

· 植物保护 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250022



主持人: 缪卫国, 吴少英

Open Access



基于 BSA-seq 对一个水稻类病斑基因的初步定位

卢东莹^{1,2#}, 陈杰², 李慈云², 杨健飞², 牛晓磊^{1*}

(1. 海南大学 南繁学院, 海南 三亚 572025 中国; 2. 海南大学 热带农林学院, 海南 儋州 571737 中国)

摘要: 类病斑突变体(lesion mimic mutants, LMM)在植物免疫和生长发育研究中具有重要意义。本研究旨在通过 BSA-seq(bulked segregant analysis sequencing)技术对 1 个水稻类病斑基因进行初步定位。首先, 从籼稻(*Oryza sativa* ssp.)品种‘黄华占’(‘HHZ’)经 EMS 诱变后的群体中筛选出 1 个出现类病斑症状的突变体 LMM43, 通过 LMM43 与野生型亲本杂交后得到的 F₂ 代分离群体进行表型分析, 确定类病斑性状的遗传模式。利用 BSA-seq 技术, 对类病斑表型的个体和正常个体的 DNA 混合样本进行高通量测序。通过关联分析单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)及插入缺失(insertion and deletion, InDel)的差异结合表现型分析, 将目标基因初步定位在水稻第 10 号染色体的一段区间内, 该区间长度约为 1.37 Mb, 包含 199 个基因, 最终确定了 5 个候选基因。

关键词: 水稻; 类病斑; 抗病性; BSA-seq

中图分类号: S511

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2025)05-0707-11

卢东莹, 陈杰, 李慈云, 等. 基于 BSA-seq 对一个水稻类病斑基因的初步定位 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(5): 707-717. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250022

水稻(*Oryza sativa*)是全世界最重要的粮食作物之一, 为全世界一半以上的人口提供食物, 所以其产量和抗病性一直是研究的热点^[1]。杂交水稻产量虽高, 但是病虫害仍是影响产量进一步提高的主要因素之一, 比如稻瘟病、白叶枯病^[2]等, 每年因病害造成的减产约为 15%~30%。水稻类病斑(rice lesion mimic)突变体是指在不外源病原菌、无逆境无损伤的情况下, 自发在水稻叶片或其他部位产生坏死斑表型的突变体, 是植物超敏反应(hypersensitive response, HR)引起的一种程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD), 与由病原菌感染引起的病变非常相似^[1, 3]。类病斑的形成机制颇为复杂, 涉及多种生物学过程, 如蛋白质的磷酸化与去磷酸化、泛素化修饰、活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成、脂肪酸代谢途径、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号级联反应及离子转运等。植物类病斑基因突变所导致的生理改变

呈现多面性, 包括生长发育、代谢活动及抗病机制等多个层面。在已报道的 200 多种水稻类病斑突变体中, 水稻类病斑突变体的表型大多是单个隐性核基因发生突变造成的, 如 *spl4*^[4]、*spl21*^[5] 和 *spl30*^[6] 等, 少数由显性基因控制, 如 *Spl18*^[7]、*nls1-ID*^[8]、*spl-D*^[9]、*Spl26*^[10] 和 *LILI*^[11]。大多数水稻类病斑突变体都表现出对一个或多个病原菌具有抗病性, 因此, 水稻类病斑突变体成为水稻抗病分子机制研究和抗病育种的重要种质资源^[12]。现代遗传学中, 精准鉴定与特定性状相关的基因至关重要。传统图位克隆方法虽有效但耗时且成本高。随着二代测序技术(next-generation sequencing, NGS)发展, 集群分离分析法(bulked segregant analysis, BSA)和突变位点图谱(MutMap)方法出现, 提供了高效经济的基因定位新途径^[13-14]。BSA 和全基因组重测序相结合, 通过选择目标性状的极端表型个体构建混合样本池并测序, 快速鉴定与目标性

收稿日期: 2025-01-20

修回日期: 2025-02-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860497); 海南省高等学校教育教学改革研究项目(Hnjg2019ZD-2)

*第一作者: 卢东莹(1999—), 女, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: ludongyingi@163.com

*通信作者: 牛晓磊(1979—), 男, 副教授, 博士生导师。研究方向: 作物遗传育种。E-mail: ninterxll@hainanu.edu.cn

状连锁的突变位点^[15]。MutMap 是 BSA 的具体应用,适用于甲基磺酸乙酯 (ethyl methanesulfonate, EMS) 诱变隐性突变基因分析,通过计算突变位点频率确定连锁染色体区段和突变位点^[16-19]。

本研究团队从经 EMS 诱变后的籼稻‘黄华占’ (‘HHZ’) 群体中发现了 1 个类病斑突变体,命名为 *LMM43*。以 HHZ 野生型为对照,来研究 *LMM43* 突变体的特性。选择‘HHZ’× *LMM43* 杂交得到的 F₂ 群体为实验材料,利用 BSA-seq 对类病斑进行基因定位分析,旨在挖掘新型的抗病育种的重要基因,为进一步理解水稻抗病机制和培育抗病品种提供新的理论依据^[20]。

1 材料与方法

1.1 植物实验材料 本实验中所用到的水稻材料有籼稻 (*Oryza sativa* ssp.) ‘黄华占’ (‘HHZ’), 以及经过 EMS 诱变筛选出‘HHZ’背景的 *LMM43* 突变体,已经过多代自交获得了稳定遗传的表型。

1.2 表型鉴定 将 *LMM43* 突变体及‘HHZ’野生型 (wild type, WT) 水稻种植于海南省三亚市崖州区独村实验中心基地 (109°18'N, 18°36'E), 进行常规水肥管理。观察在全生育期内 *LMM43* 和 WT 植株的表型差异,记录 *LMM43* 突变体类病斑的出现情况,关注其斑点出现的时间点、形状、颜色、位置、密度等。在拔节期 (60 d) 取叶片用于 BSA-seq 测序的极端性状样本池构建。

1.3 遗传模式分析 为确定该突变体的遗传模式,以‘HHZ’作为母本, *LMM43* 作为父本进行杂交,该工作于陵水试验基地完成。收获的 F₁ 代种子,种植后观察 F₁ 代植株表型,将杂株排除后自交获得 F₂ 代种子。继续将 F₂ 代群体种植于独村实验中心基地获得遗传分离群体,对其进行观察和取样工作,统计性状分离情况。

1.4 白叶枯病菌抗性鉴定 选取了白叶枯病菌的 7 个生理小种: PXO61、PXO86、PXO79、PXO71、PXO112、PXO99 和 PXO145。使用剪叶法分别对野生型和突变体进行接菌处理^[21],每个生理小种接种 3 株水稻,20 d 后对接种叶片的病斑长度进行拍照及测量。

