

水稻子预 44 和江南香糯基因组比较鉴定稻瘟病抗性相关基因

李金璐[#] 张慧[#] 焦泽宇 刘剑宇 韩光煜 卓晓轩 罗琼^{*}

(云南农业大学 农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室/省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201; [#]共同第一作者; ^{*}通信联系人, E-mail: qiongbf@aliyun.com)

Identification of Blast Disease Resistance-related Genes by Genomic Sequence Comparison of Rice Variety Ziyu 44 and Jiangnanxiangnuo

LI Jinlu[#], ZHANG Hui[#], JIAO Zeyu, LIU Jianyu, HAN Guangyu, ZHUO Xiaoxuan, LUO Qiong^{*}

(State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Ministry of Education Key Laboratory of Agricultural Biodiversity for Plant Disease Management, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; [#]These authors contributed equally to this work; ^{*}Corresponding author, E-mail: qiongbf@aliyun.com)

Abstract: 【Objective】 Ziyu 44 is indigenous *japonica* rice from Yunnan Province of China with durable broad-spectrum resistance to *M. oryzae*. In order to identify novel candidate rice blast resistance-related genes from Ziyu 44, 【Method】 we performed the whole genome sequencing of Ziyu 44 and susceptible variety Jiangnanxiangnuo(JNXN). Then we checked and summarized SNPs/InDels of high-throughput sequencing data by software GATK(3.4-46), and screened out disease resistance-related genes with SNPs/InDels polymorphic loci at DNA level of Ziyu 44 and JNXN. 【Result】 4 118 170 045 bp and 2 995 054 509 bp genomic data of Ziyu 44 and Jiangnanxiangnuo were respectively produced using Hiseq X10 PE150 platform. The alignment rates to the reference genomes (Ensembl release 31) were 98.56% and 98.30%, respectively. A total of 922 resistance-related differential genes were identified between Ziyu 44 and JNXN. Further, combined with the result of gene mapping, we identified a new blast resistance candidate gene in Ziyu 44. 【Conclusion】 Our results provide valuable information for cloning of new rice blast resistance new genes, and lay an important foundation for exploring the molecular mechanism of durable broad-spectrum resistance to rice blast in Ziyu 44.

Key words: rice; rice blast; genome sequencing; resistance-related genes

摘要: 【目的】子预 44 是一具有广谱持久稻瘟病抗性的云南地方粳稻品种。为了鉴定子预 44 中候选稻瘟病抗性相关基因, 【方法】本研究利用高通量测序技术 (High-throughput sequencing) 对子预 44 和感病水稻江南香糯进行了全基因组测序。而后使用软件 GATK(3.4-46)对高质量测序结果进行 SNP 和 InDel 的检测和统计, 进一步筛选出子预 44 和江南香糯 DNA 水平存在 SNPs/InDels 多态性抗病相关基因。【结果】通过 Hiseq X10 PE150 平台分别获得了 4 118 170 045 bp 和 2 995 054 509 bp 子预 44 和江南香糯的基因组数据, 比对到参考基因组(Ensembl release 31) 的比对率分别为 98.56% 和 98.30%。在抗病水稻子预 44 和感病水稻江南香糯之间鉴定了 922 个纯合突变的差异抗病相关基因。结合基因定位结果, 在子预 44 中鉴定了一个新的抗稻瘟病候选基因。【结论】研究结果为子预 44 中抗稻瘟病新基因的克隆提供了参考, 对子预 44 广谱持久抗瘟分子机制的研究奠定了基础。

关键词: 水稻; 稻瘟病; 基因组测序; 抗病相关基因

中图分类号: S435.111.4⁺1; S511.034

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2020)01-0008-09

水稻是世界上近一半人口的主粮, 随着世界人口的不断增长, 预计到 2030 年水稻生产至少需要增加 40% 的产量才能满足人们的生活所需^[1]。由稻瘟病菌引起的稻瘟病是水稻生产上最具毁灭性的

病害, 全球每年因稻瘟病造成稻谷减产 10%~30%, 每年减产的粮食足够养活 6 千万人口^[2]。目前, 稻瘟病防治主要采用的是药剂防治和种植抗病品种。虽然药剂防治对稳定水稻产量起到了非常重要的

收稿日期: 2019-06-12; 修改稿收到日期: 2019-06-28。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2016YFD0100600); 国家自然科学基金资助项目 (31160223); 云南省高校科技创新团队支持计划资助项目 (IRTSTYN)。

作用,但农药的重复大量使用带来了严重的环境污染^[3, 4]。利用抗病基因培育抗病品种是控制稻瘟病最经济有效和环保的方法^[3-7]。目前已鉴定的主效抗性基因位点已超过 100 个,数量抗性位点已超过 350 个^[5, 8, 9],已克隆的抗稻瘟病基因约 30 个^[5, 6, 9-12]。*R* 基因介导的小种特异性抗性效果明显、抗性强,在水稻育种中容易被利用,所以目前生产上使用的抗病品种多属于这种抗性。然而,*R* 基因介导的抗性会由于病原的快速进化而丧失,因而抗性品种推广种植 3~5 年后其抗性就逐渐丧失^[13, 14]。此外,我国新育成的一些水稻品种抗瘟效果并不太理想。例如,在 2004–2008 年间,国审的 174 个品种对稻瘟病的平均抗病指数仅为 5.5,处于中感水平^[7]。因此,优异的稻瘟病抗性新基因的发掘,尤其是广谱抗性基因的鉴定和利用对保证水稻产量具有重要意义。

基因克隆最常采用的策略是图位克隆,目前绝大多数稻瘟病抗性基因也都是利用图位克隆方法克隆的。但由于抗稻瘟病基因克隆过程中不仅存在抗性评价困难、克隆周期较长等缺陷,且 2009 年以后克隆的抗稻瘟病基因大多是已经克隆的等位或是直系同源基因^[10]。近年来,测序技术不断完善和发展,测序质量不断提高,测序成本逐渐降低,可利用的高质量水稻基因组数据不断增加,基因组学技术已成为功能基因组研究中广泛使用的手段,极大地提高了重要性状功能基因鉴定的效率^[11, 15]。

