

水稻类病斑突变体 *wy3* 的鉴定和基因定位

张宏根[#] 王茂宇[#] 张丽佳 胡雅 马佳琦 张翼帆 汤述翥^{*} 梁国华 顾铭洪

(扬州大学 江苏省作物遗传生理重点实验室/教育部植物功能基因组学重点实验室,江苏 扬州 225009; [#] 共同第一作者; ^{*} 通讯联系人, E-mail: sztang@yzu.edu.cn)

Characterization and Gene Mapping of Lesion Mimic Mutant *wy3* in Rice

ZHANG Hong-Gen[#], WANG Mao-yu[#], ZHANG Li-jia, HU Ya, MA Jia-qi, ZHANG Yi-fan, TANG Shu-zhu^{*}, LIANG Guo-hua, GU Ming-hong

(Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology of Jiangsu Province / Key Laboratory of Plant Functional Genomics, Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; [#] These authors contributed equally to this work; ^{*} Corresponding author, E-mail: sztang@yzu.edu.cn)

ZHANG Honggen, WANG Maoyu, ZHANG Lijia, et al. Characterization and gene mapping of lesion mimic mutant *wy3* in rice. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(3): 239-246.

Abstract: A lesion mimic mutant *wy3* was obtained from the progeny of a *japonica* variety Wuyujing 3 by natural mutation. The lesions were first observed on the leaves at the seedling stage, then spread gradually to the whole leaf at the initial tillering stage. Compared with the wild type (WT), the plant height, the number of effective tiller, panicle length, grain number per panicle and seed setting rate of *wy3* were reduced significantly. The shading assay showed that the lesions on leaves of *wy3* were induced by natural light. Compared with the wild type, the photosynthetic pigment and the net photosynthetic rate of *wy3* were significantly reduced, but the SOD activity, POD activity, CAT activity and MDA content of *wy3* were significantly higher than those of WT. Trypan blue staining experiments showed that there were a large number of dead cells in the mutant lesion. Genetic analysis suggested that the phenotype of *wy3* was controlled by a single recessive nuclear locus, and the target gene was mapped between markers W2-17 and W2-18 with the physical distance of 28 kb on chromosome 2. Sequence analysis revealed that the mutated gene in *wy3* had a single nucleotide deletion at the 375th in CDS of LOC_Os02g02000, resulting in a premature termination of translation of the target gene, which is a new allele of *OsHPL3*.

Key words: rice; lesion mimic mutant; gene mapping

张宏根,王茂宇,张丽佳,等. 水稻类病斑突变体 *wy3* 的鉴定和基因定位. 中国水稻科学, 2016, 30(3): 239-246.

摘要: 在梗稻品种武育梗 3 号栽培群体中获得一个类病斑突变体 *wy3*。该突变体类病斑出现于苗期,分蘖期扩散至整张叶片,属于扩散型类病斑突变体。相比野生型,突变体 *wy3* 的株高明显降低,有效分蘖数减少,穗长、每穗粒数、结实率均显著降低。遮光处理表明,突变体 *wy3* 类病斑的产生受自然光诱导。台盼蓝染色结果表明,类病斑部位有大量的死亡细胞。突变体 *wy3* 的光合色素含量和净光合速率较野生型显著降低,SOD、POD、CAT 活性和 MDA 含量均显著高于野生型。遗传分析表明突变体表型受单隐性核基因控制,采用 BSA 将该基因初步定位在第 2 染色体短臂端粒附近。采用 F₂ 群体中 1099 株类病斑单株将基因定位在标记 W2-17 和 W2-18 之间 28kb 的物理距离内。测序结果表明,突变体 *wy3* 中的 LOC_Os02g02000 编码区(CDS)第 375 位碱基 C 缺失,导致翻译提前终止,突变体中该候选基因为 *OsHPL3* 的一个新等位基因。

关键词: 水稻; 类病斑突变体; 基因定位

中图分类号: Q343.5; Q754

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2016)03-0239-08

植物斑点叶(spotted leaf)突变体是指植物在没有遭受病原物侵染或明显逆境条件下在叶片或叶鞘上自发形成斑点的一类突变体,由于这些斑点与病原物侵染后产生的病斑非常相似,又被称为类病变

突变体(lesion simulating disease mutant, *lsd*)或类病斑突变体(lesion mimic mutant, *lmm*)^[1]。类病斑突变体广泛存在于水稻、拟南芥、玉米、大麦和大豆等植物中^[2-7]。根据突变体的表型,类病斑突

收稿日期: 2015-11-30; 修改稿收到日期: 2015-12-24。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31071384,31000533); 江苏省科技支撑计划资助项目(BE2013301); 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

变体可分为起始型和扩散型^[8-10],起始型突变体的病斑有相对稳定的分布位置和大小,而扩散型突变体的病斑形成以后会很快扩散到叶片的其他部位,甚至包括叶鞘和茎秆。已有研究表明,植物类病斑的发生主要与过敏性反应(hypersensitive response, HR)导致的细胞程序性死亡以及细胞死亡途径中自由基非正常产生有关^[11-13]。此外,许多类病斑突变体对某些植物病原物表现出了一定的抗性^[14-16],能激发病程相关蛋白的表达^[17-18],可以提高植株的持久、广谱抗病性。因此,这类突变体对植物过敏反应激活机制和植物抗病反应机制的研究具有重要意义。

