



水稻抗褐飞虱基因的发掘与育种利用

郭建平, 陈荣智, 杜波, 祝莉莉, 何光存*

武汉大学生命科学学院, 武汉 430072

*联系人, E-mail: gche@whu.edu.cn

收稿日期: 2022-03-21; 接受日期: 2022-06-09; 网络版发表日期: 2022-08-29

摘要 水稻(*Oryza sativa*)是世界上最重要的粮食作物, 也是生物学基础研究的模式植物. 褐飞虱(*Nilaparvata lugens* Stål, BPH) 是全球水稻生产中的主要害虫之一. 半个多世纪以来, 水稻科学家坚持从水稻种质资源库中发掘抗褐飞虱基因, 深入研究抗褐飞虱机理, 促进了水稻抗褐飞虱品种的培育与应用. 本文以几个典型抗褐飞虱基因为重点, 对水稻抗褐飞虱基因发掘、机理解析、种质创新和育种利用的研究进展作一简要介绍, 以帮助读者了解植物抗虫性的奥秘以及抗虫性研究的重要意义.

关键词 植物-昆虫互作, 抗褐飞虱基因, 图位克隆, 种质, 育种

昆虫是地球上最复杂多样的一类生物. 据研究, 地球上约有100万种昆虫, 其中约有1/2以取食植物为生. 农业害虫是农业生产中最严重的生物灾害因子. 以水稻(*Oryza sativa*)为例, 在造成水稻产量损失的几十种病虫害中, 危害面积最大、造成损失最重的是稻飞虱. 据统计, 我国平均每年发生稻飞虱面积约4亿亩次, 占病虫害总面积的30%, 居于水稻各种病虫害之首^[1].

在现代农业生产中, 害虫的防治主要依赖化学杀虫剂. 在一些作物生长季节中, 必须反复多次使用多种农药才能控制害虫的发展与危害. 水稻每个生长季节要使用农药5~15次. 使用杀虫剂不但增加了生产成本, 而且农药毒杀非靶标生物、污染环境和农产品是一个不争的事实. 长期使用杀虫剂还使害虫产生抗药性. 研究表明, 褐飞虱(*Nilaparvata lugens* Stål, BPH) 对有机磷类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类、昆虫生长调节剂类、吡啶类、苯基吡唑类、新烟碱类等各类

杀虫剂均产生了抗性, 对特效药吡虫啉的抗药性达几百倍甚至上千倍^[2,3]. 一些农药如拟除虫菊酯类杀虫剂、杀菌剂和除草剂等对褐飞虱具有刺激生殖作用, 更加剧了稻飞虱的再猖獗^[4]. 此外, 褐飞虱群集在稻丛基部, 采用现在流行的高浓度、低水量施药方法, 农药难以直接到达褐飞虱聚集部位, 导致农药有效利用率不足0.1%^[5]. 植物保护专家认为, 通过特效农药已不能实现稻飞虱的持续控制^[3]. 其他农作物和园艺蔬菜的害虫防治也面临同样的困局.

提高作物自身抗虫性、发展抗虫绿色品种控制害虫, 从而少用或不用农药, 是农业可持续发展的趋势和时代的需求. 然而, 与作物病害与抗病研究相比, 作物虫害与抗虫研究总体进展缓慢. 一个重要的原因就是害虫饲养、繁殖技术和抗性鉴定技术相对复杂、耗时耗力. 20世纪60年代, 褐飞虱成为全球水稻生产中的第一大害虫, 严重威胁水稻生产安全(图1A, B). 国际水稻

引用格式: 郭建平, 陈荣智, 杜波, 等. 水稻抗褐飞虱基因的发掘与育种利用. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 1326–1334

Guo J P, Chen R Z, Du B, et al. Progress in exploitation and utilization of brown planthopper resistance gene in rice (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 1326–1334, doi: [10.1360/SSV-2022-0044](https://doi.org/10.1360/SSV-2022-0044)

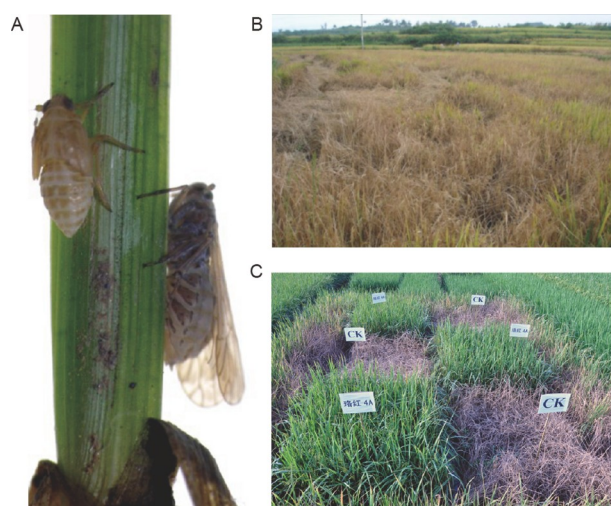


图 1 褐飞虱对水稻的危害及水稻抗褐飞虱育种. A: 褐飞虱在水稻植株上取食. B: 褐飞虱危害造成大田水稻枯死与倒伏(照片由戚华雄老师提供). C: 抗褐飞虱红莲不育系珞红4A的田间抗虫实验. 对照(CK)被褐飞虱危害死亡, 珞红4A(带有*Bph14*和*Bph15*)生长正常(照片由朱仁山老师提供)

Figure 1 BPH harms rice plants and rice plants confer resistance to BPH. A: The brown planthoppers inhabit and feed on the leaf sheath of rice. B: The BPH populations caused rice plants dead and extensive yield losses (Photo provided by Huaxiong Qi). C: Performance of Luohong 4A plants at the maturing stage in the field under BPH infestation. The BPH-resistant rice plants were alive, but the susceptible plants dead (Photo provided by Renshan Zhu). Luohong 4A, *Bph14* and *Bph15* pyramided cytoplasmic male sterile line; CK, BPH-susceptible rice variety

研究所联合日本和印度科学家开始了水稻抗褐飞虱研究^[6,7]. 我国抗褐飞虱研究起步较晚, 至20世纪末我国尚未有抗褐飞虱基因研究论文发表, 抗虫育种进展较慢. 2001年我国发表了多篇水稻抗褐飞虱基因初步定位研究论文^[8-10]. 此后, 抗褐飞虱研究进入了高速发展阶段, 取得了一系列重大突破, 为抗褐飞虱水稻育种和褐飞虱绿色防控奠定了基础.