子预 44 是一具有广谱持久抗瘟性的云南地方粳稻品种^[16]。我们在子预 44 中鉴定了多个主效和微效抗瘟基因位点^[17-22],发现子预 44 第 6 染色体短臂上 10.008~11.043 Mb 区间携带一个抗多个稻瘟病菌的主效基因。但由于水稻第 6 染色体短臂上抗稻瘟病基因成簇分布,且序列高度保守^[23],通过常规的 PCR 方法进行该区域 DNA 片段的扩增和分析鉴定候选基因不仅耗时费钱,而且结果不理想。为了能快速有效地鉴定和克隆已定位的抗病基因,我们尝试在基因初步定位的基础上,进行抗病亲本子预 44 和感病亲本江南香糯的全基因组重测序和序列比较分析,筛选鉴定抗病候选基因。

1 材料与方法

1.1 水稻材料

抗病粳稻品种为子预 44 和中花 11。感病粳稻品种为日本晴、台北 309、江南香糯和丽江新团黑谷。抗病籼稻品种为 9311 和地谷。感病籼稻品种为 Kasalath。以上水稻材料均由本实验室保存。

1.2 稻瘟病菌菌株

稻瘟菌株 LP33、LP174 和 LP29-3 由何月秋教授课题组提供, H53 由本实验室从黑龙江采集的稻瘟病病样分离保存。

1.3 水稻育苗

选取健康饱满的成熟水稻种子, 75% 酒精消毒 40 s, 无菌水清洗 3 次, 20% 次氯酸钠消毒 40 min, 期间每 10 min 轻微晃动一次, 消毒完成后用无菌水清洗 3 次。将消毒后的种子浸泡于无菌水中于 37℃ 下吸胀, 待种子露白后转移至铺有灭菌滤纸的培养皿中, 加少量无菌水后于 37℃ 下催芽。幼芽长至 0.5 cm 左右时播于特制的 96 孔 PCR 育苗板上, 放置于营养液(参照国际水稻研究所的配方, 并依据本实验室实际使用情况略作调整)中, 室温、正常光照条件下培养。

1.4 水稻幼苗基因组 DNA 提取

采用稍作修改的 CTAB 法提取水稻幼苗基因组 DNA。新鲜水稻幼苗剪碎后置于液氮预冷的研钵中, 加入液氮快速研磨成粉, 分装于 2 mL 离心管中, 每管分装约 0.1 g 水稻样品。加入 650 μL 已于 65℃ 下预热的 CTAB 提取液, 充分震荡混匀。65℃ 下水浴 30 min (每 10 min 摇晃混匀一次, 以免组织结块)。加入等体积 650 μL 氯仿, 颠倒混匀, 12 000 r/min 下离心 10 min。上清转入新的 1.5 mL 离心管中, 加入等体积 -20℃ 预冷的异丙醇, 轻轻颠倒混匀, 于 -20℃ 下静置 30 min, 12 000 r/min 下离心 5 min。弃上清, 沉淀加 500 μL 75% 酒精洗涤, 12 000 r/min 下离心 2 min, 弃上清, 洗涤 2~3 次, 用无水乙醇洗一次。离心管开盖于超净工作台晾干。

晾干的 DNA 沉淀加入 20~50 μL 双蒸水充分溶解后, 用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 并同已知浓度的 λ DNA 分子量标准比较估计其浓度。于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.5 子预 44 和江南香糯全基因组重测序

子预 44 是云南地方品种麻早谷与城堡 2 号杂交选育而成的广谱抗稻瘟病的高原粳稻, 对 6 群 16 个中国稻瘟病菌生理小种(ZA1, ZA49, ZA57, ZA61; ZB1, ZB13, ZB17, ZB25; ZC1, ZC3, ZC13, ZC15; ZE1, ZE3; ZF1 和 ZG1)表现广谱抗性^[16]。江南香糯是一低海拔高感稻瘟病的粳糯水稻品种, 是抗稻瘟病基因克隆中常用的感病亲本^[24]。在前期研究中, 我们利用子预 44 和江南香糯作为杂交亲本构建的 F₇ 重组自交系(RIL F₇)群体, 进行了子预 44 中数量抗性位点分析^[20]; 利用子预 44 和江南香糯杂交构建的 F₂ 群体, 在子预 44 中定位了抗稻瘟

病菌 ZE1、LP33、LP11 和 LP36 的主效抗瘟基因 *Pi-zy(t)*^[17]、*Pi-zy3(t)*^[18]、*Pi-zy6(t)*^[21]和 *Pi-zy4(t)*^[22]。为了进一步克隆这些主效抗病基因,本研究利用高通量测序技术对子预 44 和江南香糯进行了基因组重测序和序列比较分析。

参照文献[17]提取子预44和江南香糯单株基因组 DNA,用酶随机打断成短的 DNA 片段后,进行末端修复。然后在 DNA 片段两端连接 dA 尾,并连接测序接头。加上接头的 DNA 片段经过 AMPure XP 磁珠纯化,选择 300~400 bp 范围的片段进行 PCR 扩增,构建测序文库。建好的文库经过纯化、库检,HiSeq X10 PE150 上机测序。

1.6 数据过滤与质量分析

为了保证数据质量,在信息分析前对原始数据进行质控,通过数据过滤减少数据噪音。对下机的测序序列片段(clean reads)再进行更严格的过滤,得到高质量的测序序列片段(High quality clean reads),用于后续的信息分析。过滤的步骤包括去除含接头的,含 N 比例大于 10%的以及低质量的(质量值 $Q \leq 10$ 的碱基数占整条测序序列片段的 50%以上)测序序列片段。

