

水稻叶蝉抗性基因回交转育和 CAPS 标记辅助选择

王春明¹, 安井秀², 吉村醇², 苏昌潮¹, 翟虎渠¹, 万建民¹

(¹南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/江苏省植物基因工程研究中心, 南京 210095;

²日本国立九州大学农学部, 福岡 812-8581)

摘要:以综合性状好但对黑尾叶蝉 (*Nephotettix cincticeps* Uhler) 敏感的品种台中 65 作为轮回亲本, 与抗性品种 DV85 连续回交, 得到回交高代 BC₆F₂ 群体, 进行抗叶蝉性状的回交转育。将抗黑尾叶蝉基因 *Grh2* 两侧的 RFLP 标记 *C189* 和 *G1465* 成功地转换为在亲本间具有多态的 CAPS 标记。在进行表型选择的同时, 利用 CAPS 标记对 BC₆F₂ 进行了标记辅助选择, 分析了 CAPS 标记与 *Grh2* 间的遗传距离和标记辅助选择的效果。所选出的个体具有台中 65 的遗传背景且携带纯合 *Grh2* 基因, 可作为聚合抗叶蝉基因培育新品种的重要中间材料。

关键词:水稻; 黑尾叶蝉; 抗性; CAPS; 标记辅助选择

Green Rice Leafhopper Resistance Gene Transferring Through Backcrossing and CAPS Marker Assisted Selection

WANG Chun-ming¹, Hideshi Yasui², Atsushi Yoshimura², SU Chang-chao¹, ZHAI Hu-qu¹, WAN Jian-min¹

(¹State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University /

Research Center of Plant Gene Engineering, Nanjing 210095;

²Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan)

Abstract: In order to transfer the resistance to green rice leafhopper (*Nephotettix cincticeps* Uhler) into Taichung65, a japonica cultivar with elite characters, the resistant indica cultivar DV85 was backcrossed with Taichung65 as the recurrent parent. *Grh2*, one of resistance genes was located on chromosome 11 of resistant variety DV85. *C189* and *G1465*, two RFLP markers flanking *Grh2* gene, were transformed into CAPS markers. Both phenotypic selection and CAPS marker assisted selection were conducted in the BC₆F₂ population derived from the cross of Taichung65 and DV85 to pick out the important breeding materials with Taichung65 background and resistance to green rice leafhopper. The linkage distance was calculated with the molecular and phenotypic data, meanwhile the effect of the selection method was analyzed.

Key words: *Oryza sativa*; *Nephotettix cincticeps* Uhler; Insect resistance; CAPS; Marker assisted selection

水稻品种 DV85 抗黑尾叶蝉 (*Nephotettix cincticeps* Uhler) 基因 *Grh2* 和 *Grh4* 分别位于第 11 和第 3 染色体上, *C189* 和 *G1465* 为 *Grh2* 两侧的 RFLP 标记, *Grh4* 位于 RFLP 标记 *R44* 和 *Y3870R* 之间^[1,3]。仅有 1 对抗性基因的家系, 即基因型为 *Grh2/Grh2 grh4/grh4* 或 *grh2/grh2 Grh4/Grh4*, 对黑尾叶蝉表现不抗, 而同时具有 2 对抗性基因的

家系, 即基因型为 *Grh2/Grh2 Grh4/Grh4*, 则表现高抗^[2]。利用分子标记辅助选择的方法向综合性状好的品种转育这 2 个抗黑尾叶蝉的基因, 可以加速水稻抗叶蝉基因的聚合育种进程。

可用于水稻标记辅助育种的分子标记技术很多: 基于 DNA-DNA 杂交的 DNA 标记如 RFLP, 基于 PCR 技术的 DNA 标记如 RAPD、SSR、SCAR 和

收稿日期: 2002-01-18

基金项目: 教育部优秀骨干教师基金资助项目和农业部“948”资助项目(201002A)

作者简介: 王春明(1967-), 男, 江苏江都人, 讲师, 博士, 主要从事水稻遗传育种研究。万建民为本文通讯作者, Tel/Fax: 025-4396516; E-mail: wanjm@njau.edu.cn