1.5 BSA 测序

1.5.1 混池构建 在 F₂ 代群体处于拔节期时,分别选择类病斑表型和野生型表型各 30 株及

LMM43 突变体亲本和 HHZ 亲本各 2 株的叶片,提取 DNA 后等量混合构建为 Mu-F₂、Mu-QB、WT-F₂、WT-QB 4 个混池。然后送至杭州联川生物技术股份有限公司进行样品检测、文库构建、使用 Illumina HiSeq 2500 平台进行测序,测序深度为 30×。

1.5.2 生物信息分析 通过测序,得到最初的原始序列即 Raw Reads。该数据里面含有带接头的和低质量的 reads,通过去除接头、过滤掉 reads 上难确定的碱基类型占比大于 10% 的及 $Q \leq 10$ 碱基数占整 reads 50% 以上的低质量 reads,将低质量的数据过滤掉后得到 Clean Reads。以明恢 63 (MH63RS3, 大小为 396 Mb) 作为参考基因组,用 BWA 软件将测序获得的 Reads 定位至基因组上,通过比对定位 Clean Reads 在参考基因组上的位置,统计各样品的测序深度、基因组覆盖度等信息,并进行变异的检测。

将上一步比对到的结果使用 samtools 继续过滤掉冗余 reads,然后使用 GATK 对 SNP 和 InDel 进行变异检测,4 个样本各自生成 gVCF 后,再进行群体间的基因型比对过滤,最终可以得到变异的位点集。将以上获得的位点使用 SnpEff 进行变异注释和预测变异影响。

1.5.3 关联分析 在开展关联分析之前,先对 SNP 和 InDel 进行筛选,筛选条件包括:剔除具有多个基因型的位点;去除 reads 支持度低于 4 的位点;排除混池间基因型相同的位点及隐性混池基因不是来源于隐性亲本的 SNP 位点。

将经上述条件过滤后的变异位点进行关联分析,有 2 种方法分别为欧氏距离 (euclidean distance, ED) 算法和 Index 算法^[13]。ED 算法是利用测序数据寻找混池间存在显著差异标记,并以此评估与性状关联区域的方法。理论上,BSA 项目构建的 2 个混池间除了目标性状相关位点存在差异,其他位点均趋向于一致,因此,非目标位点的 ED 值应趋向于 0。ED 值越大表明该标记在两混池间的差异越大^[22]。SNP-index 近年来发表的 1 种通过混池间的基因型频率差异进行标记关联分析方法,主要是寻找混池之间基因型频率的显著差异。利用 2 亲本的 SNP 数据,分别计算 2 混池的 SNP-index,并通过 Δ SNP-index 观测可能与性状分离相关的位点。通过以上 2 种算法分别对获得的

SNP 和 InDel 分别进行关联分析,得到候选区域。

1.5.4 候选区域筛选与功能注释 通过将得到的 SNP 候选区域和 InDel 候选区域结果取交集,得到最终的候选区域。应用 BLAST 软件对候选区间内的编码基因进行多个数据库(NR、Swiss-Prot、GO、KEGG、COG)的深度注释。通过详细的注释,快速筛选候选基因。

1.6 表达量分析 在拔节期取 *LMM43* 和 WT 的叶片,使用天根生化科技有限公司的总 RNA 提取试剂盒(DP450)提取水稻叶片的 RNA,送至公司进行转录组测序。

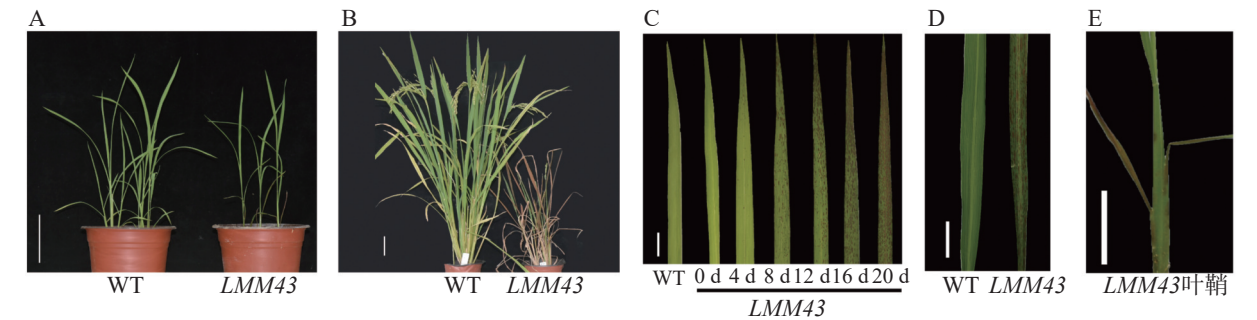
2 结果与分析

2.1 表型 对 WT 和 *LMM43* 突变体进行全生育期观察,发现 WT 和 *LMM43* 在四叶期以前没有出现差异,从四叶期开始 *LMM43* 突变体开始在叶尖部位出现少量红褐色的坏死斑点(图 1-A)。随着叶片的生长,类病斑斑点数目逐渐增加从叶尖部位逐渐扩散至整个叶片及茎秆(图 1-C—E),从幼

苗到成熟都带有类病斑表型,类病斑在叶片上随机分布,为扩散的全生育期型突变体。通过对比剑叶、倒二叶、倒三叶发现类病斑在老叶先产生,随后在新叶产生。与 WT 相比,*LMM43* 突变体叶片枯死,严重时导致整株植株死亡,表明类病斑严重影响了水稻的生长发育(图 1)。

2.2 遗传模式分析 为了确定该突变体的遗传特性,本研究将野生型‘HHZ’作为母本, *LMM43* 为父本进行杂交,通过观察 F₁ 表型发现其均表现出类病斑,这说明了 *LMM43* 的类病斑性状受到显性基因控制。同时,对 F₁ 进行自交后得到的 F₂ 代水稻进行了观察,发现类病斑表型在 F₂ 代群体中出现了分化,经统计,有斑单株与无斑单株分别为 289 株和 86 株,经过卡方检验($\chi^2=0.854<\chi^2_{0.05}=3.84, df=1$),其分离比符合 3 : 1(表 1)。综上确定了 *LMM43* 突变体表型是由单个核基因控制的显性性状。

2.3 白叶枯病菌抗性鉴定 对 *LMM43* 突变体进行白叶枯病菌的抗性鉴定,通过接种实验,发现突变体对白叶枯病菌的 7 个生理小种的抗病性均显



A. WT 与 *LMM43* 幼苗期(移栽 30 d)植株表型; B. WT 与 *LMM43* 分始穗期(移栽 90 d)植株表型; C. *LMM43* 叶片类病斑蔓延过程记录; D. 叶片基部类病斑情况; E. 叶鞘类病斑情况。标尺. A、B 图 10 cm, C、D、E 图 2 cm。

A. Phenotypes of WT and *LMM43* plants at seedling stage(30 d after transplanting); B. Phenotypes of WT and *LMM43* plants at spike initiation stage(90 d after transplanting); C. Record of the process of spreading of leaf-type spots of *LMM43*; D. Condition of leaf basal-type spots; E. Condition of leaf sheath-type spots. Scale bars. 10 cm for A and B panels, 2 cm for C, D and E panels.