1.7 比对到参考基因组和覆盖度统计

使用比对软件 *bwa* 0.7.12^[25]和 *Mem* 算法,将过滤后的测序序列片段比对到参考基因组(Ensembl release 31)上,比对参数设置为 -k 32 -M。

序列片段比对之后的结果用 *Picard* 1.129 (*Picard*: [http:// sourceforge.net/projects/picard/](http://sourceforge.net/projects/picard/))进行标记,并统计插入片段数量。

用 *Bedtools* 2.25.0^[26]软件进行覆盖度统计。

1.8 SNPs 和 InDels 统计

在基因组水平上由单个核苷酸或者几个核苷酸的插入或缺失所形成的 DNA 序列多态性,为变异。使用软件 *GATK*(3.4-46)^[27]的 *UnifiedGenotyper* 模块将处理好的比对文件进行多个样本的变异检测,检测到的变异使用 *VariantFiltration* 进行过滤,过滤参数为 -Window 4, -filter “QD < 4.0 || FS > 60.0 || MQ < 40.0”, -G_filter “GQ < 20”。用 *ANNOVAR*^[28]对检测出的变异进行功能注释。

1.9 候选抗病相关基因鉴定

将子预 44 和江南香糯基因组测序获得的数据对应到日本晴基因组中,根据日本晴基因组中基因注释的结果,鉴定子预 44 和江南香糯中的抗病相关基因。筛选出子预 44 和江南香糯之间 DNA 水平上存在 SNP/InDel 多态性的基因,并统计差异位点。筛选出分布在抗病相关基因编码区的 SNP/InDel 差

异位点,进一步筛选出非同义纯合突变的差异基因,作为初步候选抗病相关基因。结合前期基因定位结果,进一步鉴定候选抗病相关基因。

1.10 稻瘟病菌孢子悬浮液制备

参照文献[17],进行菌株活化培养和产孢培养,将孢子浓度调制成 2×10^5 个/mL,配成终浓度为 0.4%的明胶孢子悬浮液,待用。

1.11 水稻幼苗期接种及调查

水稻幼苗长到 3~4 叶期,将其转移至恒温接种室,配制 2×10^5 /mL 的孢子悬浮液进行喷雾接种。接种后在温度 25℃,湿度 95%的条件下,黑暗培育 24 h 后,12 h 光照和 12 h 黑暗交替培育 5~7 d,参照文献[29]采用 6 级分级法进行病斑类型调查。

1.12 DNA 片段的 PCR 扩增、回收和测序

PCR 扩增采用 50 μ L 反应体系: DNA 模板 1 μ L(10 ng/ μ L),正反引物各 0.75 μ L(10 μ mol/L),10 \times 缓冲液 5 μ L, dNTPs 4 μ L(2.5 mmol/L), *MgSO*₄ 2 μ L, *KOD-PLUS* 0.4 μ L, *DMSO* 0.5 μ L, *ddH*₂O 35 μ L。95℃下变性 5 min,然后 95℃下 15 s,57 \pm 2℃下 15 s,68℃下 30 s/1000 bp,35 个循环,72℃下延伸 5 min。

PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶,1 \times TAE 电泳缓冲液中,120 V 电压电泳~30 min,待 DNA 分子量标准各个条带区分明显后于切胶台切取目的条带。采用北京全式金公司的胶回收试剂盒(*Easy Pure*[®] Quick Gel Extraction Kit),按每 0.1g 回收胶加 300 μ L 溶胶液(*Binding Buffer*),65℃下加热溶解。溶胶加入分离柱(最多 700 μ L),10 000 r/min 下离心 1 min,将液相加入分离柱重复此步骤。弃液相,再加 300 μ L 新的溶胶液,10 000 r/min 下离心 1 min。弃液相,加入 700 μ L 已加入无水乙醇的清洗液(*Wash Buffer*),10 000 r/min 下离心 1 min。弃液相,重复此步骤 1 次。弃液相,空管离心,10 000 r/min 下离心 2 min。弃液相,开盖于 65℃下加热 3 min。换干净 1.5 mL 离心管,加入 30 μ L 65℃下预热的 *ddH*₂O。65℃下闭盖保温 3 min,1300 r/min 下离心 2 min,收集洗脱液。

连接反应:回收产物 0.5~4 μ L,北京全式金公司平末端克隆载体(*pEasy-Blunt Simple Cloning Vector*)1 μ L,补充 *ddH*₂O 到总体积 5 μ L,混匀。25℃下连接 5~30 min(连接时间因连接片段大小而异:0.1~1 kb 为 5~10 min;1~2 kb 为 10~15 min;2~3 kb 为 15~20 min;大于 3 kb 为 20~30 min)。

连接反应结束后,产物中加入 50 μ L 大肠杆菌感受态 *DH5 α* ,轻弹混匀。冰浴 30 min,42℃水浴热击 1 min,立即放冰上 2 min,然后加入 1 mL 的空

表 1 子预 44 和江南香糯基因组序列数据

Table 1. Summary of the sequence data for Ziyu 44 and Jiangnanxiangnuo.

样品 Sample	高质量 Reads 数 HQ clean reads number	读长 Reads length/bp	碱基数 Base number/bp	Q30(%)
子预 44 Ziyu 44	41 021 044	101/101	4 118 170 045	3 928 449 674(95.39%)
江南香糯基因 Jiangnanxiangnuo	29 931 088	101/101	2 995 054 509	2 840 051 178(94.82%)

白 LB 培养基, 于 37℃、200 r/min 下摇床培养 60 min, 涂布于含有卡那霉素的 LB 平板, 吹干, 37℃ 下倒置培养过夜。挑取单菌落于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 下培养 4 h 后, 取菌液 1 μL 进行 PCR 检测, 能扩增出目的片段的单菌落菌液送昆明硕擎生物有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 子预 44、江南香糯基因组重测序

