环境昆虫学报 2021，43（5）：1210－1219
Journal of Environmental Entomology
http：//hjkcxb. alljournals. net
doi：10. 3969/j. issn. 1674－0858. 2021. 05. 15



宋旭明，王谆静，麦迪乃·萨比尔，廖志洪，邓建宇，朱旭东，周国鑫．水稻 *OsLecRK1* 基因介导的抗褐飞虱功能分析［J］．环境昆虫学报，2021，43（5）：1210－1219．

水稻 *OsLecRK1* 基因介导的抗褐飞虱功能分析

宋旭明[1*]，王谆静[1*]，麦迪乃·萨比尔[1]，廖志洪[1]，
邓建宇[1]，朱旭东[2**]，周国鑫[1**]
（1. 浙江农林大学现代农学院，杭州 311300；2. 中国水稻研究所，杭州 310006）

摘要：褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål 是对水稻最具破坏性的害虫之一，*OsLecRK1* 是水稻 *Bph3* 基因簇中对褐飞虱抗性贡献最大的基因。本文对 RHTd（含 *Bph3*）等材料进行了褐飞虱抗性评价，克隆并构建了 *OsLecRK1* 过量表达突变体水稻，利用该突变体分析了 *OsLecRK1* 基因对褐飞虱若虫存活率、若虫发育历期等生物学参数的影响。结果表明，含 *Bph3* 基因水稻 RHTd 对褐飞虱的抗性明显地强于含 *Bph1* 基因水稻 Mudgo 和 *bph2* 基因水稻 ASD7，RHTd 水稻的褐飞虱受害指数仅为 Mudgo 和 ASD7 水稻的 53. 5% 和 24. 1%。过量表达 *OsLecRK1* 基因能显著地增加水稻对褐飞虱的驱避性和抗生性，褐飞虱雌成虫偏好于在野生型水稻上产卵；突变体水稻上的褐飞虱若虫存活率显著地降低，仅为野生型水稻上若虫存活率的 75. 2% ～81. 8%，且若虫发育历期显著地延长，羽化率和初羽化雌成虫体重均显著地降低；此外，褐飞虱在突变体水稻上取食分泌的蜜露量只有野生型上的 40. 3% ～60. 9%，褐飞虱单雌产卵量只为野生型 51% ～61. 2%，卵孵化率只有野生型的 52. 2% ～56. 7%，均显著地减少。结果表明，含 *Bph3* 基因水稻 RHTd 对褐飞虱的抗性明显地高于分别含 *Bph1*、*bph2* 的水稻 Mudgo 和 ASD7；水稻 *Bph3* 基因座的 *OsLecRK1* 单个基因过量表达即可显著增加水稻对褐飞虱的抗性，*OsLecRK1* 协同影响褐飞虱的多个生物学参数降低褐飞虱的适合度。

关键词：水稻；褐飞虱；*Bph3*；*OsRLKs*；抗虫性
中图分类号：Q963；S433　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674－0858（2021）05－1210－10

Functional analysis of rice *OsLecRK1* in resistance to rice brown planthopper

SONG Xu-Ming[1*], WANG Zhun-Jing[1*], MAIDINAI Sabier[1], LIAO Zhi-Hong[1], DENG Jian-Yu[1], ZHU Xu-Dong[2**], ZHOU Guo-Xin[1**] (1. School of Agriculture and Food Science, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China; 2. China National Rice Research Institute, Hangzhou 311401, China)

Abstract: Rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål is one of the most destructive pests to rice. *OsLecRK1* is the most resistant gene among the four resistance genes of *Bph3* locus. In this paper, the resistance of RHTd (containning *Bph3*) and other rice materials to brown planthopper were evaluated, and the effect of rice *OsLecRK1* gene on nymph survival rate, nymphal development period and other biological parameters of brown planthopper was analyzed using *OsLecRK1* overexpressing rice mutants. The results

基金项目：国家自然科学基金（32072508）；浙江省项目基金（LY19C140005，2017A22004）；浙江农林大学校发展基金（2034070001）
* 共同第一作者：宋旭明，男，硕士研究生，研究方向为农业昆虫与害虫防治，E－mail：891354525@qq. com；王谆静，女，硕士研究生，研究方向为水稻害虫绿色防控研究，E－mail：286941482@qq. com
** 通信作者 Authors for correspondence：朱旭东，男，博士，副教授，研究方向为功能基因组学，E－mail：ricezxd@126. com；周国鑫，男，博士，教授，研究方向为植物昆虫互作、化学生态学和功能基因组学，E－mail：gxzhou@zafu. edu. cn
收稿日期 Received：2020－06－30；接受日期 Accepted：2020－08－26

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

showed that the resistance of RHTd with *Bph*3 gene to BPH was significantly higher than that of Mudgo with *Bph1* gene and ASD7 with *bph2* gene. The damage index of brown planthopper of RHTd was only 53.5% and 24.1% of that in Mudgo and ASD7 respectively. Overexpression of *OsLecRK1* gene in rice can significantly increase the repellency and antibiosis of rice to BPH. Female adults of BPH preferred to feed and lay eggs on wild-type rice compared to on mutants. The survival rate of BPH nymphs on mutant rice plants was significantly reduced, only 75.2% ~81.8% of that on wild-type rice. The developmental period of nymphs was significantly prolonged, and the emergence rate and newly emerged BPH female adults were significantly decreased. In addition, the amount of honeydew secreted by BPH on mutant rice plants was only 40.3% ~60.9% of these on the wild type, the number of eggs per BPH female adult was only 51% ~61.2% of that on the wild type, and the hatchability of eggs was only 52.2% ~56.7% of that on the wild type. It indicated that the resistance of rice RHTd containing *Bph3* gene to BPH was significantly higher than that of Mudgo and ASD7 containing *Bph1* and *bph2* gene respectively, only overexpression *OsLecRK1* of *Bph3* locus could significantly increase rice resistance to BPH, and *OsLecRK1* reduced the fitness of BPH by regulating multiple biological parameters of BPH.