目前,水稻中已经发现了80多个类病斑突变^[19]。其中,绝大部分呈单隐性核基因遗传规律,也有部分表现为双隐性核基因或显性核基因遗传规律。在这些类病斑基因中,*spl5*^[20]、*spl7*^[21]、*spl11*^[22]、*spl18*^[23]、*spl28*^[16]、*Ttml*^[24]等18个基因已被克隆,这些基因编码许多不同类型的蛋白,如第一个被克隆的水稻类病变突变基因*spl7*编码一个热激转录因子蛋白(heat stress transcription factor protein, HSF)^[21],*spl11*编码一个U-box/Armadillo重复蛋白^[22],*spl18*编码一个酰基转移酶^[23]。类病斑基因的克隆与功能研究表明类病变过程非常复杂,这些基因的作用机制以及性状表现各不相同,涉及到许多生化代谢过程,但突变体性状大多与细胞程序性死亡相关^[22]。

本课题组在粳稻品种武育梗3号栽培群体中获得一个稳定遗传的类病斑突变体 $\omega y3$,该类病斑突变是自然诱变产生。本研究中以 $\omega y3$ 为材料,描述了该突变体的形态特征、生理学特性,并对该突变基因进行了精细定位与克隆,以期为该基因的功能研究及应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2013年扬州正季,在粳稻品种武育梗3号栽培群体中获得一个类病斑突变体 $\omega y3$,经过多代连续种植,突变体类病斑表型稳定遗传。2014年正季扬州,以籼稻品种Kasalath为父本与 $\omega y3$ 杂交获得 F_1 ,2014年冬季在海南种植 F_1 及相关亲本,成熟期收获 F_1 植株自交种子。2015年正季,种植突变体 $\omega y3$ 、野生型武育梗3号及组合 $\omega y3$ /Kasalath F_2 群体。

1.2 表型鉴定

2015年正季,将突变体 $\omega y3$ 和对照武育梗3号种植于扬州大学农学院实验基地,小区种植,3次重复,管理与一般大田相同。全生育期观察田间突变体的表型,包括突变体斑点出现的时期、颜色及分布情况等。成熟后随机从小区中央选取10株考查株高、单株穗重、每株有效穗数、每穗粒数、每穗实粒数、结实率和千粒重等性状。

1.3 光照处理实验

通过遮光试验了解光照对斑点发生的影响。大田条件下,在苗期用宽度约为1cm的锡箔纸对突变体 $\omega y3$ 叶片已有斑点 and 无斑点部位进行遮光处理,各重复3次。分别观察遮光15d及恢复光照7d后斑点的发生及变化情况,并拍照。

1.4 突变体死亡细胞鉴定

苗期,分别取野生型正常叶片与突变体 $\omega y3$ 发生类病斑的叶片,剪成1cm×1cm大小。加入台盼蓝染液(染液配方参照Yin等^[25]的方法),真空抽滤使染液进入细胞间隙,沸水煮沸5~8min。室温下静置6~8h后用2.5g/mL的水合氯醛溶液脱色,直到组织完全透明为止。脱色好的叶片在体视显微镜下观察、拍照。

1.5 叶绿素含量测定

分蘖期,分别取野生型正常叶片与突变体 $\omega y3$ 发生类病斑的叶片,按Lichtenthaler等^[26]修正的Arnon法进行叶绿素和类胡萝卜素含量测定,具体操作如下:将鲜叶去掉叶脉,截取叶片中段(叶片最宽处),擦净组织表面污物,并吸干叶片表面附着水;准确剪成2mm条状并称取0.2g鲜样3份,分别置于3个20mL带盖的玻璃管中;吸取10mL提取液(96%乙醇)置于玻璃管中,密封并置于30℃~50℃水浴锅中萃取3h,此过程中需轻摇几次。当叶片完全变白时即可比色。比色时,以提取液为空白,在波长663nm、646nm和470nm下测定吸光度。每样重复测定2次。

1.6 光合作用相关指标的鉴定

始穗期,使用Li-6400型便携式光合测定仪于晴天上午9:00—11:00分别测定 $\omega y3$ 及其野生型剑叶叶片的净光合速率(net photosynthetic, P_n)、气孔导度(leaf conductance, G_s)、蒸腾速率(transpiration rate, T_r)和胞间 CO_2 浓度(intercellular CO_2 concentration, C_i),各测定3片具有代表性的剑叶。光合测定仪使用红蓝光源,光强恒定为1200

$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 温度为 30°C , CO_2 浓度为空气中的浓度, 湿度为大气中的湿度。取 3 次重复的平均值进行分析。

1.7 抗氧化酶活性测定

分蘖期, 测定突变体 *wy3* 和对照相同部位叶片中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶 (peroxidase, POD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性和丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 的含量。所有测定重复 3 次, 取平均值进行分析。SOD 活性采用 SOD 试剂盒 (南京建成生物工程研究所生产) 测定, 该试剂盒采用黄嘌呤氧化酶法; POD 活性采用愈创木酚法^[27] 测定, 以每 1 min 内 OD_{470} 变化 0.01 为一个过氧化物酶活性单位 (U); CAT 活性采用高锰酸钾滴定法测定; MDA 含量采用硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 法测定。