通过 Hiseq X10 PE150 平台获得的子预 44 和江南香糯高质量测序片段 (HQ Clean Reads) 分别为 41 021 044 条(4 118 170 045 bp)和 29 931 088 条(2 995 054 509 bp), 覆盖参考基因组 (Ensembl release 31) 单末端的测序片段分别为 104 368 条和 64 567 条, 覆盖参考基因组双末端的测序片段分别为 20 163 591×2 和 14 678 401×2, 未比对上的测序片段分别为 589 494 条和 509 719 条, 比对率分别为 98.56%和 98.30%。数据读长为 101 bp, Q30 分别为 95.39%和 94.82%(Q30 是指质量值大于 30 的碱基所占百分比, 测序碱基正确率为 99.9%, 表 1)。

2.2 子预 44 和江南香糯基因组比较分析及抗病相关基因鉴定

将子预 44 和江南香糯基因组测序获得的数据对应到日本晴基因组中, 根据与日本晴基因组中的基因注释的比对结果, 在子预 44 和江南香糯中共鉴定了 4510 个抗病相关基因对。这些基因广泛分布于水稻的 12 条染色体上。不同染色体上的基因数目存在差异, 第 1 染色体上有 640 个基因, 数量最多, 占总数的 14%。第 9 染色体上的基因数最少, 为 199 个(5%, 图 1)。

进一步分析发现, 4 510 个抗病相关基因中有 1769 个基因在子预 44 与江南香糯之间存在 DNA 水平上的 SNP/InDel 多态性, 差异位点达 22 537 个, 广泛分布于基因的上游、下游、外显子以及内含子区域(图 2)。

在这 22 537 个 SNP/InDel 多态性位点中, 有 5063 个 SNP/InDel 差异位点分布在 987 个抗病相关基因的编码区, 并导致了氨基酸水平的差异。其中,

SNP/InDel 包括四种类型, 最多的为非同义 SNP, 共有 4 732 个(表 2)。将包含不同 SNP/InDel 位点的抗性相关基因进行维恩分析, 发现含有非同义 SNP 的基因数目最多, 为 728 个(图 3)。

978 个差异基因中有 922 个为纯合突变的差异基因(附表 1), 它们不均匀地分布在水稻的 12 条染色体上, 其中, 第 1、11 和 6 染色体较多, 分别有 168 个(17%)、158 个(16%)和 114 个(12%)。第 11 和 6 染色体也是到目前为止鉴定和克隆抗稻瘟病

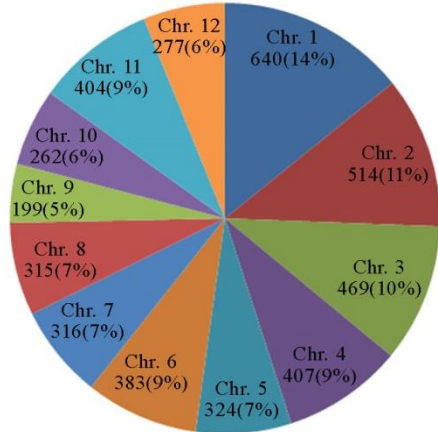


图 1 抗病相关基因在水稻的分布
Fig. 1. Distribution of resistance related genes on rice chromosomes.

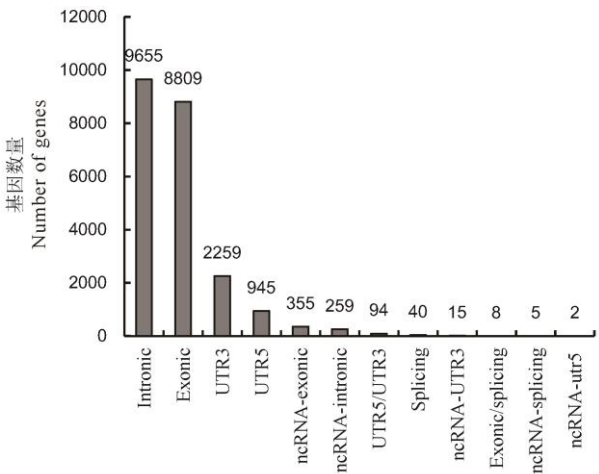
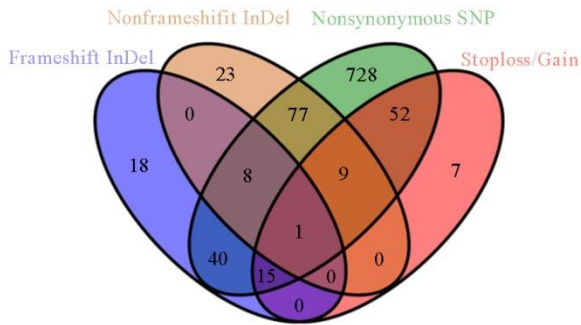


图 2 子预 44 与江南香糯间抗病相关基因多态性
Fig. 2. Polymorphisms of disease resistance-related genes between Ziyu 44 and Jiangnanxiangnuo.

表 2 非同义突变的 SNP/InDel
Table 2. Nonsynonymous mutation of SNP/InDel.

突变类型 Mutant type	终止缺失/获得 Stop loss/gain	非同义 SNP Non-synonymous SNPs	非移码 InDel Non-frame shift InDels	移码 InDel Frame shift InDels
数量 Number	90	4732	144	97



Frameshift InDel-引起氨基酸编码移码突变的插入缺失突变;
Nonframeshift InDel-不导致氨基酸编码移码的插入缺失突变;
Nonsynonymous SNP-引起氨基酸差异的单核苷酸多态性;
Stoploss/gain-SNP/InDel 突变引起功能缺失或获得的氨基酸翻译终止或延伸。

Frameshift InDel, Insertion deletion mutation of amino acid coding frameshift; Nonframeshift InDel, Insertion deletion mutation of amino acid coding nonframeshift; Nonsynonymous SNP, Single nucleotide polymorphisms causing amino acid differences; Stoploss/gain, Single nucleotide polymorphisms (SNP)/Insertion deletion mutation (InDel) causing premature termination or not end of amino acid translation.