1 水稻抗褐飞虱基因研究概况

国际水稻研究所于1969年首次发现了水稻抗褐飞虱种质资源Mudgo^[6], 其后鉴定和定位了抗褐飞虱基因*Bph1*, 揭开了水稻抗褐飞虱基因研究的序幕. 半个多世纪来, 研究人员已经在栽培稻和野生稻中筛选出一大批抗虫种质资源. 总体来看, 野生稻种质中抗褐飞虱资源丰富, 热带地区农家种中抗源也较多. 应用分子遗传学方法, 在水稻基因组中定位了40个抗褐飞虱基因, 其中20个来源于野生稻, 20个来源于栽培

稻^[11], 这些基因在染色体上成簇分布. 近10年来, 国际上抗褐飞虱基因研究取得了巨大的进展. 自2009年克隆*Bph14*以来, 应用图位克隆法(map-based cloning)已经分离了多个抗褐飞虱基因(表1).

总体来看, 多数水稻抗褐飞虱基因编码螺旋-螺旋(coiled-coil, CC)、核结合位点(nucleotide binding site, NB)和亮氨酸富集重复(leucine-rich repeat, LRR)蛋白、富含亮氨酸结构域(leucine-rich domain, LRD)蛋白和凝集素类受体激酶(lectin receptor-like kinase, LecRK). 其中, *Bph14*编码一个典型的CC-NB-LRR蛋白^[12]. 水稻第12染色体长臂上定位了8个抗褐飞虱基因(*Bph1*, *Bph2*, *Bph7*, *Bph9*, *Bph10*, *Bph18*, *Bph21*, *Bph26*), 克隆结果表明这8个基因是等位基因, 都编码特异的CC-NB-LRR蛋白^[14,17,18]. 从第4染色体上克隆的*Bph6*, *Bph30*和*Bph40*编码富含亮氨酸结构域LRD的蛋白^[20,21]. *Bph3*来源于斯里兰卡的一份籼稻地方品种Rathu Heenati, 对褐飞虱有广谱抗性. 图位克隆和转基因互补验证结果表明*Bph3*是*OsLecRK1-OsLecRK3*串联的基因簇, 这3个LecRK基因编码定位于细胞膜上的G型凝集素类受体激酶^[15]. 从同一区域克隆的*Bph15*也是一个LecRK基因^[13]. *Bph29*和*Bph32*编码的蛋白比较特殊. 其中*Bph29*是含有一个B3 DNA结合结构域(B3 DNA-binding domain)的蛋白, 定位于细胞核中^[16]. *Bph32*基因编码一个定位于细胞膜的特异的短小一致重复(short consensus repeat, SCR)结构域的蛋白^[19]. 上述研究结果揭示了水稻抗褐飞虱的遗传机制, 为抗褐飞虱育种提供了丰富的基因. 然而, 这些抗褐飞虱基因所介导的抗虫分子机制还需要进一步的深入研究(图2). 下面对部分重要基因做一简要概述.

2 重要抗褐飞虱基因的克隆与抗虫机理研究

2.1 *Bph14*

*Bph14*是国际上克隆的第一个抗褐飞虱基因^[12]. 药用野生稻(*Oryza Officinalis*)高抗多种病虫害. 武汉大学应用远缘杂交和幼胚拯救技术成功获得了药用野生稻与栽培稻的种间杂种. 通过回交、染色体原位杂交、分子标记辅助选择等技术构建了药用野生稻的异源单体附加系和渗入系. 经过反复细致的鉴定, 筛选获得同时抗褐飞虱、抗白背飞虱和抗白叶枯病的材料

表 1 国际上应用图位法克隆的抗褐飞虱基因^{a)}

Table 1 The brown planthopper resistance genes have been isolated via map-based cloning in rice^{a)}

基因名称	编码蛋白	年份	文献信息
<i>Bph14</i>	CC-NB-LRR	2009	[12]
<i>Bph15</i>	LecRK	2013	[13]
<i>Bph26</i> (<i>Bph2</i>)	CC-NB-NB-LRR	2014	[14]
<i>Bph3</i>	3个串联的LecRK	2015	[15]
<i>Bph29</i>	含B3 DNA-binding domain	2015	[16]
<i>Bph9/Bph1/Bph7/Bph10/Bph21</i>	CC-NB-NB-LRR	2016	[17]
<i>Bph18</i>	CC-NB-NB-LRR	2016	[18]
<i>Bph32</i>	含short consensus repeat 结构域	2016	[19]
<i>Bph6</i>	LRD	2018	[20]
<i>Bph30</i>	LRD	2021	[21]
<i>Bph40</i>	LRD	2021	[21]
<i>Bph37</i>	CC-NB	2021	[22]

a) *Bph26*和*Bph2*是同一个基因; *Bph9*, *Bph1*, *Bph7*, *Bph10*和*Bph21*为等位基因

B5. 为鉴定B5中的抗褐飞虱基因及其在染色体上的位置, 将抗虫水稻与明恢63杂交, 构建了明恢63/B5的F₂和重组自交系群体, 进行褐飞虱抗性鉴定和RFLP(restriction fragment length polymorphism)分子标记分析. 最终将药用野生稻来源的两个抗褐飞虱基因分别定位在第3和第4染色体上, 命名为*Bph14*和*Bph15*^[10]. 对台中本地1号(TN1)/B5群体进行独立研究也得到了相同的结果^[23].