1.8 图谱构建与数据分析

采用隐性分离群体进行遗传分析和基因定位。在 F_2 群体中, 根据分子标记检测的结果, 具有 *wy3* 突变亲本带型的个体赋值 1, 具有 Kasalath 带型的个体赋值 3, 具有双亲带型 (杂合带) 的个体赋值 2, 利用 MapMaker 3.0 作图软件进行基因位点与标记间连锁分析, 用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传距离 (centiMorgan, cM)。其他数据在 Excel 2013

中处理。

1.9 候选基因分析

根据基因精细定位结果, 查阅在水稻基因组注释数据库 (Rice Genome Annotation Project) 中相应区间内的所有开放阅读框 (ORF), 并分析可能的候选基因。根据候选基因全长基因组 DNA 序列, 设计测序引物, 分别对野生型和突变体的基因组进行扩增并测序。测序结果用 ContigExpress 软件拼接完整再通过 DNASTAR 软件进行比对, 确定突变位点。

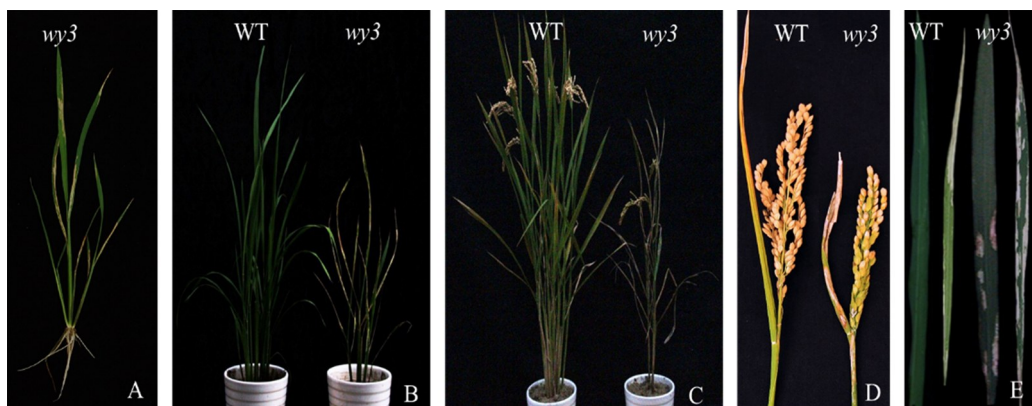
2 结果与分析

2.1 突变体表型鉴定

在大田自然条件下, 突变体 *wy3* 从苗期开始叶片表面出现类病斑, 分蘖期比较明显。叶片上斑点出现的位置并无特殊规律, 但最终都会扩散到整张叶片, 表现为扩散型突变体。考查突变体与野生型的农艺性状, 突变体的长势较差, 株高、穗长、每穗粒数、结实率等农艺性状也显著低于对照 (表 1, 图 1)。造成突变体株高等性状显著降低的原因可能是由于突变叶片过早枯死, 光合作用能力减退。

2.2 光照对突变体的影响

对突变体 *wy3* 只出现少量类病斑的叶片未产生类病斑部位用锡箔纸遮光 15 d 后发现, 整张叶片



A—苗期植株表型; B—分蘖初期野生型 (左) 和突变体 *wy3* (右) 植株表型; C—成熟期野生型 (左) 和突变体 *wy3* (右) 植株表型; D—野生型 (左) 和突变体 *wy3* (右) 穗部表型; E—分蘖期野生型 (左) 和突变体 *wy3* (右) 叶片表型。

A, Phenotypes of *wy3* during seedling stage; B, Phenotypes of WT (left) and *wy3* (right) during the early tillering stage; C, Phenotypes of WT (left) and *wy3* (right) during the mature stage; D, Panicle traits of WT (left) and *wy3* (right); E, Leaves of WT (left) and *wy3* (right) during the early tillering stage.

图 1 突变体 *wy3* 及其野生型表型

Fig.1. Phenotypes of *wy3* and wild type (WT).

表1 突变体和野生型的农艺与产量性状

Table 1. Performance of agronomic and yield traits of the mutant *wy3* and the wild type(WT).