图 3 子预 44 和江南香糯间抗性相关基因非同义突变
Fig. 3. Nonsynonymous mutation of SNP/InDel between Ziyu 44 and Jiangnanxiangnuo.

基因最多的染色体。第 1 染色体虽然预测的抗病相关基因数量较多,但克隆的基因只有 4 个位于第 1 染色体上。该结果对子预 44 中抗稻瘟病基因的鉴定具有重要参考价值(图 4)。

2.3 子预 44 中一个新的抗稻瘟病候选基因的鉴定

利用 LP33、LP29-3、LP174、H53 等多个稻瘟病菌株进行子预 44 中抗稻瘟病主效基因定位发现,子预 44 中抗这些菌株的基因均定位于水稻第 6 染色体短臂上 10.008–11.043 Mb 之间。进一步利用该定位区间的多态性标记和扩大的 F₂ 群体进行基因精细定位,缩小定位区间的工作却困难重重,进展缓慢。基于此,结合定位区间内抗病相关基因的预测和子预 44 与江南香糯基因组的比较分析发现,该区间内 1 个预测的丝/苏氨酸蛋白激酶编码基因 *LOC_Os06g18820*,在子预 44 和江南香糯等位基因间有 9 个核苷酸的缺失/插入(GCCGCCGCC)突

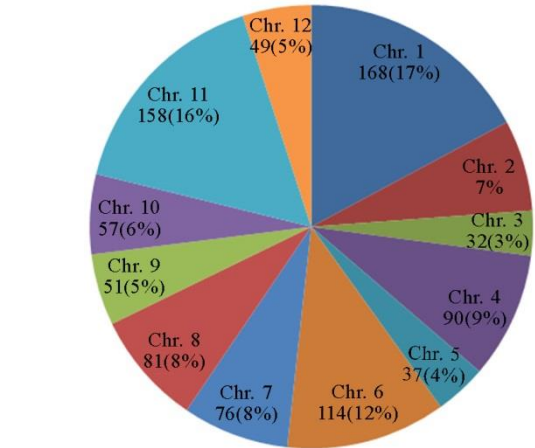


图 4 922 个抗病相关基因在水稻染色体上的分布
Fig. 4. Distribution of 922 resistance-related genes on rice chromosomes.

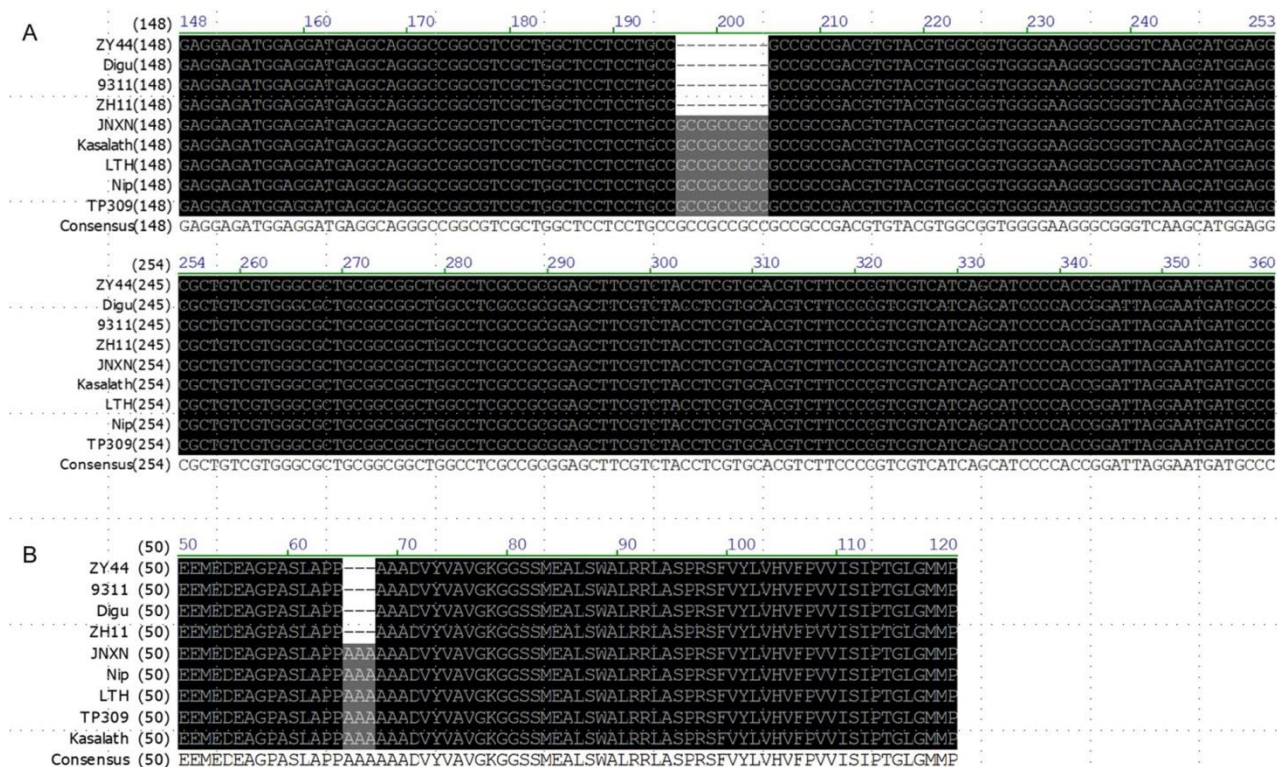
变(图 5-A),导致了编码蛋白 3 个氨基酸(AAA)的缺失/插入差异(图 5-B)。