STS 等。RFLP 分析需要高质量的 DNA、繁琐的转膜技术、同位素标记或昂贵的 ECL 试剂盒,特别是 DNA 的提取需要采集较多叶片而不适合在生长早期进行性状的选择。CAPS 标记(cleaved amplified polymorphic sequences, 酶解扩增多态性序列)是将特异引物 PCR 与限制性酶切相结合而产生的一种 DNA 标记技术,它实际上是一些特异引物 PCR 标记(如 SCAR 和 STS)的延伸。当 SCAR 或 STS 的特异扩增产物的电泳谱带不表现多态性时,补救方法是用限制性内切酶处理扩增产物,然后通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳检测其多态性^[4]。从 RFLP 标记设计出与有用性状连锁的且具有多态的 CAPS 标记是对性状的标记辅助选择极具意义的关键步骤。另一方面,在回交高代进行标记辅助选择时,有助于快速导入有利基因,使栽培品种的性状得到改良^[5]。

笔者以综合性状好但对黑尾叶蝉敏感的品种台中 65 作为轮回亲本,与抗性品种 DV85 连续回交得到回交高代 BC₆F₂ 群体,探索不影响植株正常生长、适合于早期选择重要农艺性状的 CAPS 分析配套方法,将抗黑尾叶蝉基因 *Grh2* 两侧的 RFLP 标记 *C189* 和 *G1465* 转换为在亲本间具有多态的 CAPS 标记,在进行表型选择的同时,利用 CAPS 标记对 BC₆F₂ 进行标记辅助选择,将抗叶蝉基因 *Grh2* 快速导入台中 65 品种,分析 CAPS 标记与 *Grh2* 间的遗传距离和标记辅助选择的效果,以期选出具有台中 65 的遗传背景且携带纯合 *Grh2* 基因的个体,作为聚合抗叶蝉基因培育新品种的重要中间材料。

1 材料与方法

1.1 分离群体的构建

台中 65 是综合性状好而对黑尾叶蝉敏感的粳稻品种(基因型为 *grh2/grh2 grh4/grh4*),以之与抗叶蝉品种 DV85(基因型为 *Grh2/Grh2 Grh4/Grh4*)杂交,从杂交后代中选择抗性个体与轮回亲本台中 65 连续回交,在 BC₆F₂ 群体中经 RFLP 分析选择基因型为 *Grh2/grh2 Grh4/Grh4* 的 BC₆F₂ 个体,自交后,产生由 120 个个体组成的基因型为 *Grh2/grh2* 的 BC₆F₃ 分离群体供 CAPS 分析。

1.2 DNA 的简易提取

将 BC₆F₃ 分离群体播于温室中,DNA 的简易提取方法是:从播种 1~2 周后的幼苗上取 1~3 cm 长的叶片放入备有适量 0.4 mol·L⁻¹ NaOH 的离心管

中,用塑料棒碾磨至液体呈绿色,加 160 μl 100 mmol·L⁻¹ Tris(pH 7.5)充分混匀,以稀释 60 倍后的上清液(浓度约 5 ng·μl⁻¹)作为模板 DNA(可置 -20℃ 保存)取 2 μl 至 PCR 板中进行 CAPS 分析(反应体系为 20 μl),同时作接种鉴定,进行表型选择。

1.3 供试虫群

在 25℃、相对湿度 60% 的恒温室中,16 h 人工照明和 8 h 黑暗的光周期条件下繁殖饲养黑尾叶蝉群体,饲料为对叶蝉敏感的水稻品种日本晴。水稻抗性测定方法:每棵幼苗接种 7~10 头 2、3 龄若虫,3 d 后观察,以若虫死亡率作为抗性指标^[6]。

1.4 CAPS 标记设计

CAPS 引物设计方法:从日本水稻基因组(RGP)网页检索到位于 *Grh2* 两侧的 RFLP 标记 *C189* 和 *G1465* 的核苷酸序列,引物设计在 <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3-www.cgi> 网页进行。引物合成和 PCR 产物测序工作由日本 Takara 公司完成。扩增后测序发现台中 65 在 *C189* 区域存在缺失,DV85 正常,2 个亲本的 PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测出多态性;台中 65 的 *G1465* 区域无缺失变异,但存在点突变。因此,从 *G1465* 设计 PCR 引物,这 2 个亲本的 PCR 扩增产物电泳谱带未表现多态,故分别用 7 种限制性内切酶 BamH I、Bgl II、Dra I、EcoR I、EcoRV、HindIII 和 EcoT22 I 进行酶切、电泳和筛选,发现 EcoT22 I 酶能够识别该突变位点,酶切电泳后检测出多态(图 1)。