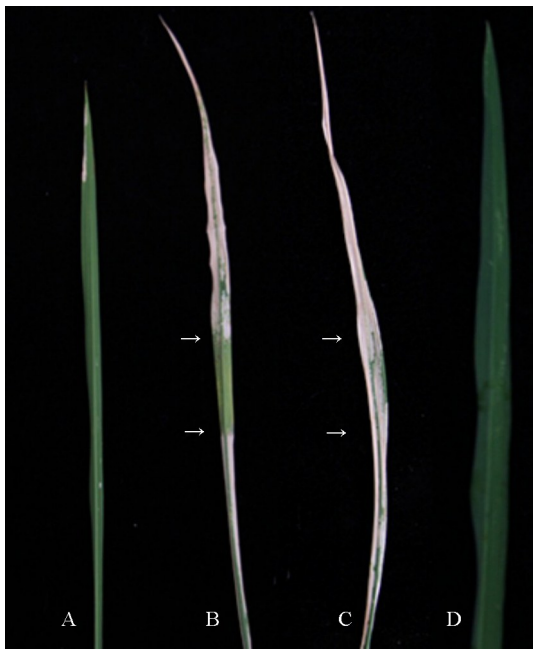
材料 Material	株高 Plant height /cm	分蘖数 No. of tillers	穗长 Panicle length /cm	结实率 Seed-setting rate/%	每穗粒数 Grain number per panicle	粒长 Grain length /mm	粒宽 Grain width /mm	千粒重 1000-grain weight/g
<i>wy3</i>	56.9±0.6**	3.5±0.6**	14.8±1.2**	79.0±0.1**	89.6±6.8**	7.5±2.2	3.4±1.4	26.54±0.56
WT	87.5±0.5	10.0±1.7	16.6±0.8	98.3±0.1	123.6±11.0	7.3±2.8	3.3±0.9	26.85±0.62

**表示在0.01水平差异显著。下同。

** denote significant difference at 0.01 level. The same as below.

表2 突变体 *wy3* 和野生型叶片光合色素含量Table 2. Pigment contents in leaves of *wy3* and wild type(WT).

材料 Material	叶绿素 a 含量 Chlorophyll a content /(mg · g ⁻¹)	叶绿素 b 含量 Chlorophyll b content /(mg · g ⁻¹)	叶绿素 a/b Chlorophyll a/b	类胡萝卜素含量 Carotenoid content /(mg · g ⁻¹)
<i>wy3</i>	1.28±0.09**	0.27±0.11**	4.68±0.13**	0.15±0.11**
WT	2.28±0.03	0.99±0.08	2.31±0.07	0.59±0.04



A—遮光前 *wy3*; B—未发生斑点部位遮光 15 d 后; C—遮光部位恢复光照 7 d 后; D—野生型。

A, Leaf of *wy3* before shading; B, Leaf without lesion after shading for 15 days; C, Leaf shaded for 7 days then under normal light for 7 days; D, Wild type.

图2 遮光对突变体 *wy3* 叶片的影响Fig. 2. Effects of shading on *wy3* leaves.

其他部位都产生类病斑,但是遮光部位没有产生类病斑;恢复光照,跟踪观察原遮光部位变化,一周后,原本没有类病斑的遮光处产生了明显的类病斑

(图2)。该结果表明,类病斑的发生受自然光照的诱导,适当的遮光可以阻止或者减轻类病斑的发生或者扩散。

2.3 叶绿素含量变化

分蘖期,通过对突变体和野生型叶片叶绿素含量的测定结果可以看出,突变体的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量均显著低于野生型,但叶绿素 a/b 比值显著高于其野生型,说明突变体 *wy3* 是一个叶绿素缺陷突变体(表2)。

2.4 突变对光合作用的影响

始穗期,测定突变体 *wy3* 和野生型剑叶的光合参数,包括净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、蒸腾速率(T_r)和胞间 CO_2 浓度(C_i)。由于在该时期突变体叶片类病斑明显,突变体 *wy3* 所测得的 P_n 、 G_s 、 T_r 和 C_i 4 个参数均显著低于野生型(表3),说明类病斑的发生导致突变体光合能力的降低。

2.5 突变体叶片细胞死亡鉴定

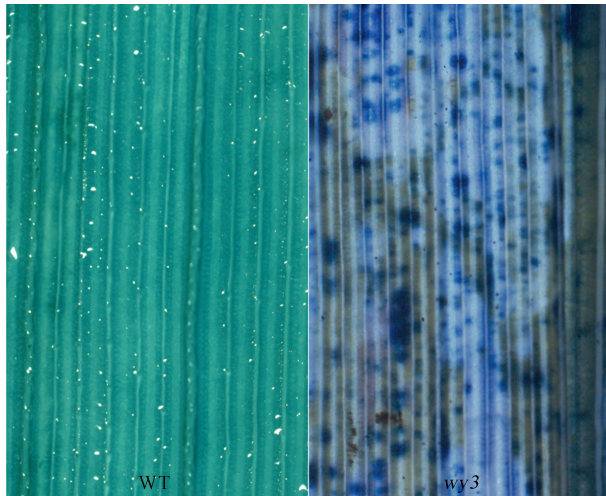
利用台盼蓝染色方法对突变体及野生型叶片中死亡细胞进行检测。经台盼蓝染色后,野生型叶片整体呈淡蓝色,没有深蓝色染色,说明野生型叶片基本上没有细胞死亡。与野生型叶片不同的是,突变体类病斑发生处对应着严重的深蓝色小点,说明斑点部位有大量的死亡细胞,而在大块深蓝色染色间隙也出现了深蓝色的小点,说明类病斑正在扩散中(图3)。

2.6 抗氧化酶活性的变化

植物细胞程序性死亡时常产生活性氧的沉积,

表 3 突变体 *wy3* 和野生型武育梗 3 号分蘖期叶片光合特性Table 3. Photosynthetic parameters of *wy3* and wild type(WT) at the initial tillering stage.