进一步根据 *LOC_Os06g18820* 基因序列设计特异的 PCR 引物,分别从 3 个抗病水稻(9311、中花 11、地谷)和 4 个感病水稻(日本晴、丽江新团黑谷、Kasalath、台北 309)中扩增其基因片段。序列分析显示,3 个抗病水稻中 *LOC_Os06g18820* 基因的 DNA 序列与子预 44 一致,而 4 个感病水稻中该基因的 DNA 序列与江南香糯一致(图 5-A)。

为进一步确定 9 个水稻材料中基因 *LOC_Os06g18820* 在 DNA 水平上的差异是否与其抗/感表型一致,利用稻瘟病菌株 LP174,对 9 个水稻材料进行了苗期喷雾接种鉴定。结果表明,子预 44、9311、中花 11 和地谷对 LP174 的抗病型类似,江南香糯、日本晴、丽江新团黑谷、Kasalath 和台北 309 对 LP174 表现相似的感病特征(图 6),抗/感表型与 *LOC_Os06g18820* 基因在分子水平的差异一致。因此,推测该基因可能是子预 44 中抗稻瘟病菌株 LP174 的候选基因。

3 讨论

到目前,鉴定的抗稻瘟病主效基因已超过 100 个,分布在水稻除第 3 染色体以外的其他所有染色



ZY44—子预 44; Digu—地谷; ZH11—中花 11; JNXN—江南香糯; Nip—日本晴; LTH—丽江新团黑谷; TP309—台北 309。

ZY44, Ziyu 44; ZH11, Zhonghua 11; JNXN, Jiangnanxiangnuo; Nip, Nipponbare; LTH, Lijiangxintuoheigu; TP309, Taipei 309.

图 5 9 个水稻材料中 *LOC_Os06g18820* 基因核苷酸序列和氨基酸序列比对

Fig. 5. Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of *LOC_Os06g18820* from nine rice varieties.



ZY44—子预 44; Digu—地谷; ZH11—中花 11; JNXN—江南香糯;

Nip—日本晴; LTH—丽江新团黑谷; TP309—台北 309。

ZY44, Ziyu 44; ZH11, Zhonghua 11; JNXN, Jiangnanxiangnuo; Nip,

Nipponbare; LTH, Lijiangxintuoheigu; TP309, Taipei 309.

图 6 9 个水稻材料喷雾接种稻瘟病菌株 LP174 的症状

Fig. 6. Symptoms of nine rice varieties inoculated with *M. oryzae* LP174.

体上。其中以第 6、11 和 12 染色体分布较多，占总数的一半以上^[30]。本研究结果显示，第 3 染色体上预测的抗病相关基因有 469 个，占总数的 10%，仅次于第 1 和 2 染色体，多于定位和克隆抗稻瘟病基因数量较多的第 6(383)、11(404)和 12(277)染色体，居第 3 位（图 1）。这与目前定位和克隆的抗稻瘟病基因在水稻染色体上的分布不完全一致。是什么原因导致几乎没有能通过图位克隆的方法在第 3 染色体上鉴定和克隆到抗稻瘟病基因呢？对于子预 44 和江南香糯间非同义突变的差异抗性相关基因的进一步分析发现，子预 44 和江南香糯间非同义突变的差异抗性相关基因主要分布在第 1、6 和 11 染色体上，也就是说，虽然第 3 染色体上预测的抗病相关基因数量较多，但仅有 5% 预测的抗病相关基因在两个抗、感水稻间存在非同义突变差异，差异基因的数目是 12 条染色体中最少的（图 4），这与目前鉴定和克隆的抗稻瘟病基因主要分布在水稻第 1、6、11 和 12 染色体上，第 3 染色体上鉴定的抗病基因数量最少的结果一致^[15]。我们推测第 3 染色体上预测的抗病相关基因很可能多为没有抗性功能的假基因，或微效基因位点，也有可能这些抗病基因与病原菌无毒基因间的相互作用不符合

“基因对基因”假说。Li 等^[16]通过 66 份水稻材料的基因组测序和分析,在水稻第 3 染色体上鉴定了一个编码 C₂H₂ 结构域转录因子的隐性广谱抗瘟基因 *bsr-d1*, 实现了水稻第 3 染色体上抗稻瘟基因克隆数量零的突破,为这一推论提供了一定的证据,但仍有待相关研究的进一步证实。

目前,已定位和克隆的抗稻瘟病基因除 *pi21*^[31], *pi55(t)*^[32]和 *pi66(t)*^[14]为隐性抗病基因外,其余都是显性抗病基因。图位克隆方法是定位和克隆水稻各种功能基因普遍采用的经典方法,并卓有成效。然而近年来利用这种方法克隆的抗稻瘟病基因大多数是已克隆基因的等位或是直系同源基因^[10]。Shang 等^[33]在籼稻品种 93-11 和粳稻品种日本晴基因组中编码的 NBS-LRR 基因分析和比较的基础上,设计假基因化分子标记,从地谷中克隆了抗稻瘟病基因 *Pid3*^[33]。最近, Li 等^[16]通过 66 份水稻材料的基因组测序和分析,在水稻第 3 染色体上鉴定的隐性广谱抗瘟基因 *bsr-d1*。我们在基因定位的基础上,结合两亲本基因组序列的比较分析,在水稻第 6 染色体短臂上鉴定一个新的编码丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (serine threonine kinase) 抗多个稻瘟病菌株的候选抗瘟基因(*LOC_Os06g18820*)。这些结果表明,随着高通量基因组测序技术的快速发展,通过基因组测序和比较基因组学的方法鉴定和克隆新的水稻抗病基因,是一种省时有效的方法。

子预 44 是一具有广谱持久稻瘟病抗性的云南地方粳稻品种,利用高通量测序技术 HiSeq X10 PE150 进行了子预 44 和感病水稻江南香糯的全基因组重测序,分别获得了高质量的基因组数据 4 118 170 045 bp 和 2 995 054 509 bp,比对到参考基因组 (Ensembl release 31) 的比对率分别为 98.56%和 98.30%。在子预 44 和江南香糯之间鉴定了 922 个纯合突变的差异抗病相关基因,明确了这些基因的染色体分布,为子预 44 中抗病新基因的克隆和育种利用研究提供了有价值的信息,为研究子预 44 的广谱抗瘟分子机制奠定了重要的基础。