为了克隆*Bph14*基因, 从明恢63/B5后代中选择了仅含有*Bph14*的重组自交系RI35, 与TN1杂交构建了F₂作图群体. 分析了3700份F₂植株以及5000份的F₃植株, 将*Bph14*定位在标记SM1和G1318之间34 kb的区段. 通过基因预测、表达分析、候选基因比较和转基因互补功能验证, 最终成功分离了*Bph14*^[12].

*Bph14*基因编码一个CC-NB-LRR受体蛋白. 序列比较分析发现BPH14的CC和NB区在水稻品种中保守, LRR区变异较大. *Bph14*基因受褐飞虱取食诱导, 主要在水稻导管和筛管周围的薄壁细胞表达. 亚细胞定位发现BPH14蛋白定位于细胞质和细胞核中^[12,24].

褐飞虱在*Bph14*水稻上取食, 蜜露量明显降低, 群体生长率仅是取食感性品种的1/5, 存活率也显著降低, 表明*Bph14*具有抗生性, 能降低褐飞虱的取食、生长和存活. 电子探针仪实时记录了褐飞虱在水稻上的取食行为. 数据显示, 褐飞虱在*Bph14*抗性品种中, 总的

非刺探时间以及穿刺时间明显增加, 韧皮部消化时间显著减少. ¹⁴C标记实验也证实了褐飞虱在抗性水稻中取食更少^[25]. 这一结果回答了关于褐飞虱在抗虫品种上究竟是被“饿死”还是“毒死”的问题. 那么是什么原因造成了褐飞虱在抗性品种上的取食时间减少呢? 进一步分析发现, 褐飞虱取食时, *Bph14*抗性材料中的胼胝质化筛板数目远比感虫对照的多. *Bph14*抗性水稻筛板上大量积累胼胝质, 堵塞了筛管, 使褐飞虱不能取食而死亡^[12,25].

褐飞虱取食后, 和野生型对照植株相比, *Bph14*株系的水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)和茉莉酸-异亮氨酸(jasmonic acid-isoleucine, JA-Ile)含量显著提高, SA和JA合成相关基因的表达也显著上调. 因此, BPH14激活了水稻体内的SA和JA信号途径以应对褐飞虱的取食^[12,24].

除*Bph14*外, 随后克隆的*Bph9*及其等位基因*Bph18*, *Bph26*也编码CC-NB-LRR结构类型的蛋白. 同样, 番茄(*Solanum lycopersicum* L.)和甜瓜(*Cucumis melo* L.)里的两个抗虫基因*Mi-1.2*和*Vat*也编码CC-NB-LRR蛋白^[26,27], 说明CC-NB-LRR蛋白在植物对昆虫的抗性中发挥着重要作用. 通过分析BPH14各个结构域的抗虫功能, 发现BPH14的CC和NB结构域及其组合CN的转基因植株均对褐飞虱有抗性. 各个抗性结构域以及BPH14全长蛋白的表达也能够激活SA和JA信号

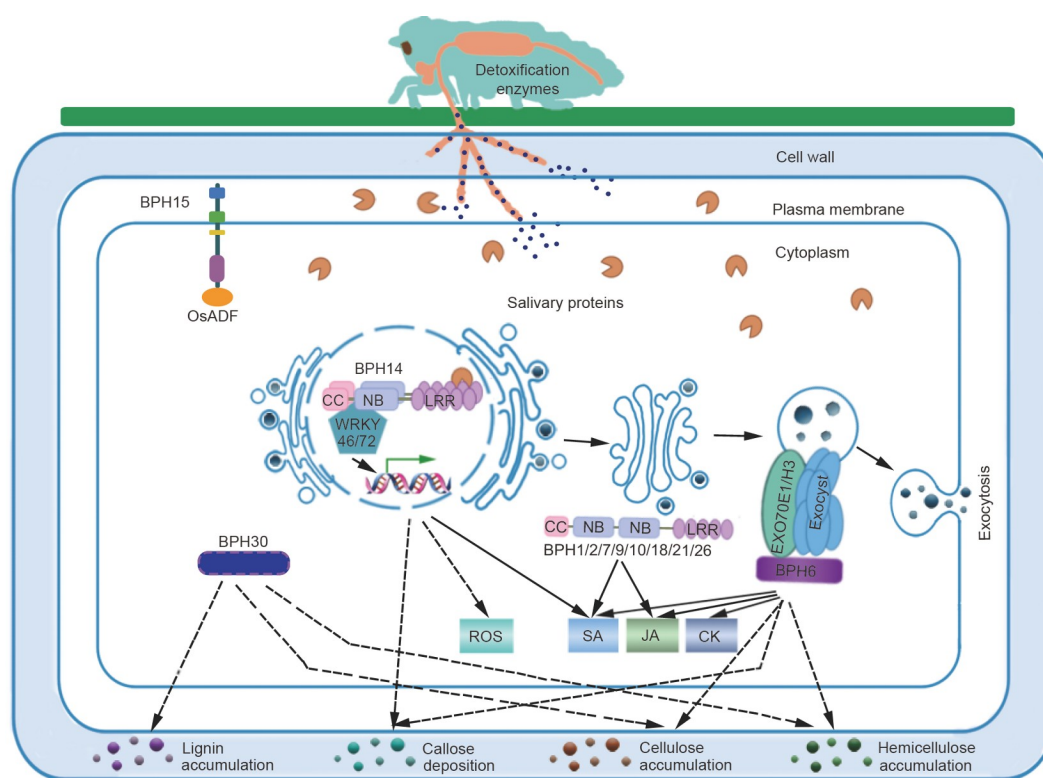


图 2 水稻抗褐飞虱基因 *Bph14*, *Bph15*, *Bph9*, *Bph6*, *Bph30* 的抗虫分子机制(根据Zheng等^[11]修改). 褐飞虱取食水稻时分泌唾液进入水稻组织, 唾液中的某些蛋白被水稻抗褐飞虱基因编码的蛋白识别, 激活抗虫信号通路. 诱导叶鞘组织细胞壁中的纤维素、半纤维素和木质素增加, 以及诱导筛管中胼胝质沉积形成堵塞, 从而抑制褐飞虱取食和生长繁殖

