

## 应用分子标记辅助选育抗褐飞虱水稻两系不育系

徐晓明, 程攀, 陈龙, 曲姗姗, 阴云伙, 田发春, 彭炳生, 吴帅, 李土明, 周卫营\*

(江西红一种业科技股份有限公司, 江西南昌 330046)

**摘要** [目的]选育抗褐飞虱水稻两系不育系。[方法]以 B5 为供体材料, 采用分子标记辅助选择, 将 B5 所含的 *Bph14* 和 *Bph15* 基因导入两系不育系 1892S, 获得符合两用核不育系标准的株系 S136、S179、S192。[结果]分子标记检测结果表明, 3 个株系分别携带 *Bph14* + *Bph15*; 人工接虫鉴定结果显示, 3 个两系不育系都高抗褐飞虱。[结论]该研究为进一步选育抗褐飞虱杂交稻组合提供了亲本材料。

**关键词** 水稻; 两系不育系; 抗褐飞虱; 分子标记辅助选择; 选育

**中图分类号** S503.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)20-107-02

## Breeding TGMS Lines with Resistance to Brown Planthopper by Marker-Assisted Selection

XU Xiao-hong, CHENG Pan, CHEN Long, ZHOU Wei-ying\* et al (Jiangxi Hongyi Seed Science & Technology Co., Ltd., Nanchang, Jiangxi 330046)

**Abstract** [Objective] The TGMS Line with the resistance to brown planthopper was bred. [Method] The gene: *Bph14* and *Bph15*, contained in rice material-B5 was transferred into the TGMS Line 1892S by means of marker-assisted selection (MAS) and three TGMS lines (S136, S179 and S192) were successfully developed. [Result] The result of molecular test and evaluation showed that three lines were with the *Bph14* and *Bph15* and the identification in artificial inoculation of insect indicated that the resistance of three lines to BPH was high. [Conclusion] The rice material was provided for the breeding of the hybrid rice combination with the resistance to BPH.

**Key words** Rice; TGMS line; Brown planthopper; MAS; Breeding

褐飞虱 (Brown rice planthopper) 是我国和许多亚洲国家水稻的主要害虫之一<sup>[1]</sup>。目前防治的主要手段是药物防治, 对环境破坏较大。选育抗褐飞虱品种是防治褐飞虱最经济有效的方法<sup>[2]</sup>。随着分子技术的快速发展, 分子标记辅助选育抗褐飞虱品种越来越受到重视<sup>[3]</sup>。研究表明, 有 30 个抗褐飞虱基因被发现, 利用这些基因选育抗褐飞虱品种已成为防治的关键。武汉大学药用野生稻转育的 B5 含有 2 个抗褐飞虱主效显性基因 *Bph14* 和 *Bph15*, 分别被定位在第 3 染色体长臂和第 4 染色体短臂上<sup>[4]</sup>。1892S 是安徽省农业科学院水稻研究所选育的两系不育系, 株叶形态好, 米质优, 所配组合产量高, 抗倒伏性好但高感褐飞虱<sup>[5]</sup>。笔者用 B5 作为抗源, 以 1892S 为受体, 利用插入缺失标记 (InDel) 76-2 和 SSR 标记 MS5 进行辅助选择<sup>[6-7]</sup>, 选育出含有 *Bph14* 和 *Bph15* 两系不育系新材料 S136、S179、S192, 接虫鉴定对褐飞虱表现出较好的抗性。

## 1 材料与方

**1.1 试验材料** 抗褐飞虱抗源为 B5<sup>[2]</sup> (携带抗褐飞虱基因 *Bph14* 和 *Bph15*), 受体亲本为 1892S (安徽省农业科学院水稻研究所选育)。

**1.2 抗性基因连锁标记** 为了获得抗褐飞虱两系不育系, 在改良过程中, 利用已开发的插入缺失标记 (InDel) 76-2 和 SSR 标记 MS5 在分离群体中进行跟踪检测。相关引物序列由上海生工生物技术服务有限公司合成 (表 1)。

