. 20

(71) 申请人 广西大学

地址 530005 广西壮族自治区南宁市大学路
100 号

(72) 发明人 李容柏 陈保善 黄大辉 邱永福
黄凤宽 张月雄 韦燕萍 刘芳

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限
公司 11002

代理人 王朋飞 张庆敏

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 8 页
序列表 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

抗稻褐飞虱主效基因 bph22(t) 的分子标记
及其应用

(57) 摘要

本发明提供了水稻抗褐飞虱主效基因 bph22(t) 的分子标记及其应用。通过将水稻抗虫品系 W2183 (♂) 与感虫品种白毛(白 R54) (♀) 杂交回交获得各后代, 分别对各后代株系进行抗褐飞虱性状鉴定及遗传连锁分析, 获得抗虫品系 W2183 携带的抗性基因 bph22(t) 并定位于分子标记 RM16846 和 RM16888 之间。与该基因紧密连锁的分子标记还有 RM16852、RM16853、RM16858 和 RM16874 之一。本发明分子标记可以有效检测抗虫品系 W2183 及其衍生品种(系) 中是否含有该主效抗性基因位点, 大大提高抗褐飞虱水稻的选择效率, 获得含有 bph22(t) 基因的抗褐飞虱水稻品种。

1. 水稻抗褐飞虱主效基因 bph22(t) 的分子标记,其由下述之一的引物对经 PCR 扩增获得:

1) 标记引物, RM16846

左端引物序列, CTACAAGCAACACAGTATCACAGC

右端引物序列, GGTAAGTGGTGCTTATTTAGCC ;

2) 标记引物, RM16852

左端引物序列, GTAGCCTTGCACTCGACCGTACC

右端引物序列, ACCAACTCTGGCAATGCATCC ;

3) 标记引物, RM16853

左端引物序列, CTCCCATCCTTCATTTTCATCTCG

右端引物序列, CTTTCTGCAAGACACTGCAAACG ;

4) 标记引物, RM16858

左端引物序列, ACGATAACGGCTCTGTTTCTTCG

右端引物序列, CGTATCTCGTGGTTGCAGATCG ;

5) 标记引物, RM16874

左端引物序列, TAGCAAGCTTGGAGAAGTGATGG

右端引物序列, CAGAAGAAGTCAGCTCTATGCTTGG ;或,

6) 标记引物, RM16888

左端引物序列, AGGGAATCCAGCAAAGGAACC

右端引物序列, GTTGCATTGCATAGCGACTCAGG。

2. 权利要求 1 所述分子标记在选育抗褐飞虱水稻中的应用。

3. 水稻抗褐飞虱主效基因 bph22(t) 的分子标记方法,其通过下述之一的引物对扩增待检水稻基因组 DNA,并检测扩增产物:

1) 标记引物, RM16846

左端引物序列, CTACAAGCAACACAGTATCACAGC

右端引物序列, GGTAAGTGGTGCTTATTTAGCC ;

2) 标记引物, RM16852

左端引物序列, GTAGCCTTGCACTCGACCGTACC

右端引物序列, ACCAACTCTGGCAATGCATCC ;

3) 标记引物, RM16853

左端引物序列, CTCCCATCCTTCATTTTCATCTCG

右端引物序列, CTTTCTGCAAGACACTGCAAACG ;

4) 标记引物, RM16858

左端引物序列, ACGATAACGGCTCTGTTTCTTCG

右端引物序列, CGTATCTCGTGGTTGCAGATCG ;

5) 标记引物, RM16874

左端引物序列, TAGCAAGCTTGGAGAAGTGATGG

右端引物序列, CAGAAGAAGTCAGCTCTATGCTTGG ;或,

6) 标记引物, RM16888

左端引物序列, AGGGAATTCCAGCAAAGGAACC

右端引物序列, GTTGCATTGCATAGCGACTCAGG,

如果用引物 RM16846 能够扩增出 256bp 的扩增片段, 或者用引物 RM16852 能够扩增出 97bp 的扩增片段, 或者用引物 RM16853 能够扩增出 170bp 的扩增片段, 或者用引物 RM16858 能够扩增出 122bp 的扩增片段, 或者用引物 RM16874 能够扩增出 157bp 的扩增片段, 或者用引物 RM16888 能够扩增出 98bp 的扩增片段, 则标志着该待检水稻存在抗褐飞虱主效基因 bph22(t)。

4. 一种筛选抗褐飞虱水稻的方法, 其用权利要求 1 中所述的引物对之一 PCR 方法扩增待检水稻基因组 DNA, 如果用引物 RM16846 能够扩增出 256bp 的扩增片段, 或者用引物 RM16852 能够扩增出 97bp 的扩增片段, 或者用引物 RM16853 能够扩增出 170bp 的扩增片段, 或者用引物 RM16858 能够扩增出 122bp 的扩增片段, 或者用引物 RM16874 能够扩增出 157bp 的扩增片段, 或者用引物 RM16888 能够扩增出 98bp 的扩增片段, 则标志着该待检水稻存在抗褐飞虱主效基因 bph22(t)。