Key words: Rice; brown planthopper; *Bph3*; Os*RLKs*; insect resistance

水稻是亚洲地区的主要粮食作物，我国半数以上人口以稻米为主食。自 20 世纪 70 年代以来，我国开始大面积推广矮秆、多分蘖和具有耐肥特征的水稻品种，由于化学农药的不合理使用，导致近几十年来褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål 频频爆发，严重威胁我国粮食安全（陈建明等，2003；娄永根和程家安，2011）。抗虫水稻品种培育是褐飞虱综合治理最有效且经济的措施之一，各国科研工作者一直致力于水稻抗褐飞虱基因的发掘和利用（刘裕强，2009）。目前，已从抗性栽培稻和野生稻等资源中鉴定和定位了至少 35 个抗褐飞虱基因或 QTL（Quantitative trait loci），包括 *Bph1*、*bph2*、*Bph3*、*Bph9*、*Bph14* 等（Horgan *et al.*，2015；Du *et al.*，2020）。

水稻抗褐飞虱基因 *Bph3*，具有广谱的褐飞虱抗性和持久性，已广泛用于抗褐飞虱水稻品种的培育（Du *et al.*，2020）。*Bph3* 基因簇包含 4 个凝集素类受体蛋白激酶（Lectin receptor-like kinases，LecRK）基因（*OsLecRK*1-4），其中 *OsLecRK*1-3 对水稻褐飞虱的抗性具有累加作用，据估算单由 *OsLecRK1* 贡献的抗性占一半左右（吴寒，2013；Liu *et al.*，2015）。凝集素类受体激酶属于蛋白激酶的一个亚家族，一般由细胞外凝集素结构域、跨膜结构域和胞内激酶结构域组成（He *et al.*，2017）。LecRK 在应对生物胁迫和非生物胁迫中都发挥着重要作用，参与了植物对真菌、细菌和植食性昆虫为害的生物胁迫防御反应（Zhang *et al.*，2017）。通过胞外结构域识别信号分子，通过磷酸化、去磷酸化等方式转导防御信号，调控下游靶蛋白，影响植物免疫诱导反应（朱巍巍等，2018）。Liu 等（2015）将 *OsLecRK*1-3 基因簇导入褐飞虱易感水稻品种中，显著增强了水稻对褐飞虱的抗性，同时增加了水稻对白背飞虱 *Sogatella furcifera*（Horváth）的抗性。另有报道水稻中过量表达G 型 *LecRK* 基因，增加水稻对褐飞虱驱避性（吴艳，2017）。水稻 *Pi-d2* 是一种 B 型 *LecRK* 基因，参与了对稻瘟病菌的抗性反应（Chen *et al.*，2006）。拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 *LecRK-IX. 1* 和 *LecRK-IX. 2* 基因突变降低植物对疫霉菌的抵抗能力，且双突变会加剧感病表型；相反过表达 *LecRK-IX. 1* 和 *LecRK-IX. 2* 基因能增强植物的抗病性，诱导自发性细胞程序性死亡（Wang *et al.*，2015）。在野生烟草 *Nicotiana attenuata* 中，*LecRK1* 基因在烟草对烟草天蛾 *Manduca sexta* 诱导防御反应中起重要作用，*LecRK1* 突变体烟草相对于野生型烟草，昆虫诱导积累的胰蛋白酶抑制剂和苏氨酸脱氨酶在突变体植株中的含量明显减少（Gilardoni *et al.*，2011）。可见，*LecRK* 家族基因在植物诱导免疫反应中起重要作用。

本文比较了水稻 RHTd（含 *Bph3*）、Mudgo（含 *Bph1*）和 ASD7（含 *bph2*）等对褐飞虱的抗性，克隆及构建了 *OsLecRK1* 的过量表达突变体水稻，从反向遗传学角度明确了 *OsLecRK1* 可影响褐飞虱的多个生物学参数，该结果有望增加对水稻 *Bph3* 基因抗褐飞虱机制的了解，为水稻抗褐飞虱水稻培育提供参考。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻：抗褐飞虱水稻品种 RHTd（含 *Bph3*）、Mudgo（含 *Bph1*）、ASD7（含 *bph2*），以及日本晴和 TN1（Taichung Native 1）由中国水稻研究所提供。*OsLecRK1* 基因过量表达水稻突变体株系 *TS17*、*TS19*、*TS21*，由本实验室构建。种子于温控培养箱催芽后，在温室中用水稻培养液培养（温度 27℃ ±2℃；相对湿度 70% ~80%；光照 L∶D = 16∶8）。

供试昆虫：褐飞虱（Rice brown planthopper，BPH）生物型 I 和 II 混合种群采集于浙江农林大学平山水稻田，以感虫品种 TN1 幼苗饲养于人工气候箱中（温度 27℃ ±2℃；相对湿度 70% ~80%；光照 L∶D = 12∶12），室内已至少繁殖 10 代以上。

试剂及仪器：RNA 提取试剂盒 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 和反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit（Perfect Real Time）（购自宝日医生物技术（北京）有限公司）；割胶回收试剂盒 AxyprepTM DNA Gel Extraction Kit（爱思进生物技术（杭州）有限公司）；克隆载体 *pEASY*-Blunt Zero（北京全式金公司）；BIO-RAD PCR 仪（美国 BIO-RAD 公司）；AL104 电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；RXZ-380B 智能型人工气候箱（宁波江南仪器厂）；Motic 双目解剖镜（麦克奥迪实业集团有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 *OsLecRK1* 基因克隆

RHTd 水稻叶片经液氮研磨后，取 100 mg 采用 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit（TaKaRa）试剂盒提取总 RNA。总 RNA 经电泳及分光光度计检测后，由 PrimeScript™ RT Reagent Kit（Perfect Real Time）试剂盒（TaKaRa）将 mRNA 反转录成 cDNA，具体实验步骤参照产品说明书。

根据 NCBI 的 Rathu Heenati 水稻 *OsLecRK1* 基因（KF748957）序列号，利用 Primer Premier 5.0 软件设计 *OsLecRK1* 基因特异性引物 OsLecRK1-F：5′-ATGGTTGCTCTGCTACTCTTC-3′和 OsLecRK1-R：5′-CTATGGAAGTGAGCTGATGAAG-3′。PCR 反应在 BIO-RAD PCR 扩增仪中进行，反应程序如下：98℃预变性 10 s，98℃变性 10 s，60℃退火 5 s，72 ℃延伸 2 min 30 s，共进行 35 次循环后，72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离，利用 AxyprepTM DNA Gel Extraction Kit（Axygen）试剂盒对 PCR 产物回收纯化。纯化的 PCR 产物连入 *pEASY*-Blunt Zero 载体，阳性克隆送南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序鉴定。

1.2.2 *OsLecRK1* 过量表达突变体水稻构建

重组连接法将目的基因连接入植物表达载体 p1301-35SN，获得重组质粒 p13SN-OsLecRK1 转入农杆菌 EHA105。利用含 p13SN-OsLecRK1 的农杆菌工程菌通过本实验室建立的水稻遗传转化平台获得 T_0 转基因植株，对 T_1、T_2 转基因植株进行潮霉素筛选和 PCR 鉴定，得到 3 个 *OsLecRK1* 基因过量表达突变体纯合株系 *TS17*，*TS19* 和 *TS21*。农杆菌介导的水稻遗传转化和纯合转基因突变体筛选参照（周国鑫，2009）。

1.2.3 水稻千粒重和株高测定

随机选取饱满的野生型、*OsLecRK1* 基因过量表达株系种子各 100 粒，在万分之一分析天平上称重，重复 3 次。随机选取野生型水稻和过量表达突变体水稻植株，测量水稻茎秆基部到最高叶片中间的高度，每处理重复 10 次。