材料 Material	净光合速率 P_n /($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	蒸腾速率 T_r /($\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	气孔导度 G_s /($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	胞间 CO_2 浓度 C_i /($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)
<i>wy3</i>	14.16 ± 0.27**	193.27 ± 10.10**	0.13 ± 0.02**	2.76 ± 0.23**
WT	22.46 ± 0.29	276.96 ± 6.30	0.66 ± 0.08	8.93 ± 0.43

图 3 武育梗 3 号和 *wy3* 叶片的台盼蓝染色检测Fig. 3. Trypan blue staining of leaves of the mutant *wy3* and wild type (WT).

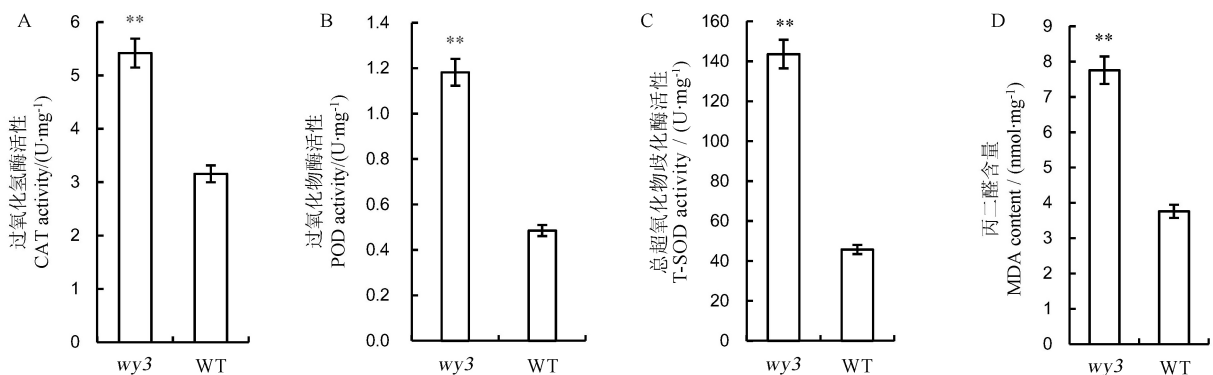
因此测定了突变体 *wy3* 和野生型相同部位叶片中一系列的活性氧代谢生理指标。结果显示,突变体 *wy3* 中 CAT、POD、T-SOD 以及 MDA 含量均显著高于野生型(图 4),说明在突变体叶片产生类病斑后,活性氧大量积累,活性氧的积累诱发了植物细胞

合成大量的超氧化物歧化酶,超氧化物歧化酶将自由基状态的氧负离子以及单线态氧歧化为过氧化氢,过氧化氢在细胞中的积累诱发过氧化物酶(过氧化氢酶)的大量表达。同时,在突变的叶片中活性氧大量积累导致叶片细胞中的生物膜的磷脂分子的不饱和脂肪酸链大量过氧化,生成大量丙二醛。

2.7 *wy3* 的遗传控制与基因定位

2014 年海南, Kasalath 与突变体 *wy3* 配置的 F_1 植株叶片表型正常,2015 年 F_2 群体中出现明显的分离,分别表现双亲性状,其中正常株 3000 株,类病斑单株 1099 株。经卡方测验,正常株与突变株符合 3 : 1 分离比($\chi^2 = 0.7295 < \chi_{0.05,1}^2 = 3.84$)。表明突变体 *wy3* 类病斑性状受一对隐性核基因控制。

为定位该类病斑基因,在均匀分布于水稻 12 条染色体的 380 对 SSR 标记中,筛选出 120 对在 Kasalath 双亲间显示多态性的标记。分别取 15 株正常株和 15 株突变株构建正常基因池和突变基因池,利用上述多态标记对这两个基因池进行检测。在所用检测的 120 对标记中,第 2 染色体的标记 RM3340 和 RM12368 在两个混池间表现出差异,初步推测这两个标记与基因连锁。进一步选取 30 株正常株和 30 株类病斑植株,利用 RM3340、



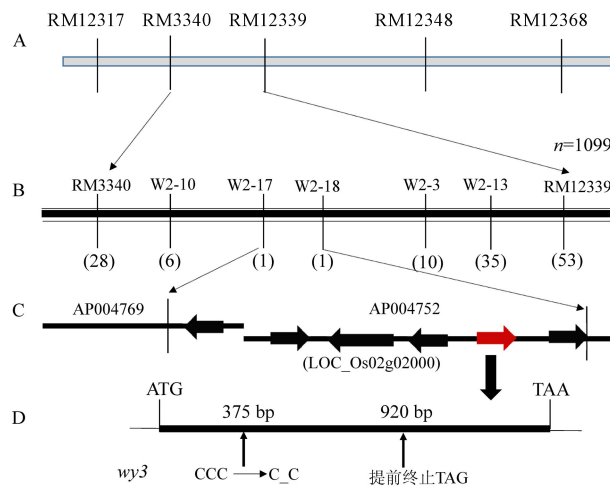
** $P < 0.01$.

图 4 突变体 *wy3* 与野生型(WT)对照在分蘖期的生理学特性比较Fig. 4. Physiological characteristics of the wild type(WT) and the *wy3* mutant during the tillering stage.

表 4 本研究开发的多态性 STS 标记

Table 4. Polymorphic STS markers developed in this study.