Figure 2 Model of the molecular mechanism of BPH resistance genes *Bph14*, *Bph15*, *Bph9*, *Bph6*, *Bph30* in rice (Modified by Zheng et al.^[11]). The BPH insects can secrete saliva into plants during the feeding process. Molecules such as proteins in insect saliva can be recognized by host resistance protein and then activate the host plant resistance. The process ultimately leads to the accumulation of cellulose, hemicellulose and lignin in cell walls, and callose deposition in sieve tubes, thus leading to prevent BPH sucking sap and performance

途径以及一系列的防御反应, 包括活性氧的产生、胼胝质的沉积以及防御基因的激活^[24]. 同时还发现 BPH14 及其抗性结构域能够自身互作, 形成寡聚体, 推测 BPH14 的寡聚化可能参与到抗性信号传递过程之中. 进一步研究发现, BPH14 能与转录因子 WRKY46 和 WRKY72 互作, 并增强了它们的蛋白稳定性, 促进了受体激酶编码基因 *RLCK281* 和胼胝质合成酶编码基因 *LOC_Os01g67364.1* 的表达, 进而激活水稻防御信号通路, 诱导筛管中积累胼胝质, 降低褐飞虱的取食、生长和存活, 从而产生显著的抗虫性^[24].

2.2 *Bph9* 及其等位基因 *Bph1*, *Bph7*, *Bph10* 和 *Bph21*

研究发现农家种 Pokkali 高抗褐飞虱. 利用 9311/ Pokkali F₂ 群体在水稻第 12 号染色体长臂 SSR 分子标记

RM28486 和 RM28438 之间定位到一个主效抗褐飞虱基因位点, 命名为 *Bph9*^[17]. 为了克隆 *Bph9*, 进一步分析了 3000 个 BC₃F₂ 和 10000 个 BC₅F₂ 单株, 将 *Bph9* 缩小在 68 kb 区间. 通过候选基因分析和转基因互补验证成功克隆了 *Bph9* 基因. *Bph9* 编码一个定位于水稻细胞内膜系统的含有两个 NB 结构域的 CC-NB-NB-LRR 蛋白. *Bph9* 主要在木质部以及筛管周围的薄壁细胞中表达, 并且不受褐飞虱取食诱导. 过量表达 *Bph9* 会导致水稻原生质体细胞死亡. 褐飞虱取食后, *Bph9* 抗性材料中 SA, JA 和 JA-Ile 的含量显著提高. 基因芯片、定量 PCR 和外源激素处理验证了 SA 和 JA 激素在 *Bph9* 抗虫中的作用^[17].

Bph9 位于 12 号染色体的抗褐飞虱基因簇上, 在该区间中有另外 7 个抗褐飞虱基因. 序列分析表明这 8 个基因是同一个基因的复等位形式, 具体可以分成四种

等位型: 即Bph1/9-1, Bph1/9-2, Bph1/9-7, Bph1/9-9. 其中等位型Bph1/9-1包括抗褐飞虱基因*Bph1*, *Bph10*, *Bph18*, *Bph21*; Bph1/9-2包括*Bph2*和*Bph26*; Bph1/9-7包括*Bph7*; Bph1/9-9包括*Bph9*. 抗性鉴定结果显示不同的等位基因具有不一样的抗性谱, 即Bph1/9-1对生物型I和III有抗性, Bph1/9-2对生物型I和II有抗性, Bph1/9-7和Bph1/9-9对生物型I, II, III有抗性, 首次发现抗虫基因的等位变异是水稻应对褐飞虱生物型变异的重要机制^[17]. *Bph9*等位变异和不同抗性谱的研究结果将为抗性等位型挖掘与利用提供参考.

进一步对117份水稻资源的*Bph9*编码区进行了序列分析, 检测到了520个核酸多态性位点和21种单倍型. *Bph9*在籼稻和粳稻间出现明显分化, 粳稻群体中核酸多态性很低, 说明经历了纯化选择. 籼稻群体中核酸多态性较高, 存在明显的平衡选择. 对结构域对应编码区的分析发现LRR区核酸多态性远高于其他结构域($\pi=0.07928$, $\theta=0.05131$), 单倍型之间的差异也主要集中在LRR结构域, 说明LRR结构域可能与褐飞虱生物型的识别相关.

通过对BPH9的各结构域的抗虫和分子功能进行分析, 发现CC结构域是BPH9激活下游信号的结构域, 并且下游信号的激活依赖于CC结构域的自身互作. 建模分析表明CC的97~115氨基酸对CC结构域的自身互作和激活HR功能有直接联系. 序列比对发现两个NB之间存在明显差异, NB2结构完整, 序列更加保守, 在BPH9中负责结合ADP/ATP, 扮演开关和构象变换的作用. 当CC接上其他结构域后, 其激活HR功能受到影响, NB1不影响CC的激活, NB2可以抑制CC的活性, LRR又可以解除NB2对CC的抑制^[28].

2.3 *Bph6*

农家品种Swarnalata是一份广谱抗飞虱的水稻资源. 利用9311/Swarnalata构建的F₂群体, 将Swarnalata中的*Bph6*基因定位在水稻第4染色体长臂的SSR标记RM6997和RM5742之间; *Bph6*基因在F₂和BC₂F₂群体中分别解释77.5%和84.9%的表型变异, 是一个抗虫效应显著的抗虫基因^[29]. 为了克隆*Bph6*, 分析了4300份BC₃F₂植株, 最终将*Bph6*定位在分子标记H和Y9之间18.1 kb的区段. 该区段预测有两个基因, 通过转基因互补验证了其中一个基因是*Bph6*^[20].