图 1 WT 和 *LMM43* 表型比较

Fig. 1 Comparison of phenotypes between WT and *LMM43*

表 1 突变体 *LMM43* 和野生型‘HHZ’杂交构建的 F₂ 代群体植株表型分离情况

Tab. 1 Phenotypic segregation of F₂ generation population plants constructed from crosses between mutant *LMM43* and wild type ‘HHZ’

表型 Phenotype	植株数量/株 Number of plants			(O-E) ² /E
	观测值 Observe value	理论值 Expected value	O-E	
野生型 Wild Type	86	93.75	-7.75	0.641
突变型 Mutants	289	281.25	7.75	0.214
总计 Total	375	375.00	0	0.854

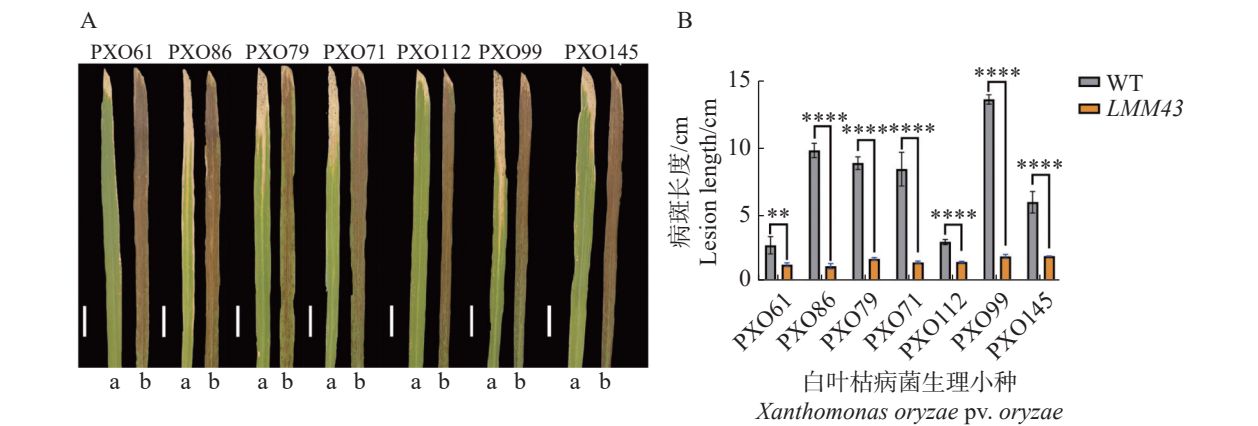
著增强(图 2)。

2.4 BSA-seq 测序结果 为了定位引起 *LMM43* 表型的基因, 分别构建 F_2 类病斑表型(Mu- F_2)、*LMM43* 亲本表型(Mu-QB)、 F_2 野生型(WT- F_2)、HHZ 亲本(WT-QB)4 个混池, 通过 BSA-seq 重测序的方法, 挖掘造成水稻类病斑突变体表型的基因位点。

2.4.1 测序质量评估 使用 Illumina HiSeq 2500 测序平台进行双端测序, 经 Raw Data 过滤质控后共获得 Clean Data 为 64.55 Gbp, Mu- F_2 、Mu-QB、WT- F_2 、WT-QB 分别获得了 16.32、18.40、16.90、12.93 Gbp 的 Clean Base, Q30 平均值达到了 90.96%。将得到的 Clean Reads 比对至 MH63

基因组上后, Mu- F_2 、Mu-QB、WT- F_2 、WT-QB 样本池的比对效率分别为 97.83%、97.50%、97.44%、97.32%, 平均比对效率达 97.52%(表 2)。4 个样本的平均覆盖深度为 39 $\times$ 、44 $\times$ 、40 $\times$ 、31 $\times$, 平均覆盖深度为 38.50 $\times$ (表 2)。以上测序质量统计证明了此次测序质量高, 一致性好, 可以用于后续的生物信息学分析来定位候选基因。

2.4.2 检测与注释 用 BAW 进行比对, 使用 GATK 和 samtools(v1.9)进行检测和过滤, 共发现 1 160 877 个 SNP。在 Mu-QB 和 WT-QB 间检测, 获得 76 489 个 SNP, 造成非同义突变的有 8 120 个; Mu- F_2 和 WT- F_2 间检测 SNP, 获得 128 357 个, 非同义突变有 12 300 个(表 3)。在 InDel 检测



A. 白叶枯病菌 7 个生理小种接菌 20 d 的病斑特征; B. 接菌 20 d 的病斑长度(cm), a 为 WT, b 为 *LMM43*。标尺.A 图 2 cm。数据来源于 3 个重复, 误差棒为 3 个重复的平均数 $\pm$ 标准差, 采用 *t*-检验, **表示 $P<0.01$, ****表示 $P<0.0001$ 。
A. Characterization of spots inoculated with seven physiological mini-inocula of leaf blight bacteria for 20 d. B. Spot lengths(cm)at 20 d of inoculation, a for HHZ, b for *LMM43*. Scale bar. 2 cm in Fig. A. The data are from 3 replicates, and error bars are the mean $\pm$ standard deviation of the 3 replicates using the *t*-test, ** denotes $P<0.01$, **** denotes $P<0.0001$.