标记 Marker	反向引物 Forward primer (5'-3')	正向引物 Reverse primer (5'-3')
W2-10	GAGATGCCAGGAGAATGA	TGTAGCTGAGGGTTTGATA
W2-17	AAATCTGGACCTGAAAGT	TTAGGGAAGATTCTCAAA
W2-18	GCCAGCGAGAAGAAGAAG	GAGGATGTGGTCGGGTGT
W2-3	GCAGCACGGACTACAAGA	CAATTCTGCCATGACCAA
W2-13	TAGTGTGCCCCCTTTAA	CATCACAGCAAACAAGCA



A—基因的初步定位；B—基因的精细定位；C—覆盖基因物理图谱；D—基因内变异位点。

A, Primarily mapping of target gene; B, Fine mapping of target gene; C, Physical map of genes; D, The mutation locus of target gene.

图 5 水稻类病斑突变体基因定位

Fig. 5. Mapping of the target gene in *wy3*.

RM12368 进行检测,正常株表现为 Kasalath 或 F₁ 条带,类病斑植株表现为突变体 *wy3* 条带,说明标记 RM3340、RM12368 与基因连锁(图 5)。结合本实验室已有的 SSR 标记和 Gramene(<http://www.gramene.org>) 网站上提供的 SSR 信息,在标记 RM3340、RM12368 附近筛选了 14 对 SSR 标记,其中 RM12317、RM12339 和 RM12348 在双亲之间具有多态。利用这些标记对 F₂ 群体中 1099 株类病斑单株进行检测,结果在标记 RM3340 处找到 28 个交换株,在标记 RM12339 处找到 53 对交换株,根据交换株信息,初步将基因定位在 RM3340 和 RM12339 之间。为了进一步精细定位基因,结合已经公布的水稻品种 9311 和日本晴全基因组序列,利

用 Primer Premier 5.0 软件,在水稻第 2 染色体上发展了 13 对新的 STS 标记,其中 5 对标记表现出多态性(部分引物序列如表 4 所示)。利用 5 对多态标记和 81 株交换株,最终把基因定位在 W2-17 和 W2-18 之间,两标记间物理距离约为 28 kb。

2.8 候选基因测序分析

根据水稻基因组注释数据库(Rice Genome Annotation Project)中的数据,在定位区间共有 6 个开放阅读框(LOC_Os02g01960—LOC_Os02g02010)。对这 6 个 ORF 进行基因组测序。结果发现,与野生型武育梗 3 号相比,突变体 *wy3* 中的 LOC_Os02g02000 编码区(CDS)第 375 位碱基 C 缺失,编码序列在 920 bp 处出现终止子 TGA,使得翻译提前终止(图 5),并且野生型武育梗 3 和日本晴在这个 ORF 上的序列完全相同。

3 讨论

在植物中已经发现的大量斑点叶或类病斑突变体中,斑点或者类病斑的出现往往伴随着其他农艺性状的改变,但不同突变体表现并不一致。例如 *hm197*^[19]、*lms1*^[28]、*lmm4*^[29] 等植株株高降低,而突变体 *spl32*^[30] 株高未有显著变化;在分蘖数上,*hm197*^[28]、*g340*^[31]、*spl32*^[30] 等均未发生显著变化;在结实率上,*lmm4*^[29]、*spl31*^[32]、*spl32*^[30] 等突变体均显著下降,但 *g340*^[31] 突变体结实率没有显著变化。本研究中,*wy3* 株高、分蘖数、结实率均显著低于其野生型,植株光合作用能力的下降是造成这些农艺、产量性状降低的主要原因。类病斑突变体叶绿素各组分含量显著低于野生型,叶绿素含量降低这一结果也与突变体植株叶片表型相符合,这也导致突变体中叶片光合作用能力的下降。

已有研究发现,类病斑形成部位通常伴随自由基和活性氧的积累。在植物细胞中,无法及时清除的活性氧积累是诱导细胞进行程序性死亡的重要信

号因子。Samuilov 等^[33]研究表明活性氧的积累与植物细胞凋亡的起始与调节有重要关系。在水稻中已经被克隆的类病斑突变体基因中, *OsLSD1*^[34]、*spl11*^[22]、*spl28*^[16] 等突变体基因与细胞的凋亡有关。本研究中, 台盼蓝染色后发现类病斑叶片出现大量死亡细胞, 进一步测得突变体 *wy3* 类病斑叶片中的 SOD、POD、CAT 和 MDA 均极显著高于对照叶片, 这一结果说明在突变体 *wy3* 叶片产生类病斑后, 叶片细胞中存在大量的活性氧自由基, 进而调控细胞非程序性死亡, 造成了突变体叶片最终枯死。