*Bph6*编码一个含981个氨基酸的新型蛋白. 亚细

胞定位结果表明BPH6及其9311和日本晴的等位基因编码蛋白均定位于Exocyst复合体中. *Bph6*在水稻的胚根、胚芽、剑叶、叶鞘、茎、幼穗和胚中都有表达, 且不受褐飞虱取食诱导表达. RNA原位杂交结果显示*Bph6*主要在叶鞘和叶片的厚壁组织、维管束鞘和伴胞中表达, 这里正好是褐飞虱取食需要经过的位置^[20].

Exocyst参与了高尔基体后转运囊泡与细胞质膜的识别过程, 在各种生物学过程中起重要作用. Exocyst由8个亚基(Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70和Exo84)组成, BPH6专一性地与其中的OsEXO70亚基互作. 酵母双杂交和免疫共沉淀实验表明BPH6与OsEXO70E1互作. 烟草瞬时转化实验结果表明BPH6可以促进OsEXO70E1和细胞壁蛋白向质外体的分泌. 在Nip-*Bph6*-NIL水稻中抑制*OsEXO70E1*的表达, 植株抗性水平显著下降. 褐飞虱取食两天后, 抗虫水稻9311-*Bph6*-NIL中的厚壁组织、维管束鞘、筛管和伴胞的细胞壁厚度以及胼胝质数目显著高于感虫水稻9311中的, 表明在褐飞虱取食水稻的过程中, *Bph6*可以维持和加强水稻厚壁组织及维管束组织细胞壁的发育, 从而发挥抗虫性^[20].

在植物中exocyst各亚基往往有多个同源基因, 如水稻中编码EXO70的基因有47个. 研究发现EXO70家族另一成员OsEXO70H3也能与BPH6互作. 对褐飞虱取食后的水稻质外体蛋白质组学比较分析, 发现OsSMASL在*OsEXO70H3*的抑制材料中显著下降. 酵母双杂交、Co-IP和BiFC表明OsSMASL与OsEXO70H3和BPH6均互作. BPH6和OsEXO70H3促进了OsSMASL向质外体的分泌. 抑制*OsEXO70H3*和*OsSMASL*的表达, 水稻叶鞘中的木质素和细胞壁组分含量显著下降, 同时也显著降低了*Bph6*植株的褐飞虱抗性. 以上结果表明, BPH6通过和OsEXO70H3互作, 促进OsSMASL的分泌, 调控细胞壁木质素积累来发挥抗虫性^[30].

基因芯片分析表明*Bph6*可以通过调控植物激素的信号通路来保持生长的同时快速应对褐飞虱的威胁. 内源激素含量的检测结果显示在褐飞虱取食的早期(3和6 h), *Bph6*植株中SA和JA-Ile的含量快速上调, 显著高于对照; 在褐飞虱取食后的12和24 h, 细胞分裂素(cytokinin, CK)尤其是反式玉米素(cis-zeatin, cZ)的含量在*Bph6*材料中显著上调. 外源激素和抑制剂处理也证实了SA, JA和CK可以正调控水稻抗虫性. 这是首次发现CK在水稻抗虫中的功能. 进一步分析发现褐飞虱取食和CK处

理后, *Bph6*材料中萜烯类植保素的含量和萜烯类植保素合成基因的表达均显著上调, 显著高于对照^[20].

Zheng等人^[31]发现, 当褐飞虱取食含*Bph6*的抗性水稻后, 褐飞虱若虫及成虫都表现出虫增重降低、生长缓慢且体型瘦小的现象. 进一步观察发现这些褐飞虱体内的脂肪体密度变低, 脂滴变小, 且脂质含量降低, 表明植物宿主对褐飞虱的抗性能够显著影响褐飞虱的脂质代谢以及脂肪体的脂质沉积. 通过超高效液相色谱-三重四极杆质谱(UHPLC-MS/MS)技术, 发现褐飞虱取食含*Bph6*抗性水稻后, 可以加速体内甘油三酯的动员, 使其向磷脂酰胆碱和双半乳糖基二酰基甘油转化. 转录组和定量PCR结果也证实了取食含*Bph6*抗性水稻后, 褐飞虱体内的甘油脂类和甘油磷脂类转化相关基因、脂肪酸去饱和酶基因以及脂肪酸伸长相关基因的表达水平发生了不同程度的变化. 转录组分析还表明, 含*Bph6*抗性水稻抑制了褐飞虱中生长及发育相关基因的表达. 这些基因的下调表达严重阻碍褐飞虱的生长和发育, 最终导致褐飞虱死亡.

为了研究*Bph6*在自然群体中的变异, 分析了地理分布范围广的148份栽培稻和32份野生稻, *Bph6*的等位基因中有很高的核苷酸多态性, 共发现了448个多态性位点, 鉴定出了80种单倍型. *Bph6*的变异分成两种主要的分支, 命名为Clusters I和II: Clusters I主要包括野生稻和栽培稻的籼稻, Clusters II主要为粳稻. 在180份种质资源中, 有4份栽培稻和2份野生稻材料的序列与Swarnalata的*Bph6*序列一致并且高抗褐飞虱, 6份材料都分布于亚洲热带地区, 上述结果表明*Bph6*基因起源于野生稻并保留在亚洲热带地区的籼稻品种中^[20]. 最近, 我们对1520份全球水稻核心种质的抗虫性进行了分析, 进一步揭示了来自于野生稻*O. nivara*的基因组片段与位点对栽培稻抗虫性的贡献^[22].

2.4 *Bph30*

在对水稻资源大规模抗虫性鉴定中, 发现农家品种AC1613高抗褐飞虱. 构建了9311/AC1613的F₂定位群体, 利用褐飞虱增重作为水稻抗虫性指标, 将来自AC1613的抗褐飞虱基因定位在4号染色体短臂分子标记RM16278和RM16425的区段, 并命名为*Bph30*^[32]. 为了克隆*Bph30*, Shi等人^[21]继续筛选重组单株, 将*Bph30*定位在4号染色体短臂分子标记SSR-28和SSR-69的22.4 kb区间. 通过基因预测和转基因功能验证, 成功克

隆了*Bph30*基因. BPH30蛋白定位于内质网、液泡膜、囊泡. *Bph30*基因在苗期和成熟期的叶鞘和叶片中均有表达, 不受褐飞虱取食诱导.