1.2.4 水稻对褐飞虱抗性评价

单株种植 3 叶期水稻，罩以直径 5 cm、高 50 cm 圆筒形塑料罩，每株接入 3 ~4 龄褐飞虱若虫 15 头，每天统计各水稻上的褐飞虱数量，并进行受害等级评价（刘裕强，2009）。直至 90% 的感虫水稻 TN1 死亡，以未接虫水稻为对照，各处理重复 10 次。实验结束后，收集各处理上的褐飞虱在 70℃烘箱放置 48 h 后称量干重。整个水稻植株用水冲洗干净，放置 70 ℃烘箱 48 h 后称量干重。利用功能损失指数（Functional plant loss index，FPLI）法评价各品种水稻对褐飞虱的抗性，以褐飞虱干重（x）为横坐标，FPLI 值（y）为纵坐标作散点图，获得的 x ~ y 回归线与褐飞虱平均干重的截线（$\bar{X}$，y）将散点图分为抗生、耐害、兼抗和敏感 4 个部分（Panda *et al.*，1983）。*FPLI* 值计算如下：

FPLI = 100 -（接虫植株的干重/未接虫植株的干重）×（1 - 危害级别/9）×100

1.2.5 褐飞虱取食选择和产卵选择性测定

突变体水稻和野生型水稻各 1 株，用海绵将其固定于塑料杯中，使两株苗间距在 1 cm 左右。用一个圆筒形玻璃罩（直径 4 cm，高 8 cm）将两株水稻从茎秆基部一起套住，向玻璃罩内接入

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

15 头怀卵褐飞虱雌成虫，顶部用圆形海绵封住。在接虫 1、2、4、8、12、24、48、72 h 观察并记录两株苗上的虫数，72 h 后去除所有褐飞虱，剪取试验水稻的茎秆，在双目解剖镜下镜检并统计两株苗上的产卵量，计算每株苗的卵量百分率，每个处理重复 7 次（王佳妮等，2018）。

1.2.6　褐飞虱分泌的蜜露量分析

单株种植的突变体水稻和野生型水稻。将石蜡薄膜（parafilm）小袋子（4 cm × 3.5 cm）套于 45 d 苗龄的水稻基部 1 cm 以上位置，每个袋中放入 1 头经饥饿处理 3 h 的褐飞虱雌成虫，处理重复 10 次以上。实验前于万分之一天平称量石蜡薄膜袋的重量，24 h 后吸出袋中褐飞虱，再次称量蜜露袋的重量，两次重量之差即为褐飞虱分泌的蜜露量。

1.2.7　褐飞虱初孵若虫发育历期等测定

选取长势一致的突变体和野生型水稻，用海绵将其固定于塑料杯中。圆筒形玻璃罩（直径 4 cm，高 8 cm）套于水稻茎秆基部，向玻璃罩内接入 15 头褐飞虱初孵若虫，顶部用海绵封住。每天观察并统计植株上褐飞虱若虫数量直至羽化，每个处理重复 9 ~ 10 次。统计和分析各处理褐飞虱的若虫存活率、若虫发育历期、羽化率、初羽化成虫体重和成虫短翅率。

1.2.8　褐飞虱单雌产卵量和孵化率实验

单株种植的突变体水稻和野生型水稻，圆筒形玻璃罩（直径 4 cm，高 8 cm）套于水稻茎秆基部，接入 1 雌 1 雄初羽化褐飞虱成虫，顶部用海绵封好。接虫 6 d 后移除褐飞虱，每天观察水稻植株并统计孵化的若虫数量后清除褐飞虱若虫，直至连续 6 d 无若虫孵出。将水稻茎秆在解剖镜下镜检，统计未孵化的卵量，并计算孵化率。每个处理重复 15 次。

1.3　数据分析

数据采用 DPS 数据处理软件进行统计分析。两个样本间的比较采用 Student's *t*-test 或采用卡方检验；多样本平均数之间的差异采用 One-Way ANOVA 分析，并用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2　结果与分析

2.1　RHTd 等水稻抗褐飞虱评价

抗性评级结果表明，RHTd 对褐飞虱具有较强的抗性。在接虫第 5 天，TN1 水稻 90% 植株出现死亡，受害评级为 8.6；而 ASD7 水稻的第二、第三片叶片出现枯黄，受害指数为 5.8；RHTd 和 Mudgo 的受害指数仅分别为 1.4 和 2.8，水稻部分叶片出现发黄（图 1-A）。不同时间 4 种水稻的褐飞虱着虫数表明，RHTd 对褐飞虱具有明显的驱避性，在 1 ~ 48 h 内，RHTd 上的褐飞虱数量均显著少于其它 3 种水稻（图 1-B）。褐飞虱干重与功能损失指数作图表明，分别有 11.1%、22.2% 和 66.7% 的 RHTd 水稻在耐害性、抗生性和兼抗（抗生性和耐害性）的象限中；88.9% 的 Mudgo 水稻对褐飞虱具有耐害性，而 1/3 的 ASD7 水稻对褐飞虱不具有抗性（图 1-C）。

2.2　*OsLecRK1* 基因过量表达转基因水稻的获得

根据 NCBI 的 Rathu Heenati 水稻 *OsLecRK1* 基因序列，克隆得到水稻 *OsLecRK1* 基因的 CDS 片段大小为 2 442 bp（图 2-A）。*OsLecRK1* 基因的植物表达载体 p13SN-OsLecRK1 的 T-DNA 框结构如图 2-B。通过农杆菌介导的水稻遗传转化法得到 T_0 代 *OsLecRK1* 过量表达突变体水稻，经 PCR 鉴定和潮霉素筛选，最终筛选到 *OsLecRK1* 过量表达 T_3 代 3 个纯合株系 *TS17*，*TS19* 和 *TS21*（图 2-C）。

2.3　过量表达 *OsLecRK1* 基因对水稻千粒重和株高的影响

与对照水稻日本晴千粒重 25.6 g 相比，过量表达 *OsLecRK1* 突变体植株 *TS17*、*TS19* 的稻谷千粒重分别减少了 7.4% 和 3.6%，均具有显著差异，而 *TS21* 稻谷的千粒重与对照无差异（图 3-A）。过量表达 *OsLecRK1* 基因并不影响水稻的株高，3 个过量表达突变体水稻的株高与野生型相比均无显著差异（图 3-B）。

2.4　过量表达 *OsLecRK1* 水稻对褐飞虱取食和产卵选择性影响

从 4 h 开始褐飞虱在 *OsLecRK1* 基因过表达株系 *TS17* 虫量明显地少于对照，该趋势逐渐增大并维持至 72 h（图 4-A）；而 *TS19*、*TS21* 株系上虫量分别于 8 h 和 12 h 后开始显著地少于对照，不同时间点分别仅为各自对照虫量的 59.1% ~ 76.3% 和 56.5% ~ 74.7%（图 4-B、图 4-C）。褐飞虱在突变体 *TS17* 和 *TS21* 上的产卵量仅为对照的 62.2% 和 76.7%，均显著地减少（图 4-D）。表明 *OsLecRK1* 过量表达导致褐飞虱更倾向于在野生型水稻日本晴上栖息和产卵。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