抗稻褐飞虱主效基因 bph22(t) 的分子标记及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子遗传学领域,涉及水稻抗褐飞虱主效基因 bph22(t) 的分子标记,本发明还涉及该分子标记在选育水稻抗褐飞虱品种中的应用。

背景技术

[0002] 水稻是我国的主要粮食作物之一,它的生产直接关系到我国的粮食安全、农民增收和农村稳定。水稻种植过程中面临着种类繁多的病虫害危害,严重时对其产量构成严重的威胁。其中,褐飞虱就是一种爆发力强、危害性大的水稻害虫。上世纪 60 年代以前,褐飞虱仅在我国局部稻区时有发生。其后,随着气候、环境、种植结构、耕作制度和栽培方式等的变化,褐飞虱为害地域由南向北扩展,发生频次增加,危害程度加重。据中国农业年鉴记载,目前我国每年水稻稻飞虱(主要是褐飞虱)发生面积为 2000 万公顷以上,每年因稻飞虱危害造成的直接产量损失达 280 万吨以上。一直以来,褐飞虱的防治主要是依靠施用化学杀虫剂。杀虫剂的大量施用,在一定程度上和一定时间段内控制了褐飞虱的危害,但也消灭了稻田中的褐飞虱天敌。如此循环,极易诱发褐飞虱的“再猖獗”(resurgence),给防治带来更大的困难。

[0003] 褐飞虱连年持续爆发的主要原因是我国推广种植的绝大部分水稻品种不抗虫,加上杂交稻品种株型高大,中后期田间群体大,茎叶茂密,田间郁蔽度高,营养适宜,非常有利于褐飞虱快速繁殖,对褐飞虱等虫害表现为“超感虫性”,在虫源基数大、气候条件适宜时,极易形成爆发流行之势,造成严重危害。实践证明利用抗褐飞虱基因培育抗虫水稻品种是褐飞虱综合防治中最为经济、有效、安全、生态的方法。

[0004] 水稻抗褐飞虱基因的研究始于上世纪 70 年代初,迄今已至少命名 26 个来自野生稻种和栽培稻农家品种资源的主效抗褐飞虱基因(http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase_submission/gene_nomenclature/)。大部分鉴定的抗褐飞虱基因均已经用分子标记定位到水稻染色体上。早期研究的抗褐飞虱基因如 Bph1、bph2 和 Bph3,以及后来鉴定的 Bph14 和 Bph15 已培育成抗虫品种(品系)并在一些水稻种植区推广种植。然而,由于褐飞虱新生物型的产生,抗褐飞虱品种逐渐丧失抗性或面临抗性丧失的危险。例如,带有 Bph1 的抗虫品种,经过几年推广种植后很快就失去抗性,而携带 Bph1 和 bph2 两个基因的品种抗性表现更强并更持久。因此,水稻生产中迫切需要携带新的和多个抗性基因的抗虫品种,由于抗性鉴定的复杂性和不稳定性,利用常规育种手段往往难以有效地导入和聚合不同的抗虫基因。筛选、寻找更多有用的抗性基因,应用于今后的基因聚合,培育出更有效、具有持久广谱抗性的优良品种(系)具有重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种水稻抗褐飞虱主效基因位点 bph22(t) 的分子标记,通过检测与这些抗褐飞虱主效基因位点连锁的分子标记,可以预测水稻植株的褐飞虱抗性,加快抗褐飞虱水稻品种的选择进度。

[0006] 水稻抗褐飞虱主效基因 bph22(t) 的分子标记由下述之一的引物对经 PCR 扩增获得：

[0007] 1) 标记引物, RM16846

[0008] 左端引物序列, CTACAAGCAACACAGTATCACAGC

[0009] 右端引物序列, GGTAAGTGGTGCTTATTTAGCC ;

[0010] 2) 标记引物, RM16852

[0011] 左端引物序列, GTAGCCTTGCACTCGACCGTACC

[0012] 右端引物序列, ACCAACTCTGGCAATGCATCC ;

[0013] 3) 标记引物, RM16853

[0014] 左端引物序列, CTCCCATCCTTCATTTTCATCTCG

[0015] 右端引物序列, CTTTCTGCAAGACACTGCAAACG ;

[0016] 4) 标记引物, RM16858

[0017] 左端引物序列, ACGATAACGGCTCTGTTTCTTCG

[0018] 右端引物序列, CGTATCTCGTGGTTGCAGATCG ;