图 2 WT 和 *LMM43* 白叶枯病菌的抗性鉴定
Fig. 2 Resistance characterization of WT and *LMM43* leaf blight fungi

表 2 样品测序数据评估统计					
Tab. 2 Sample sequencing data evaluation statistics					
ID	Clean_Reads	Clean_Base	Q30/%	Mapped/%	Ave_depth
Mu- F_2	55 381 938	16 323 284 819	91.05	97.83	39
Mu-QB	62 401 501	18 400 186 668	90.97	97.50	44
WT- F_2	57 227 645	16 902 635 145	91.02	97.44	40
WT-QB	6 667 274	12 925 983 271	90.81	97.32	31

注: ID: 混池样品编号; Clean_Reads: 过滤后的reads对数, 即read1和read2记为1条reads; Clean_Base: 过滤后的碱基数, Clean_Reads数乘以序列长度; Q30: 质量值大于等于30的碱基占总碱基数的百分比; Mapped: 定位到参考基因组的Clean Reads数占所有Clean Reads数的百分比; Ave_depth: 样品平均覆盖深度。下同。
Note: ID: pooled sample number; Clean_reads: log of filtered reads, i.e., read1 and read2 are counted as 1 read; Clean_Base: base count after filtering, Clean_Reads multiplied by sequence length; Q30: percentage of bases with a quality value greater than or equal to 30 out of the total base count; Mapped : percentage of Clean Reads located in the reference genome out of all Clean Reads; Ave_depth: average depth of coverage for the sample.similarly hereinafter.

中, 亲本混池间共检测到 20 742 个 InDel, 而 F₂ 代混池间有 32 086 个 InDel(表 4)。

表 3 SNP 注释结果统计

Tab. 3 Statistics of SNP annotation results

Type	WT-QB VS Mu-QB	WT-F ₂ VS Mu-F ₂
Intergenic	8 820	12 998
Intragenic	10	28
Intron	10 640	20 414
Upstream	21 097	36 848
Downstream	19 145	32 044
Utr_5_Prime	327	827
Utr_3_Prime	441	1 423
Splice_Site_Acceptor	52	82
Splice_Site_Donor	40	76
Splice_Site_Region	208	422
Start_Gained	25	61
Start_Lost	32	59
Synonymous_Coding	7 110	10 188
Non_Synonymous_Coding	8 120	12 300
Synonymous_Stop	8	8
Stop_Gained	374	508
Stop_Lost	40	71
Other	0	0
Total	76 489	128 357

注: Type: SNP所在区域或类型; 第2~3列分别为亲本间和混池间存在的对应类型的SNP数量。下同。

Note: Type: the region or type of SNP; columns 2~3 show the number of corresponding types of SNP between parents and pools.the same below.

2.4.3 关联分析 利用 F₂ 代的 2 个混池, 将 SNP 和 InDel 分别通过 ED 和 Index 算法进行关联分析。在 ED 算法中先计算出每个位点的 ED 值再进行 5 次方处理以消除背景噪声, 采用 Distance 法进行拟合后分别可以得到 SNP-ED 值分布图和 InDel-ED 值分布图(图 3-A、图 4-A), 然后取所有位点拟合值的 median+3SD 作为分析的关联阈值(1.86、5.62)即得到 8 个 SNP 区域(图 3-A 中突起峰区域)和 17 个 InDel 区域(图 4-A 中突起峰区域); 在 Index 算法中计算出分别计算出 WT-F₂ 和 Mu-F₂ 每个位点的 SNP-index 值, 然后两者相减得到 ΔSNP-index 值, Distance 法进行拟合后得到 SNP-index 值分布图和 InDel-index 值分布图(图 3-B、图 4-B), 随后取阈值线为置信度 0.99, 得到了 9 个 SNP 区域(图 3-B ΔSNP-index 值分布图中位

表 4 InDel 注释结果统计

Tab. 4 Statistics of InDel annotation results

Type	WT-QB VS Mu-QB	WT-F ₂ VS Mu-F ₂
Intergenic	1 865	2 761
Intragenic	18	28
Intron	650	6 842
Upstream	6 383	10 066
Downstream	5 601	8 495
Utr_5_Prime	324	565
Utr_3_Prime	322	600
Splice_Site_Acceptor	12	19
Splice_Site_Donor	14	31
Splice_Site_Region	83	141
Start_Lost	9	11
Frame_Shift	1 133	1 595
Codon_Deletion	190	280
Codon_Insertion	171	291
Codon_Change_Plus_	141	196
Codon_Deletion		
Codon_Change_Plus_	80	119
Codon_Insertion		
Stop_Gained	40	38
Stop_Lost	6	8
Other	0	0
Total	20 742	32 086

于置信度 0.99 的阈值线上的突起峰)和 26 个 InDel 区域(图 4-B ΔInDel-index 值分布图中位于置信度 0.99 的阈值线上的突起峰)。将 SNP 经 2 种算法得到的 8 个和 9 个区域取交集后得到 3 个 SNP 关联区域 572 个位点(图 3-C), InDel 的 17 个和 26 个区域取交集后得到 17 个关联区域 4 278 个位点(图 4-C)。

2.4.4 候选区域筛选 根据以上的关联结果再将获得的 3 个 SNP 关联区域和 17 个 InDel 关联区域取交集后得到了一个候选区域。在 10 号染色体 13 830 000~15 200 000 的 1.37 Mb 内(表 5), 共 199 个基因。其中, 根据这些变异位点的注释可知, 亲本间存在的非同义突变 20 个, 移码突变的 InDel 2 个; 混池间非同义突变 26 个, 移码突变的 InDel 2 个; 所以在该候选区间内可能与性状密切相关的为这 46 个非同义突变的 SNP 位点和 4 个移码突变的 InDel 位点。通过对候选位点的编码基因进行多个数据库(NR、Swiss-Prot、GO、KEGG、COG)的深度注释, 共注释到 16 个非同义