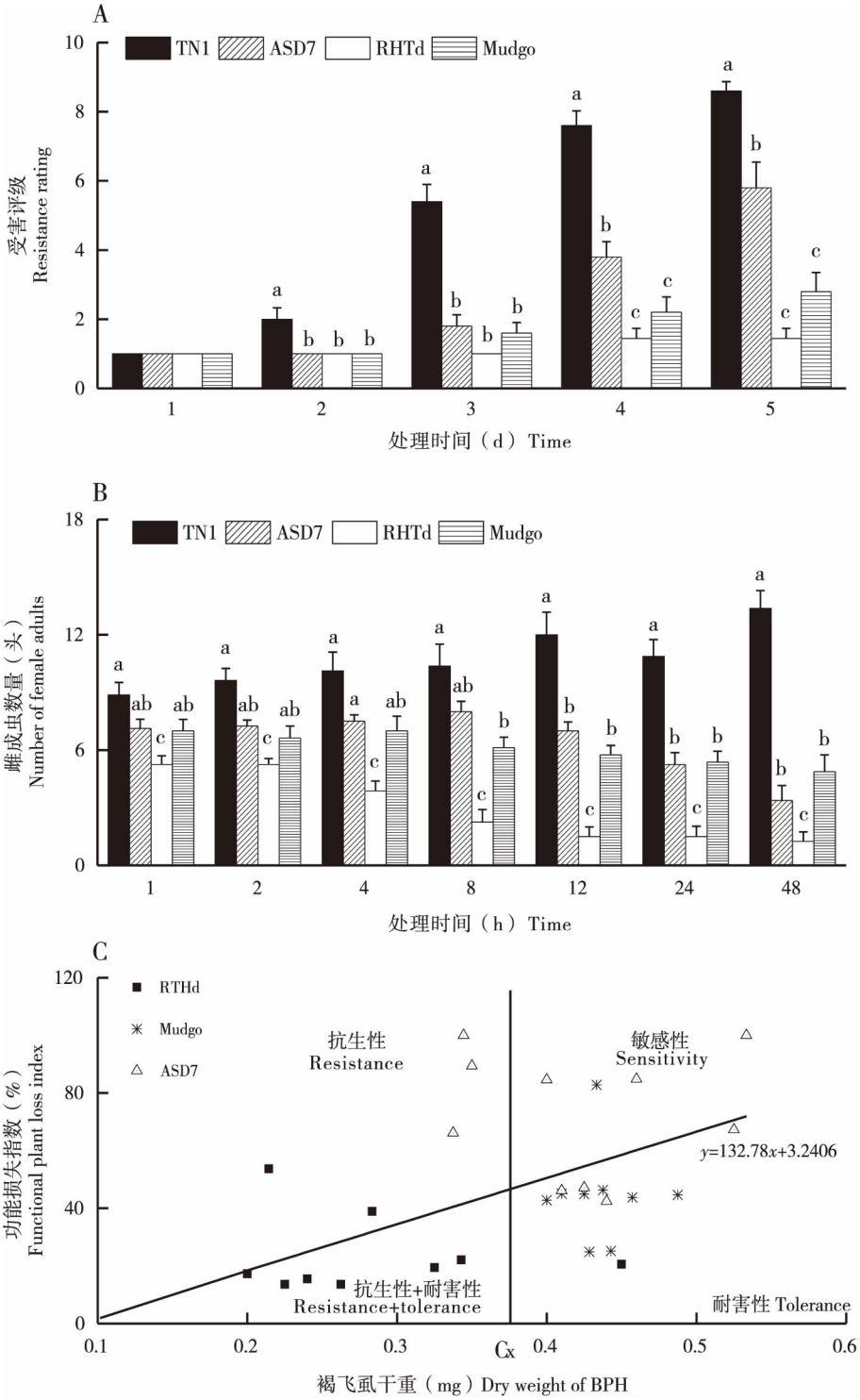


图 1 不同品种水稻对褐飞虱的抗性

Fig. 1 Resistance analysis of different rice varieties on BPH

注：A，TN1、ASD7、RHTd 和 Mudgo 水稻的抗性评级；B，不同时间 TN1、ASD7、RHTd 和 Mudgo 水稻上褐飞虱数量；C，水稻抗褐飞虱类型分析。图中不同字母表示同一时间点的各个处理组间的显著差异，不同处理处理间显著水平（$P<0.05$）。Note: A, Resistance rating of TN1, ASD7, RHTd and Mudgo rice; B, Number of BPH on TN1, ASD7, RHTd and Mudgo rice; C, Classification of rice resistance types. Letters represented significant differences among the various treatment groups at the same time point ($P<0.05$).

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

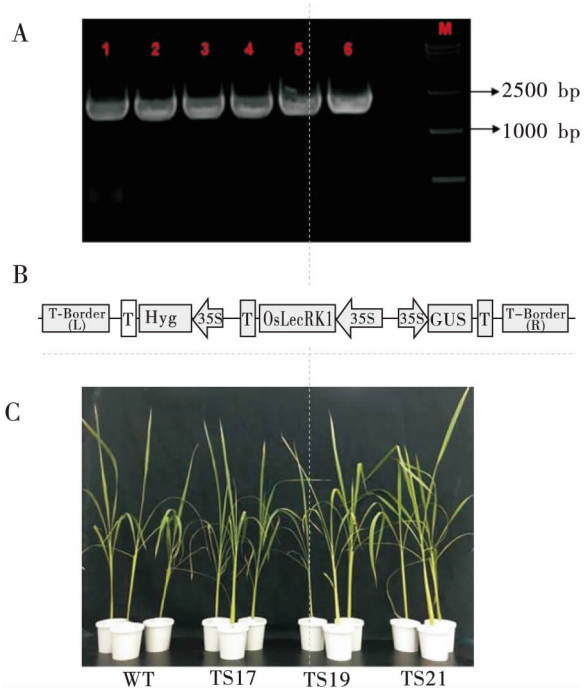


图 2　*OsLecRK1* 基因克隆和过量表达突变体构建

Fig. 2　*OsLecRK1* gene cloning and its over-expressing mutants rice plants

注：A，*OsLecRK1* 基因 PCR 产物凝胶电泳；B，过表达载体的 T-DNA 区；C，野生型（WT）和突变体品系表型；M，DNA 分子量标准；1～6，*OsLecRK1* 基因 PCR 产物；T，NOS 终止子；Hyg，抗潮霉素基因；GUS，β-葡萄糖苷酸酶基因；WT，日本晴；*TS17*，*TS19* 和 *TS21*，过量表达 *OsLecRK1* 基因水稻株系。Note: A, DNA electrophoresis of *OsLecRK1* PCR products on agarose gel; B, T-DNA structure of *p13SN-OsLecRK1*; C, Wild type (WT) and mutant strains of phenotype; M, 15 000 bp DNA marker; 1～6, PCR product of *OsLecRK1*; T, NOS terminator; Hyg, Anti hygromycin gene; GUS, β-glucosidase gene; WT, Nipponbare; *TS17*, *TS19* and *TS21*, rice mutans of over-expressing *OsLecRK*1.