1.5 CAPS 分析

PCR 反应中 DNA 的变性、退火、延伸条件设定为 94℃ 1 min、55℃ 1 min、72℃ 2 min,循环 45 次。酶切在 37℃ 下进行 2h。结合 CAPS 标记的分子数据和抗性数据用 Mapmaker 软件计算 2 个 CAPS 标记与 *Grh2* 基因的交换值,用 Kosambi 函数转换成遗传距离^[7]。

2 结果与分析

2.1 CAPS 分析

2 个亲本 *C189* 片段处的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,检测出多态性,而 *G1465* 处 PCR 扩增产物电泳谱带不表现多态性,经内切酶的筛选发现,用 EcoT22 I 酶切电泳后检测有多态性。图 2 为 2 个 CAPS 标记在亲本间的多态。图 3 为部分群体 *G1465* 处的 PCR 扩增产物经 EcoT22 I 酶切后出现的 CAPS 多态。

C189引物1 primer1 (forward): caccatgtcatgtcatgccaaactgc

C189引物2 primer2 (reverse): ctctgccccctcctgactt

G1465 引物1 primer1 (forward): aattcaatggtgaggttttgc

G1465 引物2 primer2 (reverse): tgaactgagggttctctga

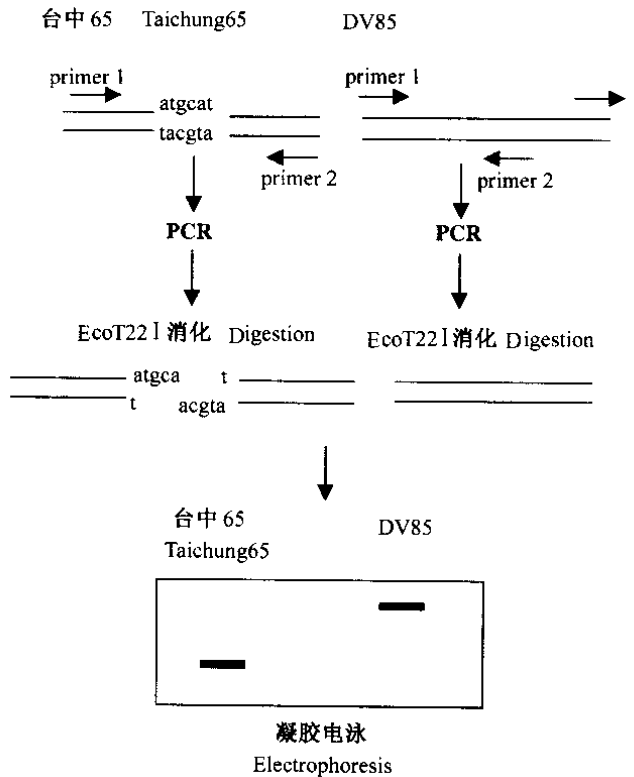
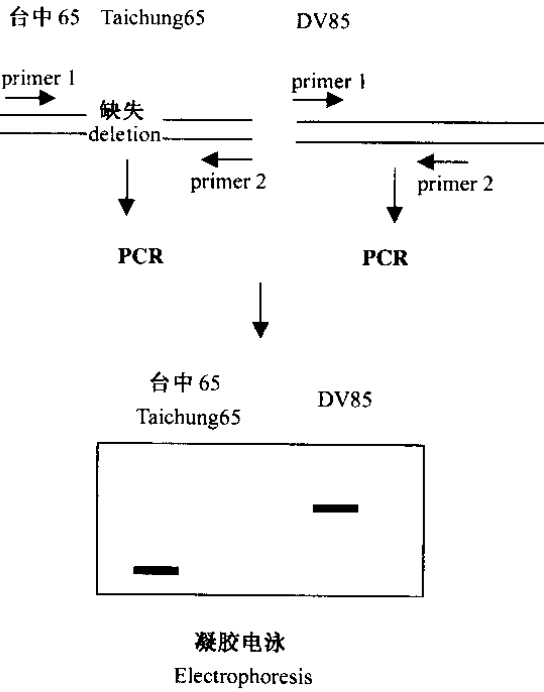