谢辞:感谢中国科学院遗传与发育生物学研究所程宽研究员和梁承志研究员在水稻基因组测序中提供的帮助,感谢广州基迪奥生物科技有限公司在数据分析中的帮助。

辅助信息:有一个辅助性表格S1放在《中国水稻科学》网站(<http://www.ricesci.cn>)上。

参考文献:

- [1] Khush G S. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 59(1): 1-6.
- [2] Skamnioti P, Gurr S J. Against the grain: Safeguarding rice from rice blast disease[J]. *Trends Biotechnology*, 2009, 27(3): 141-150.
- [3] Hu K M, Qiu D Y, Shen X L, Li X H, Wang S P. Isolation and manipulation of quantitative trait loci for disease resistance in rice using a candidate gene approach[J]. *Molecular Plant*, 2008, 1(5): 786-793.
- [4] Miah G, Rafii M Y, Ismail M R, Puteh A B, Rahim H A, Asfaliza R, Latif M A. Blast resistance in rice: A review of conventional breeding to molecular approaches[J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(3): 2369-2388.
- [5] Deng Y W, Zhai K, Xie Z, Yang D Y, Zhu X D, Liu J Z, Wang X, Qin P, Yang Y Z, Zhang G M, Li Q, Zhang J F, Wu S Q, Milazzo J, Mao B, Wang E T, Xie H A, Tharreau D, He Z H. Epigenetic regulation of antagonistic receptors confers rice blast resistance with yield balance[J]. *Science*, 2017, 355(6328): 962-965.
- [6] Zhou X G, Liao H C, Chern M, Yin J J, Chen Y F, Wang J P, Zhu X B, Chen Z X, Yuan C, Zhao W, Wang J, Li W T, He M, Ma B T, Wang J C, Qin P, Chen W L, Wang Y P, Liu J L, Qian Y W, Wang W M, Wu X J, Li P, Zhu L H, Li S G, Ronald PC, Chen X W. Loss of function of a rice TPR-domain RNA-binding protein confers broad-spectrum disease resistance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(12): 3174-3179.
- [7] 何峰, 张浩, 刘金灵, 王志龙, 王国梁. 水稻抗稻瘟病天然免疫机制及抗病育种新策略. *遗传*, 2014, 36(8): 756-765.
He F, Zhang H, Liu J L, Wang Z L, Wang G L. Recent advances in understanding the innate immune mechanisms and developing new disease resistance breeding strategies against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in rice[J]. *Hereditas(Beijing)*, 2014, 36(8): 756-765. (in Chinese with English abstract)
- [8] Tanweer F A, Rafii M Y, Sijam K, Rahim H A, Ahmed F, Latif M A. Current advance methods for the identification of blast resistance genes in rice[J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2015, 338(5): 321-334.
- [9] Liang Z J, Wang L, Pan Q H. A new recessive gene conferring resistance against rice blast[J]. *Rice*, 2016, 9(1): 47. doi: 10.1186/s12284-016-0120-7.
- [10] Xu X, Lv Q M, Shang J J, Pang Z Q, Zhou Z Z, Wang J, Jiang G H, Tao Y, Xu Q, Li X B, Zhao X F, Li S G, Xu J C, Zhu L H. Excavation of *Pid3* orthologs with differential resistance spectra to *Magnaporthe oryzae* in