[0019] 5) 标记引物, RM16874

[0020] 左端引物序列, TAGCAAGCTTGGAGAAGTGATGG

[0021] 右端引物序列, CAGAAGAAGTCAGCTCTATGCTTGG ;或,

[0022] 6) 标记引物, RM16888

[0023] 左端引物序列, AGGGAATCCAGCAAAGGAACC

[0024] 右端引物序列, GTTGCATTGCATAGCGACTCAGG。

[0025] 本发明还提供水稻抗褐飞虱主效基因 bph22(t) 的分子标记方法,其是用上述之一的引物对扩增待检水稻基因组 DNA,如果用引物 RM16846 能够扩增出 256bp 的扩增片段,或者用引物 RM16852 能够扩增出 97bp 的扩增片段,或者用引物 RM16853 能够扩增出 170bp 的扩增片段,或者用引物 RM16858 能够扩增出 122bp 的扩增片段,或者用引物 RM16874 能够扩增出 157bp 的扩增片段,或者用引物 RM16888 能够扩增出 98bp 的扩增片段,则标志着该待检水稻存在抗褐飞虱主效基因 bph22(t)。

[0026] 该基因位点位于水稻基因组第 4 染色体长臂的分子标记 RM6846 和 RM16853 之间的区域内。本发明用抗性鉴定和遗传分析将 bph22(t) 初步定位在分子标记 RM6846 和 RM16888 之间。接着用 6010 个 BC₁F₂ 单株进行抗虫鉴定和极端抗性单株的分子标记基因型分析,根据这些单株的基因型和抗虫级别,分子标记 RM6846 和 RM16853 与抗褐飞虱主效基因 bph22(t) 最靠近,其中 RM16852 与抗性基因完全连锁,同时分子标记 RM16858、RM16874 和 RM16888 均能用于筛选含 bph22(t) 基因的抗褐飞虱水稻品种。

[0027] 筛选上述标记引物的过程如下：

[0028] (1) 最初, Li et al. (Li RB, Li LS, Wei SM et al, 2006, The evaluation and utilization of new genes for brown planthopper resistance in common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). Mol Plant Breeding 4(3):365-371) 从广西普通野生稻的转育后代中进行抗褐飞虱鉴定并筛选出对稻褐飞虱生物型 1 和 2、孟加拉、湄公河(越南)、九龙江(越南)、潘特纳加(印度)等 6 种生物型均具有广谱高抗性的抗源 W2183。用该抗源与感性品种 TN1(由广西农科院植保所提供)杂交、回交及自交构建的 BC₂F₂ 群体进行抗性基因的定

位,初步定位在分子标记 RM6506 和 RM273 之间。后来分别利用感性品种白毛和白 R54 重新构建 BC₁F₂ 群体对抗性基因进行精细定位。因此,本发明筛选并开发了基于 PCR 技术的 SSR 分子标记。一方面,根据 gramene 网站(<http://www.gramene.org/>) 公布的标记按照比较均匀的遗传距离选择一定数目分子标记。另一方面,基于该基因最后的定位区段,参考并比较已测序的水稻品系 9311 及日本晴相应的基因组序列,利用 SSR 搜索工具 SSRIT(<http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>) 来寻找 SSR 基序,并根据其侧翼序列设计引物,为备选标记。其中,SSRIT 设置参数为:最大基序长度为 4 聚体,最小重复数为 5,搜索所有的 SSR 基序。选择所有大于 15 个碱基(基序长度 × 重复数)的 SSR 基序。

[0029] (2) 以感褐飞虱粳稻品种白毛(日本引进品种,由华南农业大学刘耀光教授提供)或白 R54(由湖南杂交水稻工程研究中心白德朗研究员提供)为母本,抗褐飞虱品系 W2183(广西普通野生稻,由本实验室保存材料)为父本,配制杂种、自交、回交、自交,分别构建了白毛/W2183 和白 R54/W2183 的 BC₁F₂ 分离群体,用于抗虫鉴定筛选极端抗虫单株并用于基因型分析。

[0030] (3) 用 CTAB 法(Murray & Thompson,1980 Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*8:4321-4325)提取亲本 W2183、白毛、白 R54 及 BC₁F₂ 群体单株的 DNA。用方法(1)获得的备选标记对亲本进行多态性筛选,PCR 反应在 Bioer 扩增仪上进行,扩增产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分析,记录并选择在亲本间具有多态性的 SSR 标记用于后续分析。

[0031] (4) 采用苗期接虫进行抗虫性鉴定,褐飞虱为南宁周边水稻田捕捉并饲养在感虫品种 TN1 上的群体(生物型 1 和生物型 2 混合群体)。三叶期按 10-12 头/苗的比例接种 2-3 龄褐飞虱若虫,当对照感虫品种 TN1 全部死亡时,参照 IRRI (1998) 的方法对每个单株进行 0、1、3、5、7、9 级的抗性评价,对亲本材料和群体单株评价其抗性级别。