图 1 CAPS 多态检测方法

Fig.1 Procedure of CAPS polymorphism detection

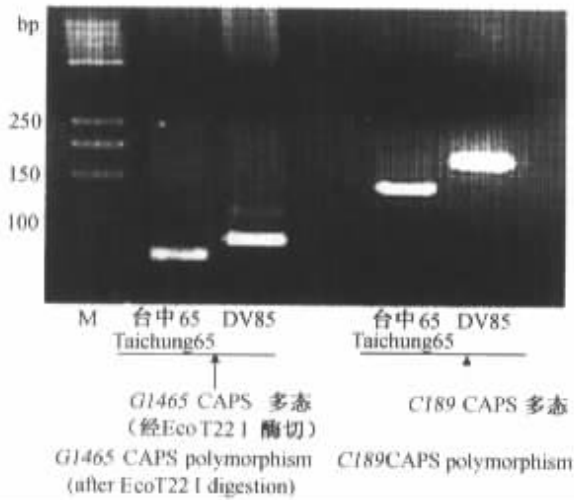


图 2 亲本间 CAPS 多态

Fig.2 CAPS polymorphism between parents

2.2 CAPS 标记辅助选择

对台中 65 与抗叶蝉品种 DV85 回交的 120 个 BC₆F₃ 个体进行抗性鉴定,并利用 *Grh2* 两侧的 RFLP 标记进行 CAPS 分析,用所得分子数据和抗

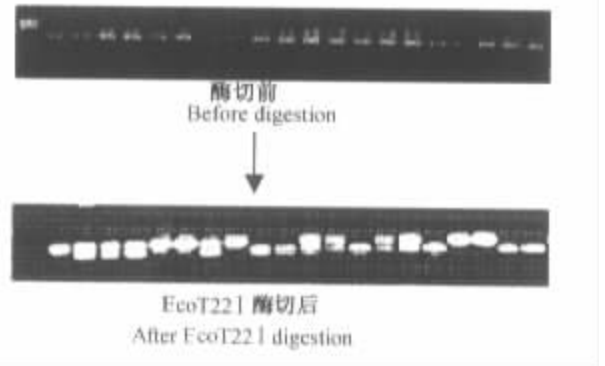


图 3 部分群体 G1465 的 CAPS 多态(经 EcoT22I 酶切)

Fig.3 G1465 CAPS polymorphism (after EcoT22I digestion)

性数据计算这 2 个 CAPS 标记与 *Grh2* 的连锁距离分别为 11.8 cM 和 19.6 cM(图 4)。表型选择方法是进行接种鉴定选择表现抗性的个体,基因型选择方法是根据 *Grh2* 基因两侧的 2 个 CAPS 标记选择该 2 个标记同时呈抗性亲本纯合基因型的个体。这样,所选出的个体如不发生双交换,则可推测其具有

台中 65 的遗传背景且携带纯合 *Grh2* 基因,作为聚合抗叶蝉基因培育新品种的重要中间材料。因 *Grh2* 基因与 *G1465* 的 CAPS 标记间连锁距离偏大,有待于寻找连锁更加紧密的标记。