*Bph30*基因ORF全长3246 bp, 编码1082个氨基酸, 不含有已知功能的保守结构域. BPH30蛋白只含有两个LRDs, 但不同于已报道的LRR结构, 属于一种新型的抗性蛋白. 通过同源基因搜索、蛋白结构预测、全基因组关联分析结合转基因功能验证, 在抗性水稻资源SE232, SE67和C334中分离了*Bph30*家族另一个抗褐飞虱基因, 命名为*Bph40*. 后续机理分析表明*Bph40*对褐飞虱的抗性与*Bph30*类似, 也与厚壁组织相关^[21].

褐飞虱是一种典型的刺吸式昆虫, 通过口针专一性吸食水稻韧皮部汁液. 由于韧皮部深埋在水稻叶鞘组织之内, 褐飞虱如何准确找到口针钻探位点、进而找到筛管吸食, 一直是未解之谜. 显微观察发现, 栽培稻叶鞘表面由粗糙和光滑的重复结构单元组成. 光滑的结构单元是长形细胞带, 粗糙的结构单元是硅栓带、气孔带和乳突带. 进一步观察发现叶鞘表面结构与其内部组织有明确的对应关系: 长形细胞带下方是厚壁组织, 继续向内是维管束; 而乳突带和气孔带下方是薄壁细胞, 再向内是气腔. 超过88%褐飞虱取食点分布在长形细胞带. 原子力显微镜检测发现长形细胞带表面硬度远远低于乳突带的表面硬度, 表明褐飞虱口针选择水稻叶鞘表面光滑且柔软的长形细胞带部位刺入水稻组织, 从而到达维管束韧皮部^[21].

RNA原位杂交发现, *Bph30*在长形细胞带之内的厚壁细胞中强表达. 叶鞘厚壁组织是褐飞虱口针刺入韧皮部的必经之路. 分离了叶鞘厚壁组织, 对其细胞壁成分进行测定, 发现*Bph30*材料中叶鞘厚壁组织细胞壁的纤维素和半纤维素含量高于9311, 并且褐飞虱取食前后也没有显著变化. 褐飞虱取食前后, *Bph30*近等基因系厚壁组织细胞壁的硬度与厚壁组织的厚度显著大于9311. 观察统计显示, *Bph30*近等基因系中穿过厚壁组织和到达韧皮部的口针鞘显著减少, 表明其厚壁组织拦截了褐飞虱口器的穿刺. 在*Bph30*转基因株系和近等基因系上, 褐飞虱的取食量与增重显著减少, 褐飞虱存活率和褐飞虱数目也显著降低^[21]. 综上所述, 针对褐飞虱特异性选取叶鞘表面光滑柔软区域刺入取食的特性, 水稻针锋相对地进化出了一种新的抗性机制-厚壁组织抗性. 具体来说, *Bph30*在厚壁组织高表达, 增加厚壁组织细胞壁的硬度和厚度, 强化的厚壁

组织形成了一道坚固的屏障, 阻止褐飞虱口器穿刺到达韧皮部取食而发挥抗褐飞虱的作用。

3 抗褐飞虱基因的育种利用

植物对害虫的抗性机制在生理层面可分为排趋性(antixenosis)、抗生性(antibiosis)和耐受性(tolerance)。大量研究结果表明, 水稻抗褐飞虱基因对褐飞虱具有排趋性和抗生性。在寄主选择实验中, 褐飞虱优先选择感虫水稻而不选择带有抗褐飞虱基因的水稻。在感虫水稻上, 褐飞虱不中断、长时间的取食对水稻造成严重伤害, 直至导致植株死亡。在带有单个抗褐飞虱基因*Bph14*, *Bph15*, *Bph6*和*Bph9*的水稻植株上, 由于抗生性的作用, 褐飞虱取食受到抑制, 取食量减少, 体重增加小甚至降低, 死亡率上升, 抗虫效果显著; 双基因聚合如*Bph14+Bph15*, *Bph6+Bph9*, 则产生更强的抗生性和排趋性^[33,34]。单个抗褐飞虱基因在苗期和成熟期对褐飞虱表现为高抗, 对农艺产量性状无不良影响^[20,21,24,34]。田间试验结果表明, 与普通水稻田块相比, 种植*Bph14+Bph15*水稻田块中褐飞虱数量显著减少, 虫口密度下降了86%以上, 有很好的防虫治虫效果^[35,36]。

一个可喜的现象是, 已克隆的抗褐飞虱基因具有广谱抗虫性, 除了抗褐飞虱多种生物型外, 带有*Bph14*, *Bph15*, *Bph6*或*Bph30*的水稻高抗白背飞虱, 利用这些基因培育的水稻品种同时抗褐飞虱和白背飞虱两种害虫。*Bph6*和*Bph30*是完全显性基因, 杂交后代杂合基因型对褐飞虱具有与纯合基因型相同的抗虫性, 在水稻杂交育种中应用更为便利。

水稻褐飞虱之所以成为水稻生产中的第一大害虫, 主要是水稻抗褐飞虱品种匮乏。水稻抗飞虱基因蕴藏在野生稻或农家种基因组中, 难以利用。特别是水稻育种中抗虫材料的鉴定与选择, 繁琐复杂, 普通育种研究单位均难以开展。抗褐飞虱基因克隆成功后, 使得育种技术难题迎刃而解。通过回交育种将抗褐飞虱基因转育到9311等现代品种中, 创制了B5和珞扬69等抗虫新种质, 提供给育种家作为抗虫基因供体。根据抗褐飞虱基因序列设计功能分子标记, 在水稻育种后代中通过简单PCR扩增, 就可以筛选出带有抗褐飞虱基因的