[0032] (5) 根据 BC₁F₂ 单株的抗虫级别,分别选择 20 个极端抗虫单株和 20 个极端感虫单株的 DNA 混合构建抗感池。同时,利用在亲本间有多态性的引物分别筛选抗感池并获得在抗感池之间有多态性的分子标记,该类多态性标记表明与抗性性状是连锁的。然后,根据连锁标记所在的染色体,选择该染色体上在亲本间有多态性的引物筛选 BC₁F₂ 分离群体的获得的极端抗性单株的基因型,PCR 程序同上,获得极端群体基因型资料。根据连锁交换规律,参照 Luo et al. (Luo JJ, Hao W, Jin J, Gao JP, Lin HX, 2008, Fine mapping of Spr3, a locus for spreading panicle from African cultivated rice (*Oryza glaberrima* Steud.). *Mol Plant*1:830-838) 方法将群体基因型资料构建水稻的部分遗传图谱并获得各分子标记的遗传距离。最后,结合 BC₁F₂ 群体筛选的极端抗性单株的分子标记基因型资料和相应的褐飞虱抗性鉴定的抗虫级别,确定抗性基因所在标记间的位置。

[0033] (6) 根据初次 QTL 鉴定的结果,本发明用感性品种白毛和白 R54 重新构建 BC₁F₂ 群体对抗性基因进行精细定位, DNA 提取及 SSR 的 PCR 电泳分析同上述步骤(2),获得与抗褐飞虱主效基因 bph22(t) 共分离的分子标记。

[0034] 本发明提供了一种筛选抗褐飞虱水稻的方法,是利用本发明提供的上述 8 个引物对之一进行 PCR 扩增待检水稻基因组 DNA,如果用引物 RM16846 能够扩增出 256bp 的扩增片段,或者用引物 RM16852 能够扩增出 97bp 的扩增片段,或者用引物 RM16853 能够扩增出 170bp 的扩增片段,或者用引物 RM16858 能够扩增出 122bp 的扩增片段,或者用引物

RM16874 能够扩增出 157bp 的扩增片段, 或者用引物 RM16888 能够扩增出 98bp 的扩增片段, 则标志着该待检水稻存在抗褐飞虱主效基因 *bph22(t)*。

[0035] 本发明是在找到与抗虫基因紧密连锁或共分离的分子标记的基础上, 借助分子标记辅助选择 (Marker-assisted selection, MAS) 技术则可以有针对性地进行抗虫基因的导入和聚合, 选育持久抗性品种, 延缓抗虫品种的退化年限和防止褐飞虱新生物型的发生。本发明的有益效果表现在:

[0036] 1. 通过本发明首次用 SSR 标记精细定位了水稻品系 W2183 中的抗褐飞虱主效基因 *bph22(t)*。

[0037] 2. 通过本发明分子标记定位的主效基因位点位置明确, 鉴定方便。通过检测与该基因位点连锁的分子标记, 即可以预测水稻植株的褐飞虱抗性, 用于水稻品种或品系的基因型检测, 以判断该品种或品系是否具有褐飞虱抗性, 进而快速筛选抗虫品种或品系用于水稻育种。其检测方便快捷, 不受环境影响。

[0038] 3. 辅助育种选择目标明确, 节约成本。在传统育种方法中, 首先要收集具有抗虫基因的亲本与栽培品种进行一系列杂交, 而且要对水稻品种进行抗褐飞虱性状的鉴定并进行选择, 操作非常复杂, 同时还受环境的影响。此外, 在进行抗虫鉴定之前, 首先要获得虫源并饲养繁殖褐飞虱群体, 同时还要求接种虫源与水稻秧苗苗龄较同步, 这同样给育种工作带来麻烦, 若不能有效地处理好虫源、秧苗以及环境之间的关系, 抗褐飞虱的表型鉴定结果可靠性就很低。因此, 抗虫育种不仅费时, 而且难度大, 成本高。然而, 通过检测抗褐飞虱主效基因位点, 可以在苗期就鉴定出高抗褐飞虱的单株, 淘汰其他植株, 不仅节约生产成本而且大大提高抗褐飞虱水稻的选择效率, 极大地缩短水稻品种的育种周期。

附图说明

[0039] 图 1. 水稻材料 W2183 抗褐飞虱主效基因 *bph22(t)* 在第 4 染色体的定位。A, *bph22(t)* 初步定位。垂直线表示水稻第四染色体, 水平短线表示染色体上的分子标记, 括号内的数值表示标记间的遗传距离 (cM), *n* 为群体的单株数目; B, *bph22(t)* 精细定位。*bph22(t)* 定位于 RM16846 和 RM16853 之间 86.3kb 的区域, RM16852 与抗性基因完全连锁。*n* 表示筛选的 BC₁F₂ 极抗单株总数。