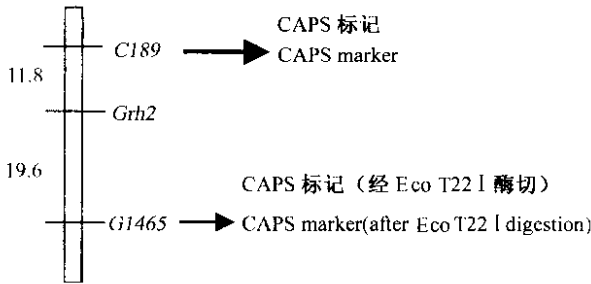


图 4 *Grh2* 基因回交转育中的 CAPS 标记辅助选择

Fig.4 CAPS marker assisted selection in *Grh2* transferring through backcrossing

2.3 选择效果分析

用 A(a) 表示植株的表型; A- 表示抗虫植株,

“aa”表示感虫植株; B(b) 表示 CAPS 位点基因型组成; BB 表示 2 个等位基因位点均来自抗性品种 DV85; Bb 表示一个等位基因位点来自抗性品种 DV85,另一位点来自台中 65; bb 表示 2 个等位基因位点均来自台中 65。由表可见: C189 的 CAPS 标记带型为 BB 的个体有 28 个(28 A-BB + 0 aaBB),全部个体均表现为抗性,说明根据 C189 的 CAPS 标记带型进行选择与进行表型选择的结果完全符合; G1465 的 CAPS 标记的带型为 BB 的个体有 30 个(29 A-BB + 1 aaBB),其中表现为不抗的个体仅有 1 个(aaBB),说明根据 G1465 的 CAPS 标记的带型进行选择与进行表型选择的结果基本符合,正确率为 96.7%,充分表明该选择方法的可靠性。用这 2 个 CAPS 标记对抗黑尾叶蝉基因 *Grh2* 进行标记辅助选择时,应选择 CAPS 标记基因型均为抗性品种 DV85 的植株,因为这 2 个 CAPS 标记与 *Grh2* 相引连锁,在不发生双交换的情况下,推测所选的个体为 *Grh2/Grh2* 基因型。

表 CAPS 标记与 *Grh2* 的分离¹⁾

Table Segregation of CAPS markers and *Grh2* gene

A(a)	B(b)	A-BB	A-Bb	A-bb	aaBB	aaBb	aabb	Total	交换值 Recombination value	cM
<i>Grh2</i>	C189 CAPS 标记 C189 CAPS marker	28	40	5	0	7	23	103	11.6%	11.8
<i>Grh2</i>	G1465 CAPS 标记 G1465 CAPS marker	29	41	3	1	13	15	102	18.7%	19.6

¹⁾ A(a) 示植株的表型; A- 表示抗虫植株; aa 表示感虫植株; B(b) 表示 CAPS 位点基因型组成; BB 表示 2 个等位基因位点均来自抗性品种 DV85; Bb 表示一个等位基因位点来自抗性品种 DV85,另一个来自台中 65; bb 表示 2 个等位基因位点均来自于台中 65

A(a): indicating phenotype of plants analyzed, "A-" denoting resistant plants, "aa" susceptible plants; B(b): indicating genotype of CAPS locus, "BB" denoting two alleles deriving from resistant parent DV85; Bb" denoting one allele from DV85, another from susceptible parent Taichung65, "bb" two alleles from Taichung65

3 讨论

3.1 基因的回交转育和标记辅助选择

育种过程中常有一些材料只有个别性状需要改良,最有效的途径就是选择携带目的基因的供体亲本,进行回交育种。利用分子标记技术可以定位目的基因,从而在杂交后代中选择既有目的基因又具有轮回亲本遗传背景的个体。因此,利用分子标记技术与回交育种相结合,可以快速地将与分子标记连锁的基因转移到另一个品种中,改良某个特定的性状。与常规方法相比,标记辅助选择可以显著提高选择效率^[8,9]。本研究中的 CAPS 标记辅助选择,可以在回交高世代迅速、有效地选择具有台中 65 品种的遗传背景且携带纯合 *Grh2* 基因的重要

育种材料,从而应用于改良台中 65 的抗叶蝉性状。

3.2 CAPS 标记辅助选择

CAPS 技术又称为 PCR-RFLP。一般用特异设计的 PCR 引物扩增目标材料时,由于特定位置的碱基突变,插入或缺失数很小,以至无多态性出现,往往需要对相应 PCR 扩增片段进行酶切处理,以检测其多态性。与 RFLP 技术一样,CAPS 技术检测的多态性其实是酶切片段大小的差异。但 RFLP 分析需要高质量的 DNA、繁琐的转膜技术、同位素标记或昂贵的 ECL 试剂盒,特别是 DNA 的提取需要较多的叶片,而本文中分析方法仅需在幼苗期取 1 cm 长的叶片即可,并不影响植株的正常生长,因此,更加适合于各种性状的早期选择。CAPS 作为一种分子标记,有以下几个优点:①引物与限制酶组合非