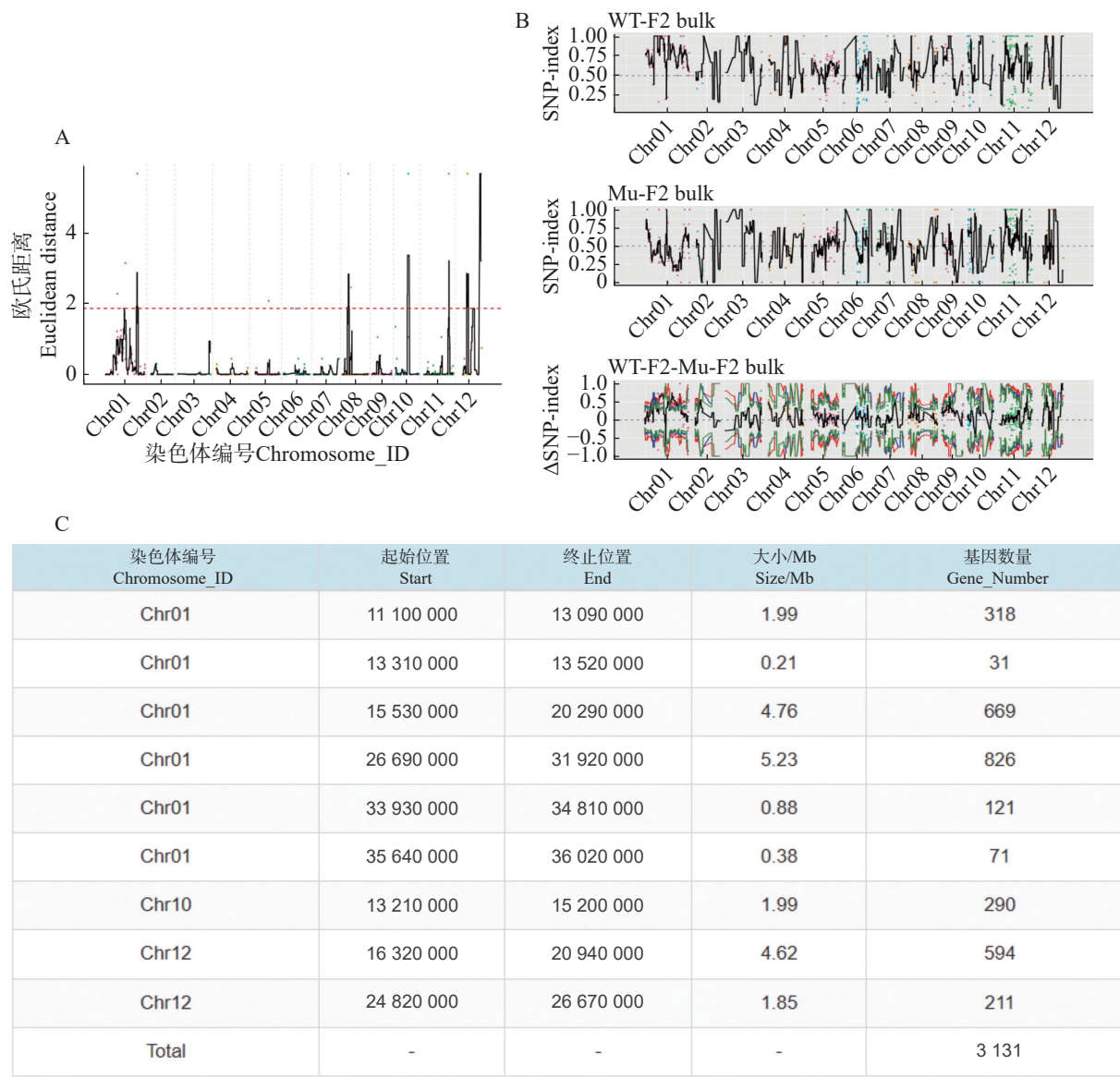


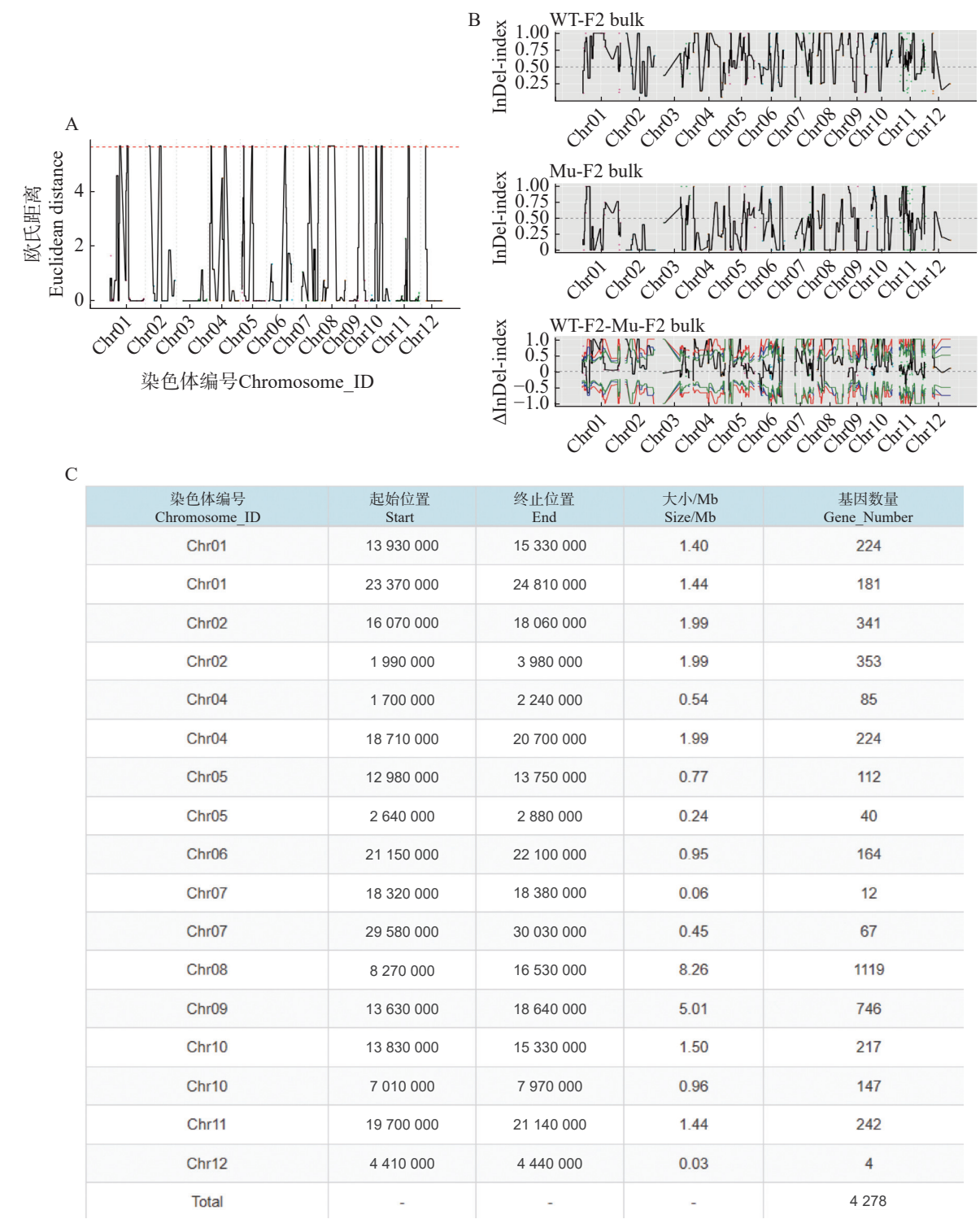
图3 SNP 关联分析图
A. SNP-ED 值分布图; B. SNP-index 值分布图; C. SNP 通过 2 种算法关联区域信息统计表。
A. Distribution of SNP-ED values; B. Distribution of SNP-index values; C. Statistical table of SNP association region information by 2 algorithms.