水稻材料。抗褐飞虱育种变得准确、简单、易行, 一般育种单位均能开展。以抗褐飞虱新种质为基因供体, 通过分子标记辅助选择和抗虫性鉴定(图1C), 我国已经育成了一批抗褐飞虱水稻新品种通过审定并在生产中应用^[37], 2021年隆平高科的玮两优7713(*Bph6+Bph9*)、武汉大学的易两优311(*Bph14+Bph15*)、华中农业大学的华两优2171(*Bph14+Bph15*)等双基因聚合的高抗褐飞虱品种通过了国家和省级审定。抗褐飞虱新品种在生产中应用推广, 为稻飞虱这一重大农业害虫的绿色防控奠定了品种基础。

4 展望

第一次绿色革命后, 褐飞虱成为亚洲各国水稻生产中的首要虫害, 因而抗虫基因研究和抗虫育种受到高度重视。近年来, 随着水稻抗褐飞虱基因克隆成功和抗褐飞虱分子育种技术的突破, 抗褐飞虱基因育种正在加速普及。特别是目前已经克隆了17个不同类型的抗褐飞虱基因, 为培育持久抗虫品种提供了基因资源。

然而, 生产中应用的抗褐飞虱水稻品种还不是很多。其主要原因是抗虫性研究与育种涉及到抗虫性鉴定与筛选, 遗传育种研究需要大规模饲养褐飞虱及其收集、性别和虫龄辨认、计数等专门技术, 因而限制了抗褐飞虱基因的发掘与育种应用的发展。随着抗褐飞虱基因的成功克隆, 加强功能性分子标记的开发将会提高抗虫材料的鉴定和筛选效率, 显著促进抗虫育种的发展。近年来, 我国水稻病害得到了有效控制, 其成功经验是在品种审定时实行抗病性一票否决, 只有抗病性达标的品种才能推广。期望国家继续大力支持优异抗稻飞虱基因的发掘与利用研究, 在品种审定中强化抗虫性的检测鉴定, 推动抗飞虱品种的推广普及。

在世界人口不断增加、粮食需求不断增长、生态环境压力加大的形势下, 害虫的防治与控制仍是粮食、经济、蔬菜等作物生产中的技术难题。以水稻-褐飞虱为模式体系的研究成果对其他农作物害虫防治研究具有借鉴作用。深入研究与揭示植物-害虫互作分子机理, 发掘抗虫基因, 培育抗虫作物品种, 实现害虫的绿色防控, 将造福于人类子孙后代, 具有光明的前景。

参考文献

- 1 Liu W C, Liu Z D, Huang C, et al. Statistics and analysis of crop yield losses caused by main diseases and insect pests in recent 10 years (in

- Chinese). *Plant Prot*, 2016, 42: 1–9 [刘万才, 刘振东, 黄冲, 等. 近10年农作物主要病虫害发生危害情况的统计和分析. *植物保护*, 2016, 42: 1–9]
- 2 Wen Y, Liu Z, Bao H, et al. Imidacloprid resistance and its mechanisms in field populations of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål in China. *Pesticide Biochem Physiol*, 2009, 94: 36–42
- 3 Lou Y G, Cheng J A. Basic research on the outbreak mechanism and sustainable management of rice planthoppers (in Chinese). *Chin J Appl Entomol*, 2011, 48: 231–238 [娄永根, 程家安. 稻飞虱灾变机理及可持续治理的基础研究. *应用昆虫学报*, 2011, 48: 231–238]
- 4 Tanaka K, Endo S, Kazano H. Toxicity of insecticides to predators of rice planthoppers: spiders, the mirid bug and the dryinid wasp. *Appl Entomol Zool*, 2000, 35: 177–187
- 5 Gu Z Y, Xu D J, Xu G C. Effects of dose and distribution of pesticide droplets on pests control efficiency and its relationship with pesticide losses (in Chinese). *Chin J Pesti Sci*, 2020, 22: 193–204 [顾中言, 徐德进, 徐广春. 论农药雾滴的剂量及分布对害虫防治效果的影响及其与农药损失的关系. *农药学报*, 2020, 22: 193–204]
- 6 Pathak M D, Cheng C H, Fortuno M E. Resistance to *Nephotettix impicticeps* and *Nilaparvata lugens* in varieties of rice. *Nature*, 1969, 223: 502–504
- 7 Athwal D S, Pathak M D, Bacalangco E H, et al. Genetics of resistance to brown planthoppers and green leafhoppers in *Oryza sativa* L. *Crop Sci*, 1971, 11: 747–750
- 8 Wang B N, Huang Z, Shui L H, et al. Mapping of two new brown planthopper resistance genes from wild rice (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2001, 46: 46–49 [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标记定位. *科学通报*, 2001, 46: 46–49]
- 9 Liu G Q, Yan H H, Fu Q, et al. Mapping of a new gene for brown planthopper resistance in cultivated rice introgressed from *Oryza eichingeri* (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2001, 9: 738–742 [刘国庆, 颜辉煌, 傅强, 等. 栽培稻的紧穗野生稻抗褐飞虱主效基因的遗传定位. *科学通报*, 2001, 9: 738–742]
- 10 Huang Z, He G, Shu L, et al. Identification and mapping of two brown planthopper resistance genes in rice. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 929–934
- 11 Zheng X, Zhu L, He G. Genetic and molecular understanding of host rice resistance and *Nilaparvata lugens* adaptation. *Curr Opin Insect Sci*, 2021, 45: 14–20
- 12 Du B, Zhang W, Liu B, et al. Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 22163–22168
- 13 Cheng X, Wu Y, Guo J, et al. A rice lectin receptor-like kinase that is involved in innate immune responses also contributes to seed germination. *Plant J*, 2013, 76: 687–698
- 14 Tamura Y, Hattori M, Yoshioka H, et al. Map-based cloning and characterization of a brown planthopper resistance gene *BPH26* from *Oryza sativa* L. ssp. *indica* cultivar ADR52. *Sci Rep*, 2014, 4: 5872
- 15 Liu Y, Wu H, Chen H, et al. A gene cluster encoding lectin receptor kinases confers broad-spectrum and durable insect resistance in rice. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 301–305
- 16 Wang Y, Cao L, Zhang Y, et al. Map-based cloning and characterization of *BPH29*, a B3 domain-containing recessive gene conferring brown planthopper resistance in rice. *J Exp Bot*, 2015, 66: 6035–6045
- 17 Zhao Y, Huang J, Wang Z, et al. Allelic diversity in an NLR gene *BPH9* enables rice to combat planthopper variation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 12850–12855
- 18 Ji H, Kim S R, Kim Y H, et al. Map-based cloning and characterization of the *BPH18* gene from wild rice conferring resistance to brown planthopper (BPH) insect pest. *Sci Rep*, 2016, 6: 34376
- 19 Ren J, Gao F, Wu X, et al. *Bph32*, a novel gene encoding an unknown SCR domain-containing protein, confers resistance against the brown planthopper in rice. *Sci Rep*, 2016, 6: 37645
- 20 Guo J, Xu C, Wu D, et al. *Bph6* encodes an exocyst-localized protein and confers broad resistance to planthoppers in rice. *Nat Genet*, 2018, 50: 297–306
- 21 Shi S, Wang H, Nie L, et al. *Bph30* confers resistance to brown planthopper by fortifying sclerenchyma in rice leaf sheaths. *Mol Plant*, 2021, 14: 1714–1732
- 22 Zhou C, Zhang Q, Chen Y, et al. Balancing selection and wild gene pool contribute to resistance in global rice germplasm against planthopper. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63: 1695–1711
- 23 Shi Z, Ren X, Weng Q, et al. Construction of a genomic library from a brown planthopper-resistant rice line using a transformation-competent vector and identification of clones spanning the *Qbp1* locus. *Plant Sci*, 2003, 165: 879–885
- 24 Hu L, Wu Y, Wu D, et al. The coiled-coil and nucleotide binding domains of BROWN PLANTHOPPER RESISTANCE14 function in signaling