- rice resource[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e93275. doi: 10.1371/journal.pone.0093275.
- [11] Li W T, Zhu Z W, Chern M, Yin J J, Yang C, Ran L, Cheng M P, He M, Wang K, Wang J, Zhou X G, Zhu X B, Chen Z X, Wang J C, Zhao W, Ma B T, Qin P, Chen W L, Wang Y P, Liu J L, Wang W M, Wu X J, Li P, Wang J R, Zhu L H, Li S G, Chen X W. A natural allele of a transcription factor in rice confers broad-spectrum blast resistance[J]. *Cell*, 2017, 170(1): 114-126.
- [12] You Q Y, Zhai K, Yang D L, Yang W B, Wu J N, Liu J Z, Pan W B, Wang J J, Zhu X D, Jian Y K, Liu J Y, Zhang Y Y, Deng Y W, Li Q, Lou Y G, Xie Q, He Z H. An E3 ubiquitin ligase-BAG protein module controls plant innate immunity and broad-spectrum disease resistance[J]. *Cell Host & Microbe*, 2016, 20(6): 758-769.
- [13] Kou Y J, Wang S P. Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13(2): 181-185.
- [14] Kou Y J, Wang S P. Toward an understanding of the molecular basis of quantitative disease resistance in rice[J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 159(4): 283-290.
- [15] Zhang X H, Yang S H, Wang J, Jia Y H, Huang J, Tan S J, Zhong Y, Wang L, Gu L J, Chen J Q, Pan Q H, Bergelson J, Tian D C. A genome-wide survey reveals abundant rice blast R genes in resistant cultivars[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2015, 84(1): 20-28.
- [16] 张锦文, 洪汝科, 范静华, 张祎颖, 曾千春, 罗琼. 一份云南地方稻广谱持久抗稻瘟病初步分析[J]. *西南农业学报*, 2011, 24(4): 1323-1326.
- Zhang J W, Hong R K, Fan J H, Zhang Y H, Zeng Q C, Luo Q. Analysis of broad spectrum and persistent rice blast resistance in Yunnan local rice variety[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 24(4): 1323-1326. (in Chinese with English abstract)
- [17] 张锦文, 谭亚玲, 洪汝科, 范静华, 罗琼, 曾千春. 高原粳稻子预 44 抗稻瘟病基因遗传分析和定位[J]. *中国水稻科学*, 2009, 23(1): 31-35.
- Zhang J W, Tan Y L, Hong R K, Fan J H, Luo Q, Zeng Q C. Genetic analysis and gene mapping of rice blast resistance in *japonica* variety Ziyu 44[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2009, 23(1): 31-35. (in Chinese with English abstract)
- [18] 樊琳琳, 姚波, 刘志涛, 王波, 刘剑宇, 王韵茜, 汪秉琨, 曾千春, 罗琼. 子预 44 中抗稻瘟病基因 *Pi-zy3(t)* 的定位[J]. *分子植物育种*, 2015, 13(5): 961-967.
- Fan L L, Yao B, Liu Z T, Wang B, Liu J Y, Wang Y Q, Wang B K, Zeng Q C, Luo Q. Identification of *Pi-zy3(t)* gene conferring resistance to rice blast isolate LP33 in Ziyu 44[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(5): 961-967. (in Chinese with English abstract)
- [19] 李书, 李权, 樊琳琳, 沙莎, 曾千春, 罗琼. 高原粳稻子预 44 中三个稻瘟病抗性基因的假基因化分子标记鉴定[J]. *分子植物育种*, 2014, 12(2): 219-225.
- Li S, Li Q, Fan L L, Sha S, Zeng Q C, Luo Q. Identification of the rice blast resistance genes by pseudogenization molecular markers in plateau *japonica* variety Ziyu 44[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2014, 12(2): 219-225. (in Chinese with English abstract)
- [20] 周铭, 王波, 杨睿, 李书, 范琳琳, 曾千春, 罗琼. 粳稻子预 44 中稻瘟病数量抗性位点分析[J]. *植物学报*, 2015, 50(6): 691-698.
- Zhou R, Wang B, Yang R, Li S, Fan L L, Zeng Q C, Luo Q. Quantitative trait locus analysis for rice blast resistance in *japonica* rice variety Ziyu 44[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2015, 50(6): 691-698. (in Chinese with English abstract)
- [21] 胡朝芹, 刘剑宇, 王韵茜, 杨睿, 汪秉琨, 何月秋, 曾千春, 罗琼. 粳稻子预 44 抗 LP11 稻瘟病菌基因 *Pizy6(t)* 的定位[J]. *植物学报*, 2017, 6(1): 1-9.
- Hu C Q, Liu J Y, Wang Y Q, Yang R, Wang B K, He Y Q, Zeng Q C, Luo Q. Mapping of *Pizy6(t)*, a gene conferring resistance to the rice blast strain LP11, in *Oryza sativa* subsp. *japonica* cultivar Ziyu 44[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2017, 52(1): 61-69. (in Chinese with English abstract)
- [22] 卓晓轩, 樊琳琳, 安星宇, 郭敬玮, 杨睿, 曾千春, 罗琼. 云南地方品种子预 44 中一个新的抗稻瘟病基因的定位[J]. *中国水稻科学*, 2019, 33(1): 12-19.
- Zhuo X X, Fan L L, An X Y, Guo J W, Yang R, Zeng Q C, Luo Q. Mapping of a new rice blast resistance gene in Ziyu 44, a rice landrace from Yunnan Province, China[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2019, 33(1): 12-19. (in Chinese with English abstract)
- [23] Ballini E, Morel J B, Droc G, Price A, Courtois B, Notteghem J L, Tharreau D. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance[J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2008, 21(7): 859-868.
- [24] Chen X W, Li S G, Xu J C, Zhai W X, Ling Z Z, Ma B T, Wang Y P, Wang W M, Cao G, Ma Y Q, Shang J J, Zhao X F, Zhou K D, Zhu L H. Identification of two blast resistance genes in a rice variety, Digu[J]. *Journal of Phytopathology*, 2004, 152: 77-85.
- [25] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [26] Quinlan A R, Hall I M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(6): 841-842.
- [27] DePristo M A, Banks E, Poplin R, Garimella K V, Maguire J R, Hartl C, Philippakis A A, del Angel G,

- Rivas M A, Hanna M, McKenna A, Fennell T J, Kemytsky A M, Sivachenko A Y, Cibulskis K, Gabriel S B, Altshuler D, Daly M J. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*, 2011, 43(5): 491-498.
- [28] Wang K, Li M Y, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(16): e164(<https://doi.org/10.1093/nar/gkq603>).
- [29] 王韵茜, 苏延红, 杨睿, 李鑫, 李晶, 曾千春, 罗琼. 云南疣粒野生稻瘟病抗性. *植物学报*, 2018, 53(4): 477-486.
- Wang Y Q, Su Y H, Yang R, Li X, Li J, Zeng Q C, Luo Q. Rice blast resistance of wild rice in Yunnan. *Chinese Bulletin of Botany*, 2018, 53(4): 477-486. (in Chinese with English abstract)
- [30] Ashkani S, Rafii M Y, Shabanimofrad M, Ghasemzadeh A, Ravanfar S A, Latif M A. Molecular progress on the mapping and cloning of functional genes for blast disease in rice (*Oryza sativa* L.): Current status and future considerations. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2014: 1-15.
- [31] Fukuoka S, Okuno K. QTL analysis and mapping of *pi21*, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103: 185-190.
- [32] He X Y, Liu X Q, Wang L, Wang L, Lin F, Cheng Y S, Chen Z M, Liao Y P, Pan Q H. Identification of the novel recessive gene *pi55(t)* conferring resistance to *Magnaporthe oryzae*. *Science China: Life Sciences*, 2012, 55(2): 141-149.
- [33] Shang J J, Tao Y, Chen X W, Zou Y, Lei C L, Wang J, Li X B, Zhao X F, Zhang M J, Lu Z K, Xu J C, Cheng Z K, Wan J M, Zhu L H. Identification of a new rice blast resistance gene, *Pid3*, by genomewide comparison of paired nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes and their pseudogene alleles between the two sequenced rice genomes. *Genetics*, 2009, 182(4): 1303-1311.