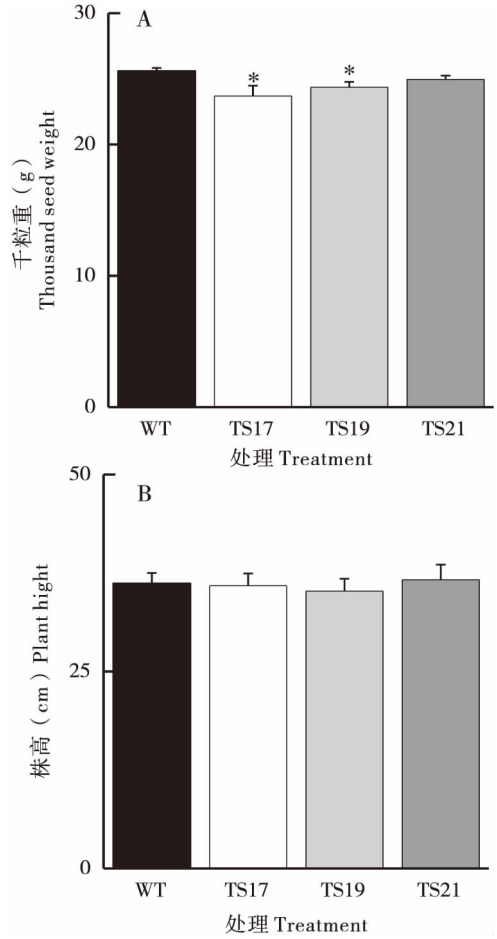


图 3　过量表达 *OsLecRK1* 基因对水稻的稻谷千粒重（A）和株高（B）的影响

Fig. 3　Influence of *OsLecRK1* on 1 000-seed weight (A) and height (B) of rice

注：WT，野生型水稻日本晴；*TS17*，*TS19* 和 *TS21*，过量表达 *OsLecRK1* 基因水稻株系　“*”代表突变体和野生型水稻之间的差异（$^{*}P<0.05$）。Note: WT, wild type rice Nipponbare; *TS17*, *TS19* and *TS21*, the rice mutants of over-expressing *OsLecRK1*; “*” indicated significant differences between lines and wild type rice ($^{*}P<0.05$).

2.5　过量表达 *OsLecRK1* 水稻对褐飞虱若虫发育历期等的影响

过量表达 *OsLecRK1* 水稻突变体株系 *TS17*、*TS19*、*TS21* 上的褐飞虱若虫存活数量均显著低于野生型水稻上的褐飞虱数量（图 5-A），但各突变体株系间无差异。在 *TS17*，*TS19* 株系上饲养的褐飞虱雌若虫发育历期分别为 12.5 d 和 12.7 d，均显著长于对照组的 12.1 d；*TS19* 上的雄若虫发育历期为 12.3 d 也显著地长于对照组的 11.8 d（图 5-B）。野生型水稻上初羽化雌成虫体重为 1.66 mg，分别仅为突变体水稻株系 *TS17*、*TS19*、*TS21* 上的初羽化雌虫体重的 97.0%、97.5% 和 95.2%，均具显著性差异；而不同水稻上的初孵雄成虫的体重无显著差异（图 5-C）。过表达突变体水稻品系 *TS17*、*TS19*、*TS21* 上的褐飞虱羽化率为 62%、60.7% 和 62.7%，均显著地低于野生型水稻上褐飞虱的羽化率 72.2%（图 5-D）。过量表达 *OsLecRK1* 对褐飞虱若虫的存活率、羽化率、若虫发育历期、初羽化雌成虫体重均有显著的影响。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

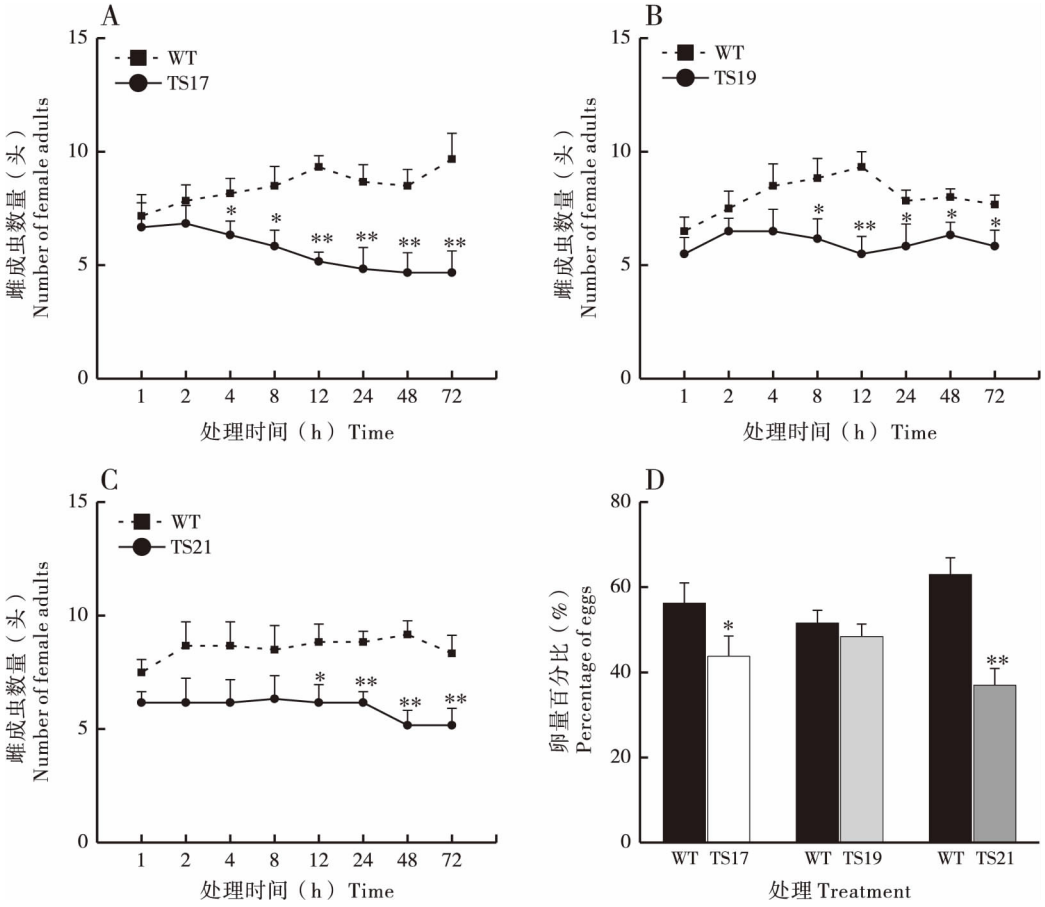


图 4 *OsLecRK1* 基因对褐飞虱雌成虫取食（A-C）和产卵（D）影响

Fig. 4 Influence of *OsLecRK1* gene on feeding (A-C) and oviposition (D) preference of BPH female adults

注：WT，野生型水稻日本晴；*TS17*，*TS19* 和 *TS21*，过量表达 *OsLecRK1* 基因水稻株系；“*”代表野生型水稻和突变体水稻之间的差异显著性（$^{*}P<0.05$；$^{**}P<0.01$）。Note: WT, wild type rice Nipponbare; *TS17*, *TS19* and *TS21*, the rice mutants of over-expressing *OsLecRK1*; "*" indicated significant differences between lines and wild type rice ($^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$).