[0040] 图 2. 分子标记 RM16853 在亲本及后代单株中的扩增带型。1 白毛, 2 白 R54, 3 特青, 4W2183, 11DNA marker 标记, 其余数字标示的点样孔均为后代单株。

具体实施方式

[0041] 以下实施例进一步说明本发明的内容, 但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下, 对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换, 均属于本发明的范围。

[0042] 实施例 1

[0043] (一) 白毛 /W2183BC₁F₂ 群体构建及表型鉴定

[0044] (1) Li et al. (2006) 从广西普通野生稻的转育后代中进行抗褐飞虱鉴定并筛选出对稻褐飞虱生物型 1 和 2、孟加拉、湄公河(越南)、九龙江(越南)、潘特纳加(印度) 6 种生物型均具有广谱高抗性的抗源 W2183。用该抗源与感性品种 TN1 杂交、回交及自交构建的

BC₂F₂ 群体进行抗性基因的定位,初步定位在分子标记 RM6506 和 RM273 之间。利用感性品种白毛重新构建 BC₁F₂ 群体对抗性基因进行精细定位。因此,本发明筛选并开发了基于 PCR 技术的 SSR 分子标记。为了寻找简单有效且与 bph22(t) 紧密连锁的分子标记,本发明以感虫品种白毛为母本,以抗褐飞虱水稻品系 W2183 为父本杂交,得到的 F₁ 再自交,经过抗虫鉴定筛选获得极端抗性单株,再与感性亲本回交获得 BC₁F₁ 再自交,从而构建了 BC₁F₂ 分离群体并用于抗虫鉴定。

[0045] (2) 对亲本、BC₁F₂ 群体的苗期进行抗虫性鉴定。为确保亲本和 BC₁F₂ 群体中的种子生长一致,所有供试材料在播种前分别浸种催芽。将种子播种于一个长 52cm、宽 37cm、高 6cm,且盛有 4cm 厚营养土的面包盒中。每盒播种 12 行,每行播 30 粒,另外随机播种亲本和 TN1 (感性对照) 各 1 行。播种 7 天后间苗,淘汰病弱苗。待苗长到三叶期时,按 10-12 头/苗的比例接种 2-3 龄褐飞虱若虫,最后罩上鉴定笼(46×30×42cm)。当感虫品种 TN1 全部死亡时,参照 IRRI (1998) 的方法对每个单株进行 0、1、3、5、7 或 9 级的抗性评价(表 1),对亲本材料和群体的每个单株评价抗性级别。

[0046] 表 1 水稻抗褐飞虱性能鉴定的分级标准

[0047]

抗性级别	受害程度 (当 90% 以上 TN1 死亡时考察)	抗性水平
0	植株生长健康, 无叶片受害	抗 (R)

[0048]

1	轻微受害, 一片叶黄	抗 (R)
3	一至两片叶黄, 或一片叶枯萎	抗 (R)
5	两到三片叶黄, 或二片叶枯萎	中抗 (MR)
7	三到四片叶枯萎, 但植株尚未死亡	感 (S)
9	整株死亡	感 (S)

[0049] (二) 参照上述(一)介绍的方法,构建白 R54/W2183 BC₁F₂ 群体及表型鉴定

[0050] (1) Li et al. (2006) 从广西普通野生稻的转育后代中进行抗褐飞虱鉴定并筛选出对稻褐飞虱生物型 1 和 2、孟加拉、湄公河(越南)、九龙江(越南)、潘特纳加(印度) 6 种生物型均具有广谱高抗性的抗源 W2183。用该抗源与感性品种 TN1 杂交、回交及自交构建的 BC₂F₂ 群体进行抗性基因的定位,初步定位在分子标记 RM6506 和 RM273 之间。利用感性品种白 R54 重新构建 BC₁F₂ 群体对抗性基因进行精细定位。因此,本发明筛选并开发了基于 PCR 技术的 SSR 分子标记。为了寻找简单有效且与 bph22(t) 紧密连锁的分子标记,本发明以感虫品种白 R54 为母本,以抗褐飞虱水稻品系 W2183 为父本杂交,得到的 F₁ 再自交,经过抗虫鉴定筛选获得极端抗性单株,再与感性亲本回交获得 BC₁F₁ 再自交,从而构建了 BC₁F₂ 分离群体并用于抗虫鉴定。