- and resistance against planthopper in rice. *Plant Cell*, 2017, 29: 3157–3185
- 25 Hao P, Liu C, Wang Y, et al. Herbivore-induced callose deposition on the sieve plates of rice: an important mechanism for host resistance. *Plant Physiol*, 2008, 146: 1810–1820
- 26 Dogimont C, Chovelon V, Pauquet J, et al. The *Vat* locus encodes for a CC-NBS-LRR protein that confers resistance to *Aphis gossypii* infestation and *A. gossypii*-mediated virus resistance. *Plant J*, 2014, 80: 993–1004
- 27 Rossi M, Goggin F L, Milligan S B, et al. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 9750–9754
- 28 Wang Z, Huang J, Nie L, et al. Molecular and functional analysis of a brown planthopper resistance protein with two nucleotide-binding site domains. *J Exp Bot*, 2021, 72: 2657–2671
- 29 Qiu Y, Guo J, Jing S, et al. High-resolution mapping of the brown planthopper resistance gene *Bph6* in rice and characterizing its resistance in the 9311 and Nipponbare near isogenic backgrounds. *Theor Appl Genet*, 2010, 121, 1601–1611
- 30 Wu D, Guo J, Zhang Q, et al. Necessity of rice resistance to planthoppers for OsEXO70H3 regulating SAMSL excretion and lignin deposition in cell walls. *New Phytol*, 2022, 234: 1031–1046
- 31 Zheng X, Xin Y, Peng Y, et al. Lipidomic analyses reveal enhanced lipolysis in planthoppers feeding on resistant host plants. *Sci China Life Sci*, 2021, 64: 1502–1521
- 32 Wang H, Shi S, Guo Q, et al. High-resolution mapping of a gene conferring strong antibiosis to brown planthopper and developing resistant near-isogenic lines in 9311 background. *Mol Breeding*, 2018, 38: 107
- 33 Hu J, Li X, Wu C, et al. Pyramiding and evaluation of the brown planthopper resistance genes *Bph14* and *Bph15* in hybrid rice. *Mol Breeding*, 2012, 29: 61–69
- 34 Wang Y, Jiang W, Liu H, et al. Marker assisted pyramiding of *Bph6* and *Bph9* into elite restorer line 93–11 and development of functional marker for *Bph9*. *Rice*, 2017, 10: 51
- 35 Hu J, Cheng M, Gao G, et al. Pyramiding and evaluation of three dominant brown planthopper resistance genes in the elite *indica* rice 9311 and its hybrids. *Pest Manag Sci*, 2013, 69: 802–808
- 36 Xiao C, Hu J, Ao Y T, et al. Development and evaluation of near-isogenic lines for brown planthopper resistance in rice cv. 9311. *Sci Rep*, 2016, 6: 38159
- 37 Du B, Chen R, Guo J, et al. Current understanding of the genomic, genetic, and molecular control of insect resistance in rice. *Mol Breeding*, 2020, 40: 24

Progress in exploitation and utilization of brown planthopper resistance gene in rice

GUO JianPing, CHEN RongZhi, DU Bo, ZHU Lili & HE GuangCun^{*}

College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

Rice is the most important food crop globally and a model species for basic biological research. Brown planthopper (BPH) is one of the major insect pests of rice. In the past decades, scientists have explored the BPH resistance gene from rice germplasm and revealed the molecular mechanism underlying the host plant resistance of rice to BPH. Research results have promoted the development of BPH-resistant rice varieties and their release in rice production. This review briefly introduces the research progress on brown planthopper resistance gene discovery, mechanism analysis, germplasm innovation, and utilization in rice breeding programs to help readers understand the mystery of plant resistance against insects and the practical significance of insect resistance research in plants.

plant-insect interaction, BPH resistance gene, map-based cloning, germplasm, breeding

doi: [10.1360/SSV-2022-0044](https://doi.org/10.1360/SSV-2022-0044)