2.6 过量表达 *OsLecRK1* 水稻对褐飞虱单雌产卵量、翅型分化和蜜露量的影响

野生型水稻上褐飞虱单雌产卵量为 98.9 粒，分别为突变体株系 *TS17*、*TS19*、*TS21* 上的褐飞虱单雌产卵量的 1.87 倍、1.74 倍和 1.80 倍，均存在显著差异（图 6-A）。突变体水稻株系 *TS17*、*TS19*、*TS21* 上的卵孵化率分别为 38.5%、34.6% 和 40.7%，均极显著低于野生型水稻上的卵孵化率 67.3%（图 6-B）。在褐飞虱翅型分化上，过量表达突变体水稻株系上的褐飞虱短翅率在 86.4% ~ 88.3%，显著低于野生型水稻上短翅率 95.1%（图 6-C）。过量表达突变体水稻株系 *TS17*、*TS19*、*TS21* 上的褐飞虱蜜露量分别为 7.1 mg、11.4 mg 和 8.2 mg，都显著低于在野生型上褐飞虱分泌的蜜露量 18.7 mg（图 6-D）。表明过量表达 *OsLecRK1* 对褐飞虱繁殖、翅型分化和蜜露量均有显著影响。

3 结论与讨论

本文对水稻 RHTd（含 *Bph3*）、Mudgo（含 *Bph1*）和 ASD7（含 *bph2*）等材料进行了褐飞虱抗性评价。结果表明，含 *Bph3* 基因水稻 RHTd 对褐飞虱的抗性明显地强于含 *Bph1* 基因水稻 Mudgo 和 *bph2* 基因水稻 ASD7，RHTd 水稻的褐飞虱受害指数仅为 Mudgo 和 ASD7 水稻的 53.5% 和 24.1%。根据褐飞虱对水稻品种产生的危害情况，将褐飞虱划分为 4 种生物型：生物型 1、生物型 2、生物型 3 和生物型 4（刘开雨等，2011）。邓飞等（2011）研究表明 Mudgo（含 *Bph1*）能抵抗褐飞虱

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

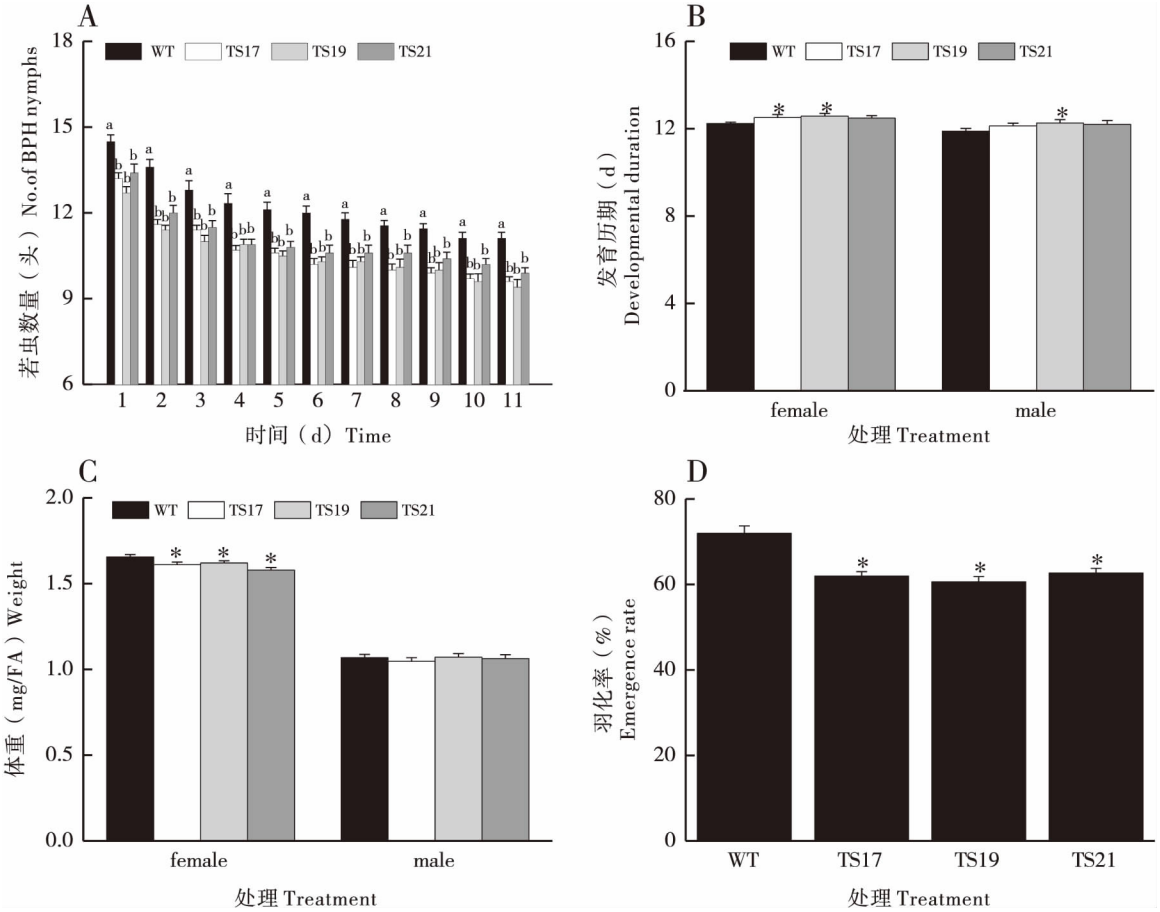


图 5　*OsLecRK1* 基因对褐飞虱若虫存活率（A）、若虫发育历期（B）、初孵成虫体重（C）和羽化率（D）的影响

Fig. 5　Influence of *OsLecRK1* gene on survival rates (A) and developmental duration (B) of BPH nymphs, the weights of newly-emergence BPH (C) and emergence rates of BPH (D)

注：WT，野生型水稻日本晴；*TS17*，*TS19* 和 *TS21*，过量表达 *OsLecRK1* 基因水稻株系；不同字母表示同一时间点的各个处理组间存在显著差异（$P<0.05$）；“*”代表野生型水稻和突变体水稻之间的差异显著性（$^{*}P<0.05$；$**P<0.01$）。Note: WT, wild type rice Nipponbare; *TS17*, *TS19* and *TS21*, the rice mutants of over-expressing *OsLecRK1*; The letters represented significant differences among the various treatment groups at the same time point ($P<0.05$); “*” indicated significant differences between lines and wild type rice ($^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$).