[0051] (2) 对亲本、BC₁F₂ 群体的苗期进行抗虫性鉴定。为确保亲本和 BC₁F₂ 群体中的种子生长一致,所有供试材料在播种前分别浸种催芽。将种子播种于一个长 52cm、宽 37cm、高 6cm,且盛有 4cm 厚营养土的面包盒中。每盒播种 12 行,每行播 30 粒,另外随机播种亲本和 TN1 (感性对照) 各 1 行。播种 7 天后间苗,淘汰病弱苗。待苗长到三叶期时,按 10-12 头/苗的比例接种 2-3 龄褐飞虱若虫,最后罩上鉴定笼(46×30×42cm)。当感虫品种 TN1 全部

死亡时,参照 IRRI (1998)的方法对每个单株进行 0、1、3、5、7 或 9 级的抗性评价,对亲本材料和群体的每个单株评价抗性级别。

[0052] (三) 构建的 BC₁F₂ 群体的分子标记分析

[0053] (1) 用 CTAB 法(Murray & Thompson,1980 Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA.Nucleic Acids Res8:4321-4325)提取亲本及 BC₁F₂ 群体中筛选的极端抗性单株的基因组 DNA。

[0054] (2) 根据 gramene 网站(<http://www.gramene.org/>) 公布的标记按照较均匀的遗传距离选择一定数目分子标记。另外,基于该基因最后的定位区段,比较已测序的参考水稻品系 9311 及日本晴相应的基因组序列,利用 SSR 搜索工具 SSRIT (<http://www.gramene.org/db/markers/ssritool>) 来寻找 SSR 基序,并根据其侧翼序列设计引物,为备选标记。其中,SSRIT 设置参数为:最大基序长度为 4 聚体,最小重复数为 5,搜索所有的 SSR 基序。选择所有大于 15 个碱基(基序长度 × 重复数)的 SSR 基序。

[0055] (3) SSR 标记的分析采用 10 μ l 体系。10 μ l 反应体系包括:10×PCR 缓冲液,1.0 μ l;10mM dNTPs,0.1 μ l;10 μ M 引物,0.4 μ l;5U/μ l Taq DNA 聚合酶,0.2 μ l 和 50ng DNA 模板。扩增反应在 Bioer PCR 仪上进行:94℃ 4min;94℃ 30sec,55℃ 30sec,72℃ 40sec,32 个循环;72℃ 5min。扩增产物用 8% 的非变性 PAGE 胶分离,通过银染显色。扩增的 DNA 条带利用装有荧光灯的灯箱进行观察。记录结果,亲本间有多态的引物在 F₂ 群体中进行分析,获取群体基因型资料。

[0056] (4) 根据 BC₁F₂ 单株的抗虫级别,分别选择 20 个极端抗虫单株和 20 个极端感虫单株的 DNA 混合构建抗感池。同时,利用在亲本间有多态性的引物分别筛选抗感池并获得在抗感池之间有多态性的分子标记,该类多态性标记表明与抗性是连锁的。然后,根据连锁标记所在的染色体,选择该染色体上在亲本间有多态性的引物筛选 BC₁F₂ 分离群体的获得的极端抗性单株的基因型,PCR 程序同上,获得极端群体基因型资料。根据连锁交换规律,参照 Luo et al (Luo JJ,Hao W,Jin J,Gao JP,Lin HX,2008,Fine mapping of Spr3, a locus for spreading panicle from African cultivated rice(*Oryza glaberrima* Steud.).Mol Plant1:830-838) 方法将群体基因型资料构建水稻的部分遗传图谱并获得各分子标记的遗传距离。最后,结合 BC₁F₂ 群体筛选的极端抗性单株的分子标记基因型资料和相应的褐飞虱抗性鉴定的抗虫级别,确定抗性基因所在标记间的位置。

[0057] (四) 利用分子标记筛选构建的 BC₁F₂ 群体精细定位 bph22(t) 基因。

[0058] 利用构建的 BC₁F₂ 群体,共 6010 个 BC₁F₂ 单株用来进行抗虫鉴定,筛选出极端抗性的单株 346 株用于精细定位。同时,利用初步定位区间开发的分子标记检测他们在极端抗性单株中的基因型,根据基因型和表现分析标记间的顺序以及抗性基因所在标记间的位置。

[0059] (五) 结果与分析

[0060] 苗期集团抗虫鉴定显示 W2183 的平均抗虫级别为 2.9,其它 2 个感性亲本白毛和白 R54 的抗虫级别分别为 9 级,这表明 W2183 高抗褐飞虱而白毛和白 R54 高感褐飞虱。接着对构建的两个 BC₁F₂ 群体进行抗虫鉴定,在鉴定的 6010 个单株中,抗虫级别为 1、3、5、7、9 的单株分别有 46、300、150、584、4,930 株。一般地,我们将抗虫级别 ≤ 7 的单株确定为抗性单株,> 7 的单株为感性单株。结果有 1,080 株抗性单株和 4,930 株感性单株,它们的比值