本研究中, 利用组合 Kasalath/*wy3* 衍生 F₂ 群体中的 1099 株隐性单株, 将突变体中控制类病斑基因定位在第 2 染色体短臂标记 W2-17 和 W2-18 之间 28 kb 的物理区间内。根据已有的报道, 在此区间内已经报到了 3 个类病斑基因 *spl2*^[35]、*cea62*^[36] 和 *OsHPL3*^[37], 其中 *spl2* 未进行精细定位, *cea62* 与 *OsHPL3* 已克隆。通过对定位区间内候选 ORF 进行测序发现, 与野生型相比, 突变体 *wy3* 中的 LOC_Os02g02000 编码区(CDS)第 375 位碱基 C 缺失, 编码序列在 920 bp 处出现终止子 TGA, 使得翻译提前终止。不同的是, 突变体 *cea62* 是在 LOC_Os02g02000 编码区第 1146bp 处发生单碱基替换 (TAC→TAG) 从而使得翻译过程提前终止, *OsHPL3* 突变体中的 LOC_Os02g02000 编码区 518 bp 和 519 bp 之间插入了一个大约 700 bp 大小的转座子, 使得该基因功能丧失, 从而发生类病斑突变。由此可以看出, 本研究中定位到的类病斑基因和 *cea62*、*OsHPL3* 为变异位点不同的复等位基因。尽管 *spl2* 没有被精细定位, 但比较已有的定位结果及突变体表型, 可以推断 *cea62*、*OsHPL3* 及本研究中克隆的基因与已报到的 *spl2* 均为等位基因。

从表型来看, 突变体 *wy3* 与已报道的 *cea62* 和 *OsHPL3* 基本一致, 但也有所差异。突变体 *wy3* 在发生突变时期、病斑扩散形式、病斑颜色以及植株株高和分蘖等性状上都与 *cea62*、*OsHPL3* 表现一致, 但是 *wy3* 在千粒重上与野生型并没有发生显著变化, 这与 *OsHPL3* 的千粒重较野生型显著下降有所不同^[36]; 突变体 *wy3* 在结实率上的表现与 *cea62* 有所不同, *cea62* 结实率极显著低于野生型, 这种极显著降低是由于花粉育性降低造成的^[37], 而本研究中 *wy3* 花粉育性与野生型并无显著差异(数据未列出), 突变体 *wy3* 结实率下降是由于植株后期叶片枯死, 籽粒灌浆不充实而出现大量瘪粒造成的。另

外, *OsHPL3* 突变体来源于粳稻品种中花 11, *cea62* 背景源于日本晴, 结合性状上的差异, 我们推测差异的原因可能是突变位点的不同或核背景不同。鉴于此, 我们将该突变基因导入日本晴背景, 以期在不同背景下研究该基因的差异。由于实验进度限制, 结果仍在进一步研究中。

参考文献:

- [1] 王忠华. 植物类病斑突变体的诱发与突变机制. 细胞生物学杂志, 2006, 27(5): 530-534.
Wang Z H. Induction and mutation mechanism of plant lesion mimic mutants. *Chin J Cell Biol*, 2005, 27: 530-534 (in Chinese with English abstract)
- [2] Dietrich R A, Delaney T P, Uknes S J, et al. *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*, 1994, 77(4): 565-577.
- [3] Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, et al. The barley *Mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, 1997, 88(5): 695-705.
- [4] Gray J, Close P S, Briggs S P, et al. A novel suppressor of cell death in plants encoded by the *Lls1* gene of maize. *Cell*, 1997, 89(1): 25-31.
- [5] Badigannavar A M, Kale D M, Eapen S, et al. Inheritance of disease lesion mimic leaf trait in groundnut. *J Hered*, 2002, 93(1): 50-52.
- [6] Malamy J, Carr J P, Klessig D F, et al. Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 1990, 250(4983): 1002-1004.
- [7] Takahashi A, Kawasaki T, Henmi K, et al. Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense. *Plant J*, 1999, 17(5): 535-545.
- [8] Dangl J L, Dietrich R A, Richberg M H. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, 1996, 8(10): 1793.
- [9] Neuffer M G, Calvert O H. Dominant disease lesion mimics in maize. *J Hered*, 1975, 66(5): 265-270.
- [10] Shirasu K, Schulze-Lefert P. Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(3): 371-385.
- [11] Dietrich R A, Richberg M H, Schmidt R, et al. A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* *LSD1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell*, 1997, 88(5): 685-694.
- [12] Ryerson D E, Heath M C. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *Plant Cell*, 1996, 8(3): 393-402.
- [13] Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Biol*, 1997, 48(1): 251-275.
- [14] 王建军, 朱旭东, 王林友, 等. 水稻类病斑突变体 *lrd40* 的抗