生物型 1 和生物型 3，ASD7（含 *bph2*）能抵抗褐飞虱生物型 1 和生物型 2，Rathu Heenati（含 *Bph3*）对褐飞虱生物型 1、2、3、4 都具有抗性。有研究者对东南亚地区种植的水稻品系对褐飞虱抗性进行了评价，发现含有 *Bph3* 基因的水稻 Rathu Heenati 对褐飞虱的抗性显著高于其它水稻（Finbarr *et al.*，2015）。刘裕强（2009）对 Rathu Heenati（含 *Bph3*）水稻的脂氧合酶（Lipoxygenase，LOX）、过氧化氢酶（Catalase，CAT）、苯丙氨酸解氨酶（Phenylalanineammonialyase，PAL）和 H_2O_2 进行了测定分析，发现褐飞虱取食后 LOX、PAL 和 H_2O_2 表达量与对照相比均有显著提高。

此外，本实验克隆并构建了 *OsLecRK1* 过量表达突变体水稻，利用该突变体分析了 *OsLecRK1* 基因对褐飞虱若虫存活率、若虫发育历期等生物学参数的影响。结果表明，褐飞虱若虫在 *OsLecRK1* 基因过量表达的突变体水稻上的存活率显著地降低，若虫发育历期显著地延长，羽化率和初羽化雌成虫体重均显著地降低。并且，褐飞虱在突变体水稻上取食分泌的蜜露量、单雌产卵量和卵孵化率均显著地减少。本研究证实了在水稻中仅过量表达 *OsLecRK1* 基因即可显著地增加水稻对褐飞虱的抗性，该基因可对褐飞虱的若虫存活率和发育历期等一系列生物学参数产生不利影响，如 *OsLecRK1* 基因过量表达的水稻降低褐飞虱若虫存活率、延长若虫发育历期、降低羽化率和单雌产

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

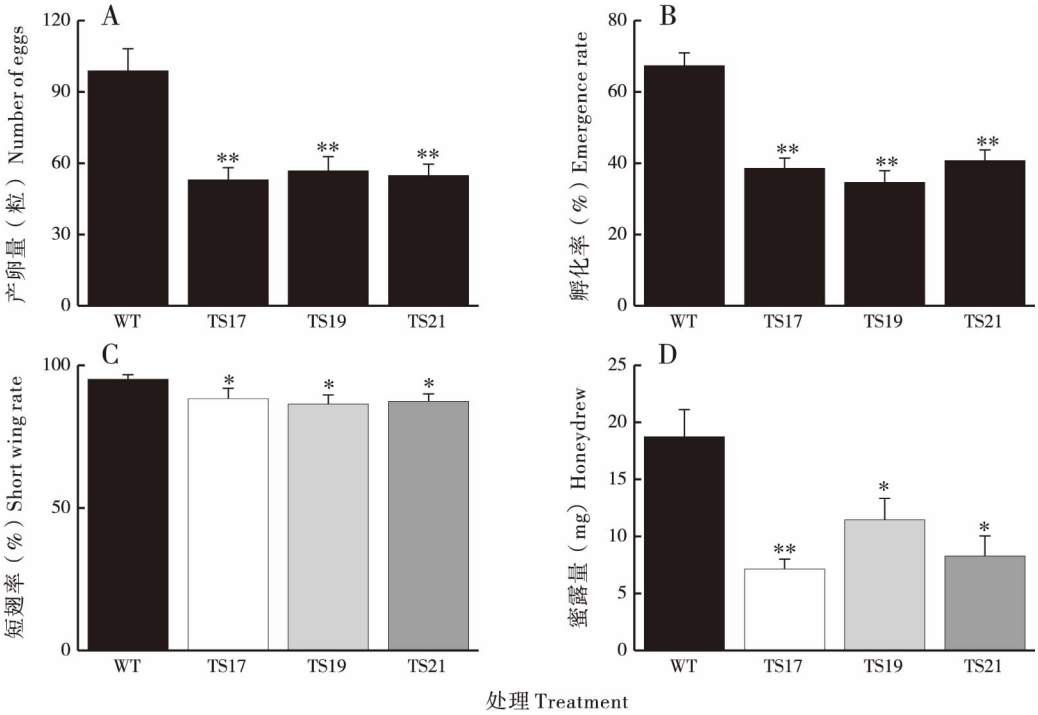


图 6 *OsLecRK1* 基因过表达水稻对褐飞虱单雌产卵量（A）、卵孵化率（B）、短翅率（C）和蜜露量（D）的影响

Fig. 6 Impacts of *OsLecRK1* on egg number of per female brown planthopper (A), hatching rate of eggs (B), rate of short-wing type BPH adult (C) and the amount of honeydew excreted by BPH (D)

注：WT，野生型水稻日本晴；*TS17*，*TS19* 和 *TS21*，过量表达 *OsLecRK1* 基因水稻株系；“*”代表野生型水稻和突变体水稻之间的差异显著性（$^{*}P<0.05$；$^{**}P<0.01$）。Note: WT, wild type rice Nipponbare; *TS17*, *TS19* and *TS21*, the rice mutants of over-expressing *OsLecRK1*; “*” indicated significant differences between lines and wild type rice ($^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$).

量等，这一结果与 Liu 等（2015）研究结果相类似。Liu 等（2015）通过图位克隆法分离和鉴定了水稻抗褐飞虱 *Bph3* 基因簇由 4 个凝集素类受体蛋白激酶（*OsLecRK*1-4）基因组成，其中 *OsLecRK4* 为无效基因；*OsLecRK1* 基因对 *Bph3* 的抗褐飞虱作用贡献最大，在 Rathu Heenati 水稻背景下构建的 *OsLecRK1* 单基因缺失和 *OsLecRK1*、*OsLecRK2* 双基因缺失的突变体水稻对褐飞虱抗性分别下降了 50% 和 75%。有文献报道在拟南芥中，凝集素类受体蛋白激酶 *LecRK-V*. 5 基因突变，导致病原物相关分子模式触发的免疫反应（Pattern-triggered immunity，PTI）其相关抗性基因的表达量降低，胼胝质的形成受阻等（Singh *et al.*，2012）。*OsLecRK1* 基因过量表达水稻对褐飞虱具有强烈的驱避性，可能是由于突变体水稻产生了对褐飞虱具有驱避作用的挥发性物质，也不排除突变体水稻产生了对褐飞虱的抗生性化合物如在水稻汁液中积累抑食剂或茎秆积累过量的胼胝质，具体机制还需进一步研究。以上的研究结果丰富了对 *OsLecRK1* 基因介导水稻抗褐飞虱的认识，加深了对 *Bph3* 基因抗褐飞虱机制的了解，也为水稻抗飞虱育种中 *Bph3* 抗源的科学利用提供了理论依据。

参考文献（References）

Bellande K, Bono J, Savelli B. Plant lectins and lectin receptor - like kinases: How do they sense the outside? [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 18 (6): 1164.