常多,增加了揭示多态性的机会,而且操作简便,可用琼脂糖电泳分析;②在真核生物中,CAPS 标记呈共显性,即可区分纯合基因型和杂合基因型;③所需 DNA 量极少;④结果稳定可靠;⑤操作简便、快捷、自动化程度高。总之,CAPS 标记是 PCR 标记的有力补充,可发挥巨大的作用。但是,从 RFLP 标记设计出与有用性状连锁的且具有多态的 CAPS 标记是该项技术的关键步骤,也是对性状选择极具意义的一步。

并非所有的 RFLP 标记都能成功转换成基于 PCR 技术的标记,笔者也尝试将另一个抗叶蝉基因 *Grh4* 两侧的 RFLP 标记转换成 CAPS 标记应用于标记辅助育种,未能得到与 *Grh2* 相媲美的结果。因此,对 *Grh4* 的选择仍沿用了繁琐的 RFLP 标记辅助育种。在 *G1465* 和 *C189* 之间曾进行了 RFLP 标记的筛选,大多标记在亲本间未呈现多态,而个别具有多态的 RFLP 标记(如 *G4001*)不能转换成具有多态的 CAPS 标记。本研究中的 CAPS 标记与目标基因的距离虽然偏大,对于图位克隆来讲需要寻找与 *Grh2* 共分离的标记。但本研究中这 2 个 CAPS 标记可以适用于标记辅助选择,本文的结果也验证了这一点。另外,CAPS 标记须使用内切酶,这增加了研究成本,也限制了该技术的广泛应用。尽管如此,本文中的 DNA 简易提取法、CAPS 引物设计和 CAPS 标记辅助选择等配套方法,具有快速、易行、高效的特点,因而可以广泛应用于水稻各重要农艺性状的选择。

3.3 CAPS 标记辅助选择的效果

本文的 2 个 CAPS 标记与目的基因 *Grh2* 的连锁距离分别为 11.8 cM 和 19.6 cM,标记辅助选择与表型选择符合程度很高,正确率分别达 100% 和 96.6%。因此,可以推测标记与目的基因的连锁距离小于 10 cM 的情况下,标记辅助选择的结果可信,连锁距离为 20 cM 的情况下,将出现较小的偏差。在目的基因的两侧同时进行选择,在标记与目的基因相引连锁、不发生双交换的情况下,可以得到

具有轮回亲本的遗传背景且携带纯合目的基因的个体。本试验结果符合标记辅助选择的数学规律和遗传学原理^[10],对育种实践具有重要的指导意义。

References

- [1] Fukuta Y, Tamura K, Hirae M, Oya S. Genetic analysis of resistance to green rice leafhopper (*Nephotettix cincticeps* Uhler) in rice parental line, Norin-PL6, using RFLP markers. *Breeding Sci.* 1998, 48: 243 - 249.
- [2] Kadowaki M. Genetic Analysis of Resistance to Green Rice Leafhopper from Indica Variety DV85. Dissertation submitted to Kyushu University, Japan for Master Degree, 2001.
- [3] Yazawa S, Yasui H, Yoshimura A, Iwata N. RFLP mapping of genes for resistance to green rice leafhopper (*Nephotettix cincticeps* Uhler) in rice cultivar DV85 using near bisogenic lines. *Sci. Bull.* 1998, Fac. Agr. Kushu Univ. 52: 169 - 175.
- [4] Konieczny A, Ausubel F M. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, 1993, 4(2): 403 - 410.
- [5] Tanksley S D, Nelson J C. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor. Appl. Genet.* 1996, 92: 191 - 203.
- [6] 杉本 渥. 稻叶蝉的大量饲养装置. 农药检查所报告, 1969, 9: 19 - 24.
Sutsumoto W. Facilities for green rice leafhopper rearing. *Report of Pesticide Inspection Institution*, 1969, 9: 19 - 24. (in Japanese)
- [7] Lander E, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M J, Lincoln S E, Newburg L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and nature populations. *Genomics*, 1987, 1: 174 - 181.
- [8] Lander E, Botstein D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 1989, 121: 185 - 199.
- [9] Mohan M, Nair S, Bhagwat A. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, 1997, 3: 87 - 103.
- [10] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种. 北京: 科学出版社, 2001.
Fang X J, Wu W R, Tang J L. *DNA Marker Assisted Breeding in Crops*. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)

(责任编辑 孙雷心)