- 病性与细胞学分析. *中国水稻科学*, 2005, 19(2): 111-116.
- Wang J J, Zhu X D, Wang L Y, et al. Disease resistance and cytological analyses on lesion resembling disease mutant *lrd40* in *Oryza sativa*. *Chin J Rice Sci*, 2005, 19: 111-116. (in Chinese with English abstract)
- [15] 陈析丰, 金杨, 马伯军. 水稻类病变突变体及抗病性的研究进展. *植物病理学报*, 2011, 41(1): 1-9.
- Chen X F, Jin Y, Ma B J. Progress on the studies of rice lesion mimics and their resistant mechanism to the pathogens. *Acta Phytopathol Sin*, 2011, 41: 1-9. (in Chinese with English abstract)
- [16] Qiao Y, Jiang W, Lee J H, 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*). *New Phytol*, 2010, 185(1): 258-274.
- [17] Wu C, Bordeos A, Madamba M R S, et al. Rice lesion mimic mutants with enhanced resistance to diseases. *Mol Genet Genom*, 2008, 279(6): 605-619.
- [18] Yin Z, Chen J, Zeng L, et al. Characterizing rice lesion mimic mutants and identifying a mutant with broad-spectrum resistance to rice blast and bacterial blight. *Mol Plant-Microbe Interac*, 2000, 13(8): 869-876.
- [19] 李小红, 施勇烽, 张晓波, 等. 水稻斑点叶突变体 *hm197* 的鉴定及其基因定位. *中国水稻科学*, 2015, 29(5): 447-456.
- Li X H, Shi Y F, Zhang X B, et al. Identification and gene mapping of a spotted-leaf mutant *hm197* in rice. *Chin J Rice Sci*, 2015, 29(5): 447-456. (in Chinese with English abstract)
- [20] Chen X, Hao L, Pan J, et al. *spl5*, a cell death and defense-related gene, encodes a putative splicing factor 3b subunit 3 (SF3b3) in rice. *Mol Breeding*, 2012, 30(2): 939-949.
- [21] Yamanouchi U, Yano M, Lin H, et al. A rice spotted leaf gene, *spl7*, encodes a heat stress transcription factor protein. *PNAS*, 2002, 99(11): 7530-7535.
- [22] Zeng L R, Qu S, Bordeos A, et al. *Spotted leaf11*, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity. *Plant Cell*, 2004, 16(10): 2795-2808.
- [23] Mori M, Tomita C, Sugimoto K, et al. Isolation and molecular characterization of a spotted leaf 18 mutant by modified activation-tagging in rice. *Plant Mol Biol*, 2007, 63(6): 847-860.
- [24] Takahashi A, Agrawal G K, Yamazaki M, et al. Rice *Pti1a* negatively regulates RAR1-dependent defense responses. *Plant Cell*, 2007, 19(9): 2940-2951.
- [25] Yin Z, Chen J, Zeng L, et al. Characterizing rice lesion mimic mutants and identifying a mutant with broad-spectrum resistance to rice blast and bacterial blight. *Mol Plant-Microbe Interac*, 2000, 13(8): 869-876.
- [26] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids; Pigments of photosynthetic bio membranes. *Methods Enzymol*, 1987 (148C): 350-382.
- [27] 张志良, 翟伟菁. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- Zhang Z L, Qu W J. *Plant Physiology Experimental Guidance*. 3rd edn. Beijing: Higher Education Press, 2003. (in Chinese)
- [28] 王丹. 水稻分蘖调控基因 *TE* 的功能分析和类病变突变体 *lms1* 的图位克隆. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- Wang D. Functional analysis of a key tillering regulator *TE* and map-based cloning of gene *lms1* in rice (*Oryza sativa* L.). Beijing: CAAS, 2012. (in Chinese with English abstract)
- [29] 邱结华, 马宁, 蒋汉伟, 等. 水稻类病变突变体 *lmm4* 的鉴定及其基因定位. *中国水稻科学*, 2014, 28(4): 367-376.
- Qiu J H, Ma N, Jiang H W, et al. Identification and gene mapping of a lesion mimic mutant *lmm4* in rice. *Chin J Rice Sci*, 2014, 28(4): 367-376. (in Chinese with English abstract)
- [30] 钟振泉, 罗文龙, 刘永柱, 等. 一份新的水稻斑点叶突变体 *spl32* 的鉴定和基因定位. *作物学报*, 2015, 41(6): 861-871.
- Zhong Z Q, Luo W L, Liu Y Z, et al. Characterization of a novel spotted leaf mutant *spl32* and mapping of *spl32(t)* gene in rice (*Oryza sativa*). *Acta Agron Sin*, 2015, 41(6): 861-871. (in Chinese with English abstract)
- [31] 刘林. 水稻类病变突变体 *g340* 的鉴定和基因定位. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- Liu L. Identification and gene mapping of a rice lesion mimic mutant *g340*. Beijing: CAAS, 2014 (in Chinese with English abstract)
- [32] 代高猛, 朱小燕, 李云峰, 等. 水稻类病变突变体 *spl31* 的遗传分析与基因定位. *作物学报*, 2013, 39(7): 1223-1230.
- Dai G M, Zhu X Y, Li Y F, et al. Genetic analysis and fine mapping of a lesion mimic mutant *spl31* in rice. *Acta Agron Sin*, 2013, 39(7): 1223-1230. (in Chinese with English abstract)
- [33] Samuilov V D, Kiselevsky D B, Sinitsyn S V, et al. H_2O_2 intensifies CN^- -induced apoptosis in pea leaves. *Biochem (Moscow)*, 2006, 71(4): 384-394.
- [34] Wang L, Pei Z Y, He C. *OsLSD1*, a rice zinc finger protein, regulates programmed cell death and callus differentiation. *Mol Plant-Microbe Interac*, 2005, 18(5): 375-384.
- [35] Kojo K, Yaeno T, Kusumi K, et al. Regulatory mechanisms of ROI generation are affected by rice *spl* mutations. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(8): 1035-1044.
- [36] Liu X, Li F, Tang J, et al. Activation of the jasmonic acid pathway by depletion of