均不符合 $1:3(x_c^2=158 > x_c^2=3.84)$ 和 $1:15(x_c^2=1407.1 > x_c^2=3.84)$ 的遗传规律。可见,除了鉴定的抗性主效基因 *bph22(t)* 以外,可能还存在多个微效的抗性基因控制该群体的抗性遗传。对抗性基因进行初步定位后,根据对 BC_1F_2 群体进行抗褐飞虱鉴定,筛选出极抗单株。

[0061] 根据 gramene 网站(<http://www.gramene.org/>) 公布的标记按照比较均匀的遗传距离选择合成一定数目的分子标记。另外,基于该基因最后的定位区段,比较已测序的参考水稻品系 9311 及日本晴相应的基因组序列,利用 SSR 搜索工具 SSRIT (<http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>) 来寻找 SSR 基序,并根据其侧翼序列设计引物,为备选标记。

[0062] 用亲本间有多态性的 SSR 标记分析极端抗性单株的基因型,同时结合各单株的抗性值进行分析。结果表明抗性基因应该位于第 4 染色体长臂 RM16846 和 RM16888 间,两个标记间的遗传距离为 1.2cM。

[0063] 由于 RM16846 和 RM16888 之间的物理距离仍较大,在已测序的粳稻品种日本晴基因组中相距约 452kb,为了寻找与 *bph22(t)* 连锁更紧密的标记,本发明在 RM16846 和 RM16888 之间开发了 4 个有效的分子标记(RM16852、RM16853、RM16858 和 RM16874) 筛选了 346 个极端抗性单株。结果显示,4 个标记检测到 10 个重组单株,其中 RM16888 检测到 10 个重组单株, RM16874 和 RM16858 分别检测到 6 株和 3 株, RM16853 检测到 1 株, RM16852 与 *bph22(t)* 共分离,未检测到重组单株(表 2)。通过连锁分析,我们将 *bph22(t)* 定位于 RM16846 和 RM16853 之间(图 1)。在测序的日本晴品种中, RM16846 和 RM16853 之间的物理距离有 86.3kb,位于 OSJNB005B21 BAC 克隆上。因此,利用上述分子标记来鉴定 *bph22(t)* 抗性基因的存在具有非常高的效率,这样也大大提高我国水稻抗褐飞虱品种的育种进度。

[0064] 表 2 分子标记筛选的 BC_1F_2 部分重组单株的基因型及表现型

[0065]

株号	表型	抗性级别	RM16846	RM16852	RM16853	RM16858	RM16874	RM16888
488-14	抗	3.3	B	B	A	A	A	A
1458-29	抗	3.5	A	B	B	B	A	A
488-42	高抗	1.3	A	B	B	B	B	B
1458-14	抗	3.4	B	B	B	A	A	A
488-24	抗	3.1	B	B	B	A	A	A
1458-85	高抗	1.4	B	B	B	B	A	A
白毛	高感	8.9	A	A	A	A	A	A
白R54	高感	8.9	A	A	A	A	A	A
W2183	抗	3.3	B	B	B	B	B	B

[0066] 表中所列单株是部分重组单株,通过分析重组单株基因型和抗虫级别,最终将 *bph22(t)* 基因定位于 RM16846 和 RM16853 之间。

[0067] 实施例 2 分子标记的验证

[0068] 1、材料和方法

[0069] 1.1 阴性品种 :20 份,感虫品种白毛、白 R54、特青(由本实验室保存材料)、9311、日本晴、TN1、白毛 × W2183 杂交组合中的不抗虫材料 14 份。

[0070] 阳性品种 :抗性品系 W2183,白毛 × W2183,白 R54 × W2183 杂交后代的抗虫材料 19

份。

[0071] 分子标记引物 :RM16846、RM16852、RM16853、RM16858、RM16874 和 RM16888,其核苷酸序列分别如 SEQ ID No. 1-12 所示。

[0072] 1.2 方法

[0073] CTAB 抽提法提取水稻样品基因组 DNA (方法同实施例 1)。分别用引物 RM16846、RM16852、RM16853、RM16858、RM16874 和 RM16888 扩增样品 DNA。10 μ l 体系。10 μ l 反应体系包括 :10 \times PCR 缓冲液,1.0 μ l ;10mM dNTPs,0.1 μ l ;10 μ M 引物,0.4 μ l ;5U/ μ l Taq DNA 聚合酶,0.2 μ l 和 50ng DNA 模板。扩增反应在 Bioer PCR 仪上进行 :94 $^{\circ}$ C 4min ;94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 40s,32 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 5min。扩增产物用 8% 的非变性 PAGE 胶分离,电泳后用硝酸银银染法染色后读图分析。

[0074] 2、结果 :