**1.3 抗虫鉴定** 抗虫鉴定在人工简易温室内进行。采用标准苗期集团筛选法进行: 供试两系不育系种子催芽后分别播种

在塑料盆内 (60 cm × 40 cm × 15 cm), 每个不育系插一行, 每行 15 株, 设 3 个重复, 随机排列, 以 TN1 作为感虫对照。当稻苗长至 2 叶 1 心时间苗, 每行保留 10 株, 每株接褐飞虱 2~3 龄若虫 5~7 头。参考文献 [8] 对供试不育系进行抗性评价。

表 1 水稻褐飞虱抗性基因的连锁标记及引物序列

Table 1 Linked Marker of Resistance Gene to Rice BHP and its Primer Sequence

基因 Gene	标记 Marker	引物序列 Primer sequence (5' - 3')
<i>Bph14</i>	76-2	F: CAGGGAAGCTCCAAGAACAG R: CTGCTGCTGCTCTCGTATTG
<i>Bph15</i>	MS5	F: TTGTGGGTCTCATCTCTCTC R: TGACAACCTTTGTCAAGATCAAA

## 2 结果与分析

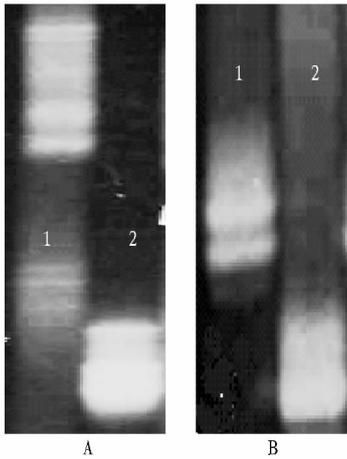
**2.1 分子标记辅助选择体系** 利用与 *Bph14* 相关的插入缺失标记 76-2 和与 *Bph15* 相关的 SSR 标记 MS5 对抗性基因供体亲本 B5 与受体亲本 1892S 进行多态性分析 (图 1)。插入缺失标记 76-2 在供体亲本中扩增出的产物较大, 受体亲本较小, 供体和受体之间表现出明显的多态性。SSR 标记 MS5 在供体和受体间也表现出明显的多态性。

**2.2 抗褐飞虱两系不育系选育** 利用插入缺失标记 76-2 和 SSR 标记 MS5 对基因 *Bph14* 和 *Bph15* 在不同分离时代进行筛选 (图 2)。由于 1892S 是两系不育系, 不育基因的遗传受一对隐性基因控制, F<sub>2</sub> 表现出可育株和不育系的分离。在 F<sub>2</sub> 代中, 选择株叶形态好、株头外露率高、符合不育系特性的不育株, 取其叶片进行检测, 保留含有 *Bph14* 和 *Bph15* 的单株, 割茺再生, 23 °C 恒温冷灌处理, 收获种子。种植 F<sub>3</sub>, 在 F<sub>3</sub> 中继续对 *Bph14* 和 *Bph15* 进行检测, 淘汰不符合要求的单株, 符合要求的单株割茺再生。经过连续筛选, 至 2015 年晚季株系 S136、S179、S192 已基本稳定。选育流程见图 3。

**基金项目** 江西省科技型中小企业技术创新基金项目 [赣科发计字 (2015) 26 号]; 国家农业科技成果转化项目 [赣科发农字 (2014) 150 号]。

**作者简介** 徐晓明 (1988 - ), 女, 湖北宜昌人, 助理农艺师, 硕士, 从事水稻分子育种工作。\* 通讯作者, 农艺师, 硕士, 从事水稻育种方面的研究。

**收稿日期** 2016-05-20



注: A. 76-2, B. MS5; 1. B5, 2. 1892S。

Note: A. 76-2, B. MS5; 1. B5, 2. 1892S.