突变基因, 3 个移码突变基因(表 6)。

2.5 候选基因 通过以上综合分析, 得到了 *OsMH_10G0226700*、*OsMH_10G0225900* 等 19 个基因, 其中, 16 个为非同义突变, 3 个为移码突变, 鉴于 EMS 造成的主要为 G 到 A 和 C 到 T 的点突变, 所以非同义突变是需要重点关注的。在这 16 个非同义突变中, 其中 5 个基因可能与水稻的类病斑性状有关, 包括 *OsMH_10G0223300*, red chlorophyll catabolite reductase(PCCR); *OsMH_10G0206700*, calmodulin-binding transcription activator 3 isoform X2 (CAMTA3); *OsMH_10G0202100*, ethylene-responsive transcription factor RAP2-13(RAP2-13);

OsMH_10G0201300, probable glucan 1,3-beta-glucosidase A(β -1,3-葡聚糖苷酶 A); *OsMH_10G0201200*, disease resistance protein RGA4-like (RGA4-like)(表 6)。

2.6 候选基因的表达量分析 为了解候选基因 *LMM43* 突变体中是否有表达量的变化, 通过转录组测序结果分析 5 个候选基因的表达量变化, 结果表明, 只有 *OsMH_10G0223300* 和 *OsMH_10G0206700* 在水稻中的基因表达量较高, 其中 *OsMH_10G0223300* 的表达量下降, 但不显著; *OsMH_10G0206700* 的基因表达量在 *LMM43* 突变体中显著上调(图 5)。



A. InDel-ED 值分布图; B. InDel-index 值分布图; C. InDel 通过 2 种算法关联区域信息统计表。
A. Distribution of InDel-ED values; B. Distribution of InDel-index values; C. Statistical table of InDel association region information by 2 algorithms.

图 4 InDel 关联分析图
Fig. 4 InDel association analysis graphs

表 5 最终关联区域信息统计表

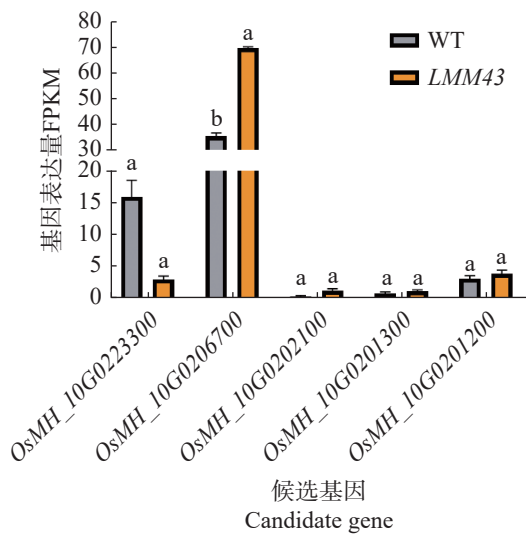
Tab. 5 Statistical table of information on final associated regions

染色体编号 Chromosome_ID	起始位置 Start	终止位置 End	大小/Mb Size/Mb	基因数量 Gene_Number
Chr10	13 830 000	15 200 000	1.37	199

表 6 候选基因列表

Tab. 6 List of candidate genes

序号 Number	基因登录号 Gene_ID	变异类型 Type	功能注释数据库 Annotated_Databases
1	<i>OsMH_10G0226700</i>	Non_Synonymous_Coding	shewanella-like protein phosphatase 1
2	<i>OsMH_10G0225900</i>	Non_Synonymous_Coding	Protein TIFY 11d
3	<i>OsMH_10G0224100</i>	Non_Synonymous_Coding	protein Strubbelig-Receptor Family7 isoform X1
4	<i>OsMH_10G0223300</i>	Non_Synonymous_Coding	red chlorophyll catabolite reductase
5	<i>OsMH_10G0222600</i>	Non_Synonymous_Coding	F-box/kelch-repeat protein SKIP30
6	<i>OsMH_10G0221000</i>	Non_Synonymous_Coding	ethanolamine-phosphate cytidyltransferase
7	<i>OsMH_10G0208500</i>	Non_Synonymous_Coding	protein Gravitropic In The Light 1
8	<i>OsMH_10G0208400</i>	Non_Synonymous_Coding	protein CutA 1, chloroplastic
9	<i>OsMH_10G0208100</i>	Non_Synonymous_Coding	pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase 1, chloroplastic isoform X1
10	<i>OsMH_10G0206700</i>	Non_Synonymous_Coding	calmodulin-binding transcription activator 3 isoform X2
11	<i>OsMH_10G0202100</i>	Non_Synonymous_Coding	ethylene-responsive transcription factor RAP2-13
12	<i>OsMH_10G0201500</i>	Non_Synonymous_Coding	protein NRT1/ PTR FAMILY 8.3 isoform X1
13	<i>OsMH_10G0201300</i>	Non_Synonymous_Coding	probable glucan 1,3-beta-glucosidase A
14	<i>OsMH_10G0201200</i>	Non_Synonymous_Coding	disease resistance protein RGA4-like
15	<i>OsMH_10G0201000</i>	Non_Synonymous_Coding	probable protein phosphatase 2C 71
16	<i>OsMH_10G0200600</i>	Non_Synonymous_Coding	scarecrow-like protein 21
17	<i>OsMH_10G0223500</i>	Frame_Shift	hypothetical protein
18	<i>OsMH_10G0116300</i>	Frame_Shift	uncharacterized protein
19	<i>OsMH_10G0211100</i>	Frame_Shift	tyrosine decarboxylase-like



数据来源于 3 个重复, 误差棒为 3 个重复的平均数±标准差, 以 Fold-Change ≥ 2 且 FDR < 0.05 检验显著性, 不同小写字母表示基因表达差异具有显著性变化。

Data from 3 replicates, error bars are mean $\pm$ standard deviation of 3 replicates, significance is tested by Fold-Change ≥ 2 and FDR < 0.05 , and different lowercase letters indicate significant changes in gene expression differences.