[0075] 用上述方法,分别对水稻品系 W2183 等 40 份不同样本进行扩增。结果表明,在阳性样本中均能分别扩增出相应的 256bp 片段、97bp 片段、170bp 片段、122bp 片段、157bp 片段和 98bp 片段,而在阴性样本中均不能扩增出这些片段。

[0076] 由此说明,本发明提供的分子标记方法能够准确筛选出含有抗褐飞虱的主效基因 bph22(t),从而大大提高育种效率。

[0001]

序列表

- <110> 广西大学
 <120> 抗稻褐飞虱主效基因 bph22(t)的分子标记及其应用
 <130> KHP12113380.9
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 1
 ctacaagcaa cacagtatca cage 24
- <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 2
 ggtaactggt gcttatttag cc 22
- <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 3
 gtagcettgc actcgaccgt acc 23
- <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 4
 accaactctg gcaatgcatc c 21
- <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0002]

<400> 5		
ctcccatcct teatttcate teg		23
<210> 6		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 6		
ctttctgcaa gacactgcaa acg		23
<210> 7		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 7		
acgataacgg ctctgtttct teg		23
<210> 8		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 8		
cgtatctegt ggtgcagat cg		22
<210> 9		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 9		
tagcaagctt ggagaagtga tgg		23
<210> 10		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 10		
cagaagaagt cagetctatg cttgg		25

[0003]

<210>	11	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	11	
	agggaattcc agcaaaggaa cc	22
<210>	12	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	12	
	gttgcatigc atagegactc agg	23

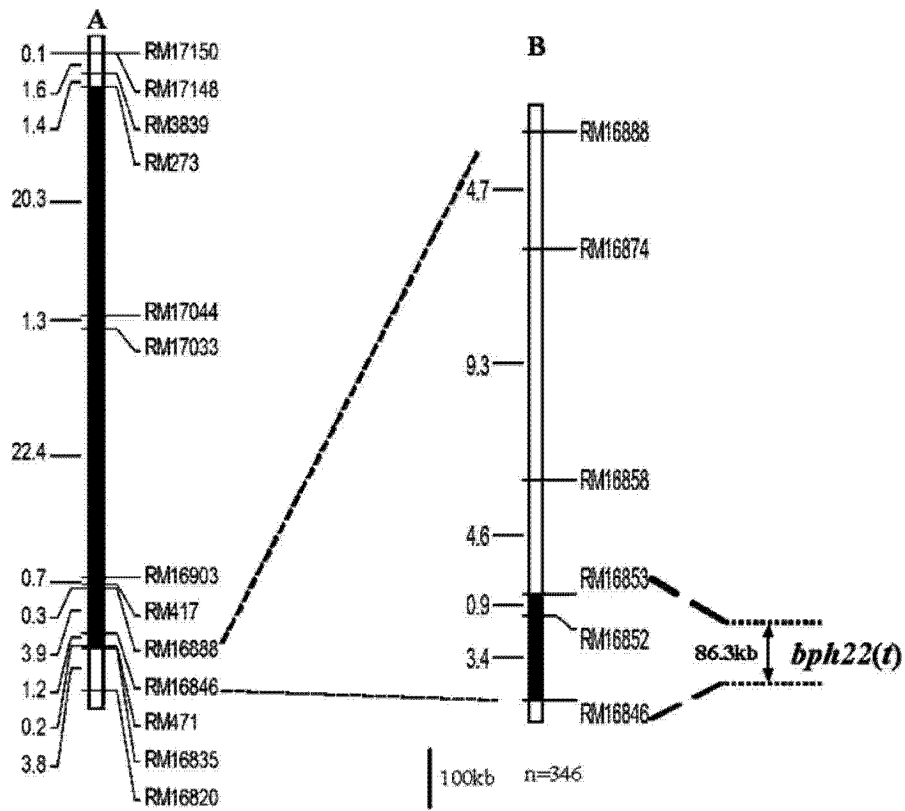


图 1

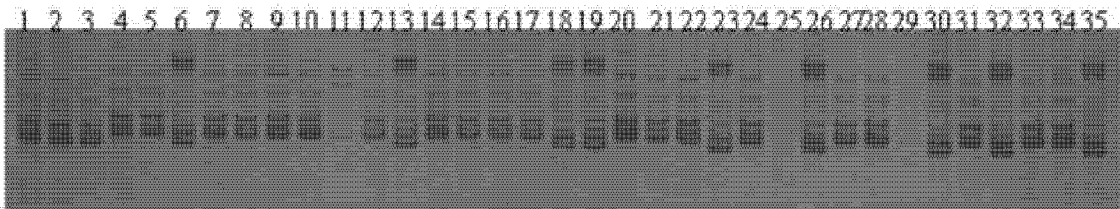


图 2