图1 多态性检测

Fig 1 Polymorphism Detection

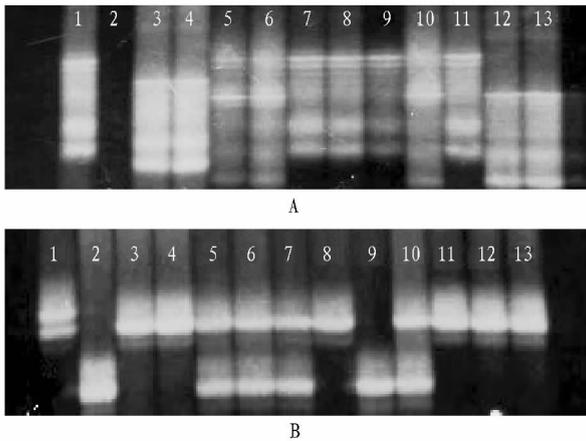


图2 分离群体抗褐飞虱基因 *Bph14* (A) 和 *Bph15* (B) 的分子标记检测

Fig 2 Detection of Molecular Marker of *Bph14* (A) and *Bph15* (B) in Segregation Population

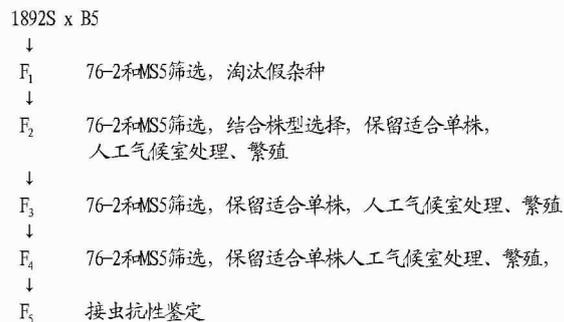


图3 抗褐飞虱两系不育系选育流程

Fig 3 Selection Process of Rice Sterile Line with Resistance to BPH

**2.3 抗性鉴定** 鉴定结果表明, 含有 *Bph14* 和 *Bph15* 2 个基因之一或者 2 个基因均含的株系对褐飞虱表现出较好的抗性, 其中, 7、8、11 号 3 个株系含有 2 个基因, 表现出高抗水平, 说明聚合多个抗性基因对抗性有累加作用, 追踪 7、8 和

11 号株系田间代号, 分别命名为 S136、S179 和 S192 (表 2)。

**2.4 抗褐飞虱两系不育系育性** 1892S 属光温敏核不育系, 不育期花粉败育类型表现为无或少花粉型<sup>[5]</sup>。3 个改良不育系无论在人工恒温水冷灌处理条件下还是自然条件下, 花粉败育类型均表现为无或少花粉型, 自交结实率全部为 0。新选育的 S136、S179、S192 3 个不育系经鉴定, 不育起点温度低于 23.5 ℃, 符合两用核不育系应用标准。

表 2 抗褐飞虱鉴定结果

Table 2 Identification of Resistance 2 Parental Materials and 19 Lines to BPH

编号 No.	组合名称 Combination	分子标记检测纯合基因 Molecular test of homozygous gene	抗性级别 Resistance level	抗性水平 Resistance
1	1892S/B5	<i>Bph14</i>	3	R
2	1892S/B5	<i>Bph15</i>	5	MR
3	1892S/B5	<i>Bph15</i>	1	HR
4	1892S/B5	<i>Bph15</i>	1	HR
5	1892S/B5	<i>Bph14</i>	1	HR
6	1892S/B5	<i>Bph14</i>	5	MR
7	1892S/B5	<i>Bph14</i> + <i>Bph15</i>	1	HR
8	1892S/B5	<i>Bph14</i> + <i>Bph15</i>	1	HR
9	1892S/B5	<i>Bph15</i>	3	R
10	1892S/B5	<i>Bph14</i>	3	R
11	1892S/B5	<i>Bph14</i> + <i>Bph15</i>	1	HR
12	1892S/B5	<i>Bph15</i>	3	R
13	1892S/B5	<i>Bph14</i>	1	HR
14	1892S/B5	<i>Bph14</i>	3	R
15	1892S/B5	<i>Bph15</i>	1	HR
16	1892S/B5	<i>Bph14</i>	1	HR
17	1892S/B5	<i>Bph14</i>	3	R
18	1892S/B5	<i>Bph15</i>	3	R
19	1892S/B5	<i>Bph15</i>	3	R
20	TN1 (CK)	—	9	S
21	B5	<i>Bph14</i> + <i>Bph15</i>	0	I
22	1892S	—	9	S