图 5 候选基因表达量分析

Fig. 5 Candidate gene expression analysis

3 讨 论

水稻类病斑自 1965 年被发现后, 到目前为止已有近 100 多个基因被报道^[3]。研究表明, 大部分水稻类病斑突变体对白叶枯病、稻瘟病或纹枯病具有抗性。水稻的抗病机制, 特别是类病斑突变体的抗病机制, 对于提高水稻的抗病性和产量具有重要意义。但是在水稻类病斑形成和激活免疫防御基因高表达的同时, 类病斑突变体的生长发育同样受到了严重的影响, 如突变体 *lms1*^[23]、*spl28*^[24] 等不仅表现出类病斑的表型, 而且植株矮小, 存在早衰现象; *spl29*^[25]、*spl33*^[26] 等突变体的株高、穗长、结实率和千粒重与野生型相比均显著下降。本研究中的 *LMM43* 突变体类病斑属于扩散型的全生育期类病斑突变体, 其生长发育和已报道过的类病斑突变体一样, 类病斑的大面积的蔓延也会使得其农艺性状的下降, 同时植株的矮缩也让 *LMM43* 的结实较为困难。

第 1 个突变体 *sl*^[27], 是自然变异引起的, 后来随着科学技术手段的发展, 人们通过物理、化学及

生物诱变型的多种手段获得突变体。目前已克隆近 50 个水稻类病斑突变体基因, 其中大多数是通过图位克隆获得的^[28], 其中大部分为单个核基因控制隐性遗传, 极少数的如显性基因遗传突变体有 *Spl18*^[7]、*spl-D*^[9]、*Spl26*^[10], 半显性遗传突变体 *LILI*^[29]、*nls1-ID*^[8]。其中, *nls1-ID* 类病斑突变纯合体后代在生长方面存在着严重的缺陷, 发芽后 3 周内就会死亡。所以显性水稻类病斑突变体需要构建 F₂:3 群体使用纯合体进行定位, 在 F₂ 代杂合基因型干扰及纯合后代材料的致死现象, 使得基因定位上存在着较大困难。

BSA-seq 是一种结合了分离体混合分析和高通量测序技术的方法, 可以用于快速定位与特定性状相关的基因, 该技术的核心在于选择具有目标性状极端表型的个体^[13]。所以选择了 SBA-seq 来对 *LMM43* 类病斑突变体的基因进行初步定位, 由于使用 F₂ 代群体构建极端性状混池, 其中, 有显性杂合体的存在, 使得干扰较多, 最终通过分析, 将候选区域确定在了 10 号染色体的 1.37 Mb 的一个区间内, 包括 199 个基因。根据目前报道过已经克隆的 10 号染色体上共有 5 个类病斑突变体, 其中 4 个隐性突变, 1 个显性突变, 都不在本研究的候选区域内^[3], 证明了 *LMM43* 是由一个尚未报道全新的显性基因控制的类病斑突变体。在此基础上通过经候选区域内的基因经多个数据库深度注释后确定了 5 个候选基因。*OsMH_10G0223300* 编码的 PCCR, 是植物中叶绿素降解的关键酶, Tang 等^[30]发现敲除 *OsPCCR1* 会使水稻产生类病斑; *OsMH_10G0206700* 编码的 CAMTA3, 是一类转录因子可感知来自 Ca²⁺ 的应激信号, 具有多种胁迫响应性^[31]; *OsMH_10G0202100* 编码的 RAP2-13, 作为乙烯响应因子(ERF)家族, 可能参与了水稻的抗病等过程; *OsMH_10G0201300* 编码的 β -1, 3-葡聚糖苷酶 A 主要参与病原体防御、碳水化合物代谢和逆境响应等过程^[32]; *OsMH_10G0201200* 编码的 RGA4-like, 是 RGA4 的同源蛋白, Zhu 等^[33]在研究中发现了 RGA4 在水稻中通过与 RGA5 协同作用, 识别稻瘟菌的效应蛋白并激活抗病反应。综上可知, 这些基因可能与类病斑性状的出现相关。通过对候选基因的表达量进行分析发现只有 2 个基因在水稻中的表达量较高, *OsMH_10G0223300* 的表达量下降, *OsMH_10G0206700*

显著上调, 由于碱基突变造成的非同义突变不一定会影响该基因的表达量变化, 所以后续需要通过互补实验进行验证。

本研究从籼稻‘黄华占’(‘HHZ’)经 EMS 诱变后的群体中分离了 1 个水稻类病斑突变体 *LMM43*, 通过对 *LMM43* 类病斑突变体的表型进行全生育期的观察, 是 1 个全生育期扩散型的类病斑突变体, 且 *LMM43* 突变体对白叶枯病菌的抗性显著增强。在 F₂ 代群体中, 通过统计性状分离情况, 得知 *LMM43* 突变体表型是由单个核基因控制的显性性状。利用 BSA-seq 对 *LMM43* 类病斑突变体的基因进行初步定位。在‘HHZ’ $\times$ *LMM43* 杂交构建的 F₂ 代分离群体中进行混池构建, 将基因定位在水稻 10 号染色体的 1 个约 1.37 Mb 的区间内, 该区间包含 199 个预测基因, 综合分析预测出 5 个候选基因, 为后期基因克隆和功能研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 廖海丽, 刘剑镔, 梁毅, 等. 水稻类病斑突变体及其发生机制研究进展 [J]. 杂交水稻, 2024, 39(5): 1–12.
- [2] 张宇, 王金开, 陈小林, 等. 水稻响应白叶枯病菌感染的转录组分析 [J]. 南方农业学报, 2023, 54(3): 815–828.
- [3] 林桢芃, 曾维, 郭铎艳, 等. 水稻类病斑相关基因的克隆及调控机制研究进展 [J/OL]. 分子植物育种, 1–13 (2022-10-17) [2025-01-20] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20221014.1637.014.html>.
- [4] FEKIH R, TAMIRU M, KANZAKI H, et al. The rice (*Oryza sativa* L.) lesion mimic resembling, which encodes an aaa-type ATPase, is implicated in defense response [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2015, 290(2): 611–622.
- [5] XU X, CHEN Z, SHI Y F, et al. Functional inactivation of OsGCNT induces enhanced disease resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice [J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 264.
- [6] BAI W, WANG P, HONG J, et al. *Earlier degraded Tapetum1 (EDT1)* encodes an ATP-citrate lyase required for tapetum programmed cell death [J]. *Plant Physiology*, 2019, 181(3): 1223–1238.
- [7] MORI M, TOMITA C, SUGIMOTO K, et al. Isolation and molecular characterization of a Spotted leaf 18 mutant by modified activation-tagging in rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 63(6): 847–860.
- [8] TANG J, ZHU X, WANG Y, et al. Semi-dominant mutations in the CC-NB-LRR-type R gene, *NLS1* lead to constitutive activation of defense responses in rice [J]. *The Plant Journal*, 2011, 66(6): 996–1007.
- [9] ZHAO X, QIU T, FENG H, et al. A novel Glycine-rich