Chen JM, Yu XP, Cheng JA. Evaluation of the resistance and compensation effect of different rice varieties to brown planthopper [J]. *Chinese Rice Science*, 2003, 3: 76 - 80. [陈建明，俞晓平，程家安. 不同水稻品种对褐飞虱为害的耐性和补偿作用评价[J]. 中国水稻科学，2003，3：76 - 80]

Chen XW, Shang JJ, Chen DX, *et al.* A B - lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance [J]. *The Plant Journal*, 2006, 46: 794 - 804.

Cheng XY, Wu Y, Guo JP, *et al.* A rice lectin receptor - like kinase that is involved in innate immune responses also contributes to seed germination [J]. *The Plant Journal*, 2013, 76: 687 - 698.

Deng F, Ni S, Zhu XD. The current situation and prospect of rice anti - brown planthopper breeding research [J]. *Chinese Agricultural*

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Science Bulletin, 2011, 27 (24): 229 – 237. [邓飞, 倪深, 朱旭东. 水稻抗褐飞虱育种研究的现状与展望 [J]. 中国农学通报, 2011, 27 (24): 229 – 237]

Du B, Chen RZ, Guo JP, *et al.* Current understanding of the genomic, genetic, and molecular control of insect resistance in rice [J]. *Molecular Breeding*, 2020, 40: doi. org/10. 1007/s11032 – 202 – 1103 – 3.

Finbarr G, Horgana, Angelee FR, *et al.* Virulence of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) populations from South and South East Asia against resistant rice varieties [J]. *Crop Protection*, 2015, 222 – 231.

Gilardoni PA, Hettenhausen C, Baldwin IT. *Nicotiana attenuata* lectin receptor – like kinases suppresses the insect – mediated inhibition of induced defense responses during *Manduca sexta* herbivory [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23 (9): 3512 – 3532.

He Z, Li JY, Zhang C, *et al.* The mutant identification and preliminary function study of *LecRK – ConA* gene in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Life Sciences Research*, 2017: 10 – 31. [何壮, 李金燕, 张骋, 等. 拟南芥 *LecRK – ConA* 基因突变体的筛选鉴定及其功能初步研究 [J]. 生命科学研究, 2017: 10 – 31]

Horgan FG, Ramal AF, Bentur JS. Virulence of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) populations from South and South East Asia against resistant rice varieties [J]. *Crop Protection*, 2015, 8: 222 – 231.

Liu KY, Lu SN, Qiu JL, *et al.* Cultivating rice restoration system anti-rice brown planthopper gene import ation line and polymerization system [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2011, 9 (4): 410 – 417. [刘开雨, 卢双楠, 裘俊丽, 等. 培育水稻恢复系抗稻褐飞虱基因导入系和聚合系 [J]. 分子植物育种, 2011, 9 (4): 410 – 417]

Liu, YQ, Wu H, Chen H, *et al.* A gene cluster encoding lectin receptor kinases confers broad – spectrum and durable insect resistance in rice [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33 (3): 301 – 305.

Liu YQ. The Molecular Positioning of Rice Anti-brown Planthopper Gene and Its Resistance Mechanism [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University Doctor Thesis, 2009. [刘裕强. 水稻抗褐飞虱基因的分子定位及其抗性机制的初探 [D]. 南京: 南京农业大学博士论文, 2009]

Lou YG, Cheng JA. Basic research on the outbreak mechanism and sustainable management of rice planthoppers [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2011, 48 (2): 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 [J]. 应用昆虫学报, 2011, 48 (2): 231 – 238]

Panda N, Heinrichs EA. Levels of tolerance and antibiosis in rice varieties having moderate resistance to the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae) [J]. *Environmental Entomology*, 1983, 12: 1204 – 1214.

Singh P, Kuo YC, Mishra S, *et al.* The lectin receptor kinase-VI. 2 is required for priming and positively regulates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity [J]. *Plant Cell*, 2012, 24, 1256 – 1270.

Vaid N, Pandey PK, Tuteja N. Genome-wide analysis of lectin receptor-like kinase family from *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 80: 365 – 388.

Wang JN, Ding BY, Wang L, *et al.* Effects of exogenous rapeseed treatment of rice on the behavior of brown tick feeding and spawning selectivity [J]. *Journal of Plant Protection*, 2018, 45 (5): 998 – 1004. [王佳妮, 丁波英, 王璐, 等. 外源油菜素甾酮处理水稻对褐飞虱取食和产卵选择性等行为的影响 [J]. 植物保护学报, 2018, 45 (5): 998 – 1004]

Wang Y, Cordewener JHG, America AHP, *et al.* *Arabidopsis* lectin receptor kinases LecRK-IX. 1 and LecRK-IX. 2 are functional analogs in regulating *Phytophthora* resistance and plant cell death [J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2015, 28: 1032 – 1048.

Wu H. Location Cloning and Functional Study of Rice Anti – brown Planthoppere Gene *Bph3* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University Doctor Thesis, 2013. [吴寒. 水稻抗褐飞虱基因 *Bph3* 的图位克隆和功能研究 [D]. 南京: 南京农业大学博士论文, 2013]

Wu Y. Study of Brown Planthopper Resistance Gene *BPHI5* Candidate Gene and MicroRNA Sequencing Analysis in Rice [D]. Wuhan: Wuhan University Doctor Thesis, 2017. [吴艳. 水稻抗褐飞虱基因 *BPH*15 候选基因的研究以及 microRNA 测序分析 [D]. 武汉: 武汉大学博士论文, 2017]

Zhang C, Li JY, Guo XH, *et al.* LecRK – VII. 1, a lectin receptor – like kinase, mediates the regulation of salt stress and jasmonic acid response in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2017, 36: 385 – 40.

Zhang Y, Liu QN, Zhang YX, *et al.* *LMM*24 encodes receptor – like cytoplasmic kinase 109, which regulates cell death and defense responses in rice [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (13): 3243.

Zhou GX. Transcriptional Analysis of Rice Plants Infested by Rice Stripped Stem Borer *Chile suppressalis* (Walker) and the Functional Characterization of A Defense – related Gene Os*HI – LOX* [D]. Zhejiang: Zhejiang University Doctor Thesis, 2009. [周国鑫. 二化螟取食胁迫下的水稻转录组分析及相关基因 Os*HI – LOX* 的功能解析 [D]. 浙江: 浙江大学博士论文, 2009]

Zhu WW, Ma TY, Zhang MJ. Advances in the study of receptor protein kinases in plants [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37 (1): 451 – 458. [朱巍巍, 马天意, 张梅娟. 类受体蛋白激酶在植物中的研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37 (1): 451 – 458]

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net