### 3 结论与讨论

选育抗褐飞虱杂交水稻是防治褐飞虱最有效的途径, 随着分子技术的发展, 一系列抗褐飞虱基因的定位及其标记的开发已成为水稻抗性育种最重要的手段之一。含有 *Bph14* 和 *Bph15* 的 B5 是武汉大学选育的抗褐飞虱亲本, 育种家们利用该材料已选育出多个品种 (材料), 经生产推广检验对褐飞虱具有抗性<sup>[1,6-7]</sup>。

抗性育种一般采取一次杂交、多次回交方法, 保留原始亲本株叶形态<sup>[7]</sup>。该研究则通过一次杂交, F<sub>2</sub> 代大群体 (4 000 株以上) 选择, 尽可能多地选择不同株叶形态单株, 然后借助 MAS 与传统育种技术结合, 基于农艺性状的表现, 将抗性、株型 (包括柱头外露率) 和育性同时选择, 最终选育出 S136、S179、S192 3 个两系不育系株系, 其不但与 1892S 在株叶形态上存在明显差别, 同时育性符合两系不育系的要求。

在抗褐飞虱鉴定中, 不少含 *Bph14* 或 *Bph15* 株系也表现高抗水平, 如 3、4、5、13、15、16 号株系。一般而言, 单基因控制的水稻品种抗性更容易丧失, 但只要这些材料与同样含有其他抗褐飞虱基因的父本配组, 聚合 2 个以上抗性基因, 同样具有应用价值。笔者发现引自湖南杂交水稻工程技术中心的 R318 也含 *Bph15*, 与含 *Bph14* 的 5、6、13、16 号株系配

(下转第 213 页)

表 7 因子分析法确定的评价指标权重

Table 7 The evaluation index weight determined by factor analysis method

序号 Serial No.	评价指标 Evaluation index	权重 Weight
1	高程	0.078 7
2	坡度	0.017 0
3	降水量	0.060 1
4	年均温	0.076 7
5	≥10 ℃积温	0.076 8
6	耕层厚度	0.103 3
7	有机质含量	0.011 2
8	pH	0.089 5
9	灌溉水源	0.059 3
10	灌溉保证率	0.059 9
11	全氮	0.058 8
12	全磷	0.108 6
13	全钾	0.077 5
14	有效磷	0.038 2
15	有效钾	0.084 5

该研究采用线性加权法计算组合权重,首先对 2 种赋权方法进行一致性检验。由于是两种赋权方法的组合,因此适用 Spearman 等级相关系数来刻画<sup>[5]</sup>,即:

$$d(W^{(1)}, W^{(2)}) = \left[ \frac{1}{2} \sum_{j=1}^n (\omega_j^{(1)} - \omega_j^{(2)})^2 \right]^{1/2} \quad (7)$$

当  $0 \leq d(W^{(1)}, W^{(2)}) \leq 1$  时,  $d(W^{(1)}, W^{(2)})$  越小, 2 种赋权结果越接近。经检验, 2 种方法赋权的 Spearman 相关系数在  $[0, 0.126 5]$  范围内, 说明 2 种赋权方法所得权重具有一致性。

线性加权法的计算公式为:

$$\omega = \sum_{k=1}^2 \alpha_k \omega^{(k)} \quad (8)$$

式中,  $\alpha_k$  为第  $k$  种赋权方法的加权参数;  $\omega$  为组合权重向量<sup>[6]</sup>。该研究认为两种计算权重方法的重要程度一致, 即  $\alpha_1 = \alpha_2 = 0.5$ 。

由此可以得到基于组合赋权法的耕地质量等级评价指标权重(表 8)。

### 3 结论与讨论

该研究运用层次分析法和因子分析法相结合的组合赋权法, 对耕地质量评价指标、体系进行赋权, 得出以下结论:

(1) 研究数据显示, 主客观方法确定指标权重存在着明

表 8 组合赋权法确定的耕地质量等级评价指标权重

Table 8 The evaluation index weight of cultivated land quality grade determined by combination weighting method

序号 Serial No.	评价指标 Evaluation index	权重 Weight
1	高程	0.043 7
2	坡度	0.029 9
3	降水量	0.035 9
4	年均温	0.052 7
5	≥10 ℃积温	0.073 8
6	耕层厚度	0.075 4
7	有机质含量	0.095 2
8	pH	0.101 2
9	灌溉水源	0.042 9
10	灌溉保证率	0.095 9
11	全氮	0.108 2
12	全磷	0.084 3
13	全钾	0.072 6
14	有效磷	0.032 7
15	有效钾	0.055 8

显的差异性。主观方法是按照人们的经验和知识进行判断, 客观方法是按照样该数据来计算权重。

(2) 采用组合赋权的方法有利于削弱层次分析法的主观性和因子分析法中的机械性, 使最终结果更接近准确的权重值。

(3) 由于在耕地质量评价过程中指标选取和权重确定是指标体系建立的关键环节, 因此该研究在处理过程中忽略了指标选取过程, 着重研究了权重的确定。在实际应用中, 指标选取更加灵活。

(4) 在因子分析过程中, 通过选取 50 个采样点来构建样本, 这并不能全部覆盖旗域范围, 会对评价结果产生一定的影响。

### 参考文献

- [1] 史双青. 我国信息经济学研究的文献计量分析[J]. 科技情报开发与经济, 2001(28): 101-103.
- [2] 李文生, 许士国. 基于因子分析定权的水质评价模型[J]. 辽宁工程技术大学学报(自然科学版), 2008(3): 444-446.
- [3] 山成菊, 董增川, 樊孔明, 等. 组合赋权法在河流健康评价权重计算中的应用[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2012(6): 622-628.
- [4] 付金霞. 基于 GIS 和组合赋权法的张掖市生态环境质量综合评价研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2006.
- [5] 汪应洛. 系统工程[M]. 2 版. 北京: 机械工业出版社, 2003: 130-140.
- [6] 邓雪, 李家铭, 曾浩健, 等. 层次分析法权重计算方法分析及其应用研究[J]. 数学的实践与认识, 2012(7): 93-100.

(上接第 108 页)

组, 同样聚合了 2 个抗性基因<sup>[1]</sup>。

下一步研究重点以 S136、S179、S192 3 个两系不育系株系为亲本材料, 选育一批抗褐飞虱两系杂交水稻新组合供生产推广应用。

### 参考文献

- [1] 程攀, 陈龙, 曲姗姗, 等. 抗褐飞虱水稻品种选育研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(24): 92-94.
- [2] 林拥军, 华红霞, 何予卿, 等. 水稻褐飞虱综合治理研究与示范[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(5): 1194-1201.

- [3] 黄所生, 黄凤宽, 吴碧球, 等. 水稻新品种(组合)对褐飞虱的抗性评价[J]. 西南农业学报, 2014(5): 1919-1923.
- [4] 王布哪, 黄臻, 舒理慧, 等. 两个来源于野生稻的抗褐飞虱新基因的分子定位[J]. 科学通报, 2001, 46(1): 46-49.
- [5] 杨联松, 白一松. 籼型优质光温敏核不育系 1892S 的选育[J]. 杂交水稻, 2006, 21(3): 15-16.
- [6] 李进波, 万丙良, 夏明元, 等. 抗褐飞虱水稻品种的培育及其抗性表现[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(5): 1348-1353.
- [7] 朱仁山, 黄文超, 胡骏, 等. 抗褐飞虱两系杂交水稻不育系 Bph68S 及其组合两优 234 的选育[J]. 武汉大学学报, 2013(1): 24-28.
- [8] 钱前, 郭龙彪, 曾大力, 等. 水稻分子育种技术指南[M]. 北京: 科学出版社, 2012: 40-45.