- domain protein, GRDP1, functions as a critical feedback regulator for controlling cell death and disease resistance in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(2): 608 – 622.
- [10] SHANG H, LI P, ZHANG X, et al. The gain-of-function mutation, *OsSpl26*, positively regulates plant immunity in rice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(22): 14168.
- [11] CAI L, YAN M, YUN H, et al. Identification and fine mapping of lesion mimic mutant *spl36* in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Breeding Science*, 2021, 71(5): 510 – 519.
- [12] KANG S G, LEE K E, SINGH M, et al. Rice lesion mimic mutants (LMM): the current understanding of genetic mutations in the failure of ROS scavenging during lesion formation[J]. *Plants*, 2021, 10(8): 1598.
- [13] 张刚, 朱林, 聂豪杰, 等. 基于文献计量学 BSA 在作物育种领域的应用现状与展望[J]. *遗传*, 2024, 46(5): 360 – 372.
- [14] 林秋云, 王克喜, 胡伟, 等. 水稻矮秆多分蘖突变体 *st1* 的表型特征与遗传分析[J]. *江苏农业科学*, 2024, 52(12): 75 – 79.
- [15] ABE A, KOSUGI S, YOSHIDA K, et al. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(2): 174 – 178.
- [16] 张艳萍, 叶春雷, 齐燕妮, 等. 基于 BSA-Seq 定位胡麻耐盐相关基因位点[J]. *北方园艺*, 2025(3): 27 – 34.
- [17] 陈丽, 孙建昌, 王昕. 基于 BSA-seq 法的水稻稻瘟病抗性基因定位[J]. *中国稻米*, 2024, 30(6): 35 – 41.
- [18] 魏荣华, 尹明, 王文生, 等. 基于 BSA-seq 发掘水稻抽穗期相关 QTLs 及候选基因[J]. *中国农业科技导报*, 2024, 26(9): 12 – 24.
- [19] 杜灿灿, 曾生元, 景德道, 等. 基于 BSA-seq 的一个苗期黄化转绿突变体基因定位[J]. *江苏农业科学*, 2024, 52(12): 53 – 60.
- [20] 徐乾坤. 水稻类病斑基因 LML11 的图位克隆与功能分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2021.
- [21] MANOSALVA P M, BRUCE M, LEACH J E. Rice 14-3-3 protein (GF14e) negatively affects cell death and disease resistance[J]. *The Plant Journal*, 2011, 68(5): 777 – 787.
- [22] 孙天宇. 大豆开花期相关数量性状位点 (QTL) 的定位 [D]. 北京: 中国科学院大学 (中国科学院东北地理与农业生态研究所), 2017.
- [23] 夏赛赛, 崔玉, 李凤菲, 等. 水稻类病斑早衰突变体 *lmps1* 的表型鉴定与基因定位[J]. *作物学报*, 2018, 45(1): 46 – 54.
- [24] QIAO Y, JIANG W, LEE J, et al. *SPL28* encodes a clathrin-associated adaptor protein complex 1, medium subunit $\mu 1$ (AP1M1) and is responsible for spotted leaf and early senescence in rice (*oryza sativa*)[J]. *New Phytologist*, 2010, 185(1): 258 – 274.
- [25] WANG Z, WANG Y, HONG X, et al. Functional inactivation of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1 (UAP1) induces early leaf senescence and defence responses in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(3): 973 – 987.
- [26] WANG S, LEI C, WANG J, et al. SPL33, encoding an eEF1A-like protein, negatively regulates cell death and defense responses in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(5): 899 – 913.
- [27] TAKAHASHI A, KAWASAKI T, HENMI K, et al. Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 1999, 17(5): 535 – 545.
- [28] YIN W, ZHONG Q, ZHU Z, et al. LMI1 a DUF292 protein family gene, regulates immune responses and cell death in rice[J]. *The Crop Journal*, 2024, 12(6): 1619 – 1632.
- [29] ZHOU Q, ZHANG Z, LIU T, et al. Identification and map-based cloning of the light-induced lesion mimic mutant 1 (*LILI*) gene in rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 2122.
- [30] TANG Y, LI M, CHEN Y, et al. Knockdown of OsPAO and OsRCCR1 cause different plant death phenotypes in rice[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(16): 1952 – 1959.
- [31] NOMAN M, AYSHA J, KETEHOU LI T, et al. Calmodulin binding transcription activators: an interplay between calcium signalling and plant stress tolerance [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2021, 256: 153327.
- [32] 万凌琳. 水稻 β -1, 3 葡聚糖苷酶基因 *OsgI* 的功能研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2010.
- [33] ZHU T, WU X, YUAN G, et al. A resurfaced sensor NLR confers new recognition specificity to non-MAX effectors[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2025, 67(1): 11 – 14.

Preliminary localization of a rice lesion mimic gene based on BSA-seq

LU Dongying^{1,2#}, CHEN jie², LI Ciyun², YANG Jianfei², NIU Xiaolei^{1*}

(1. School of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: Lesion mimic mutants (LMM) are important in plant immunity and growth and development studies. The aim of this study was to perform a preliminary localization of a rice lesion mimic gene by BSA-seq (Bulked Segregant Analysis sequencing) technique. First, we screened a mutant, *LMM43*, from the population of indica rice cultivar Huang Huazhan (HHZ) mutagenized by EMS for the appearance of lesion-like symptoms, and phenotyped the F₂ segregant population obtained by crossing *LMM43* with the wild-type parent to determine the mode of inheritance of the lesion-like trait. High-throughput sequencing was performed on mixed samples of DNA from individuals with disease-like spot phenotypes and normal individuals using BSA-seq technology. Through the association analysis of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) and Insertion and Deletion (InDel) differences combined with phenotypic analysis, the target genes were preliminarily localized in a segment of rice chromosome 10, which is about 1.37 Mb in length and contains 199 genes. The length of this interval is about 1.37 Mb, which contains 199 genes, and five candidate genes were finally identified. The preliminary localization results laid the foundation for further gene cloning and functional verification, and helped to deeply understand the molecular mechanism of rice-like spot mutants, which is of great theoretical and applied value for the study of rice disease resistance breeding and plant immunity mechanism.

Keywords: Rice; Lesion mimic; Disease resistance; BSA-seq

(责任编辑: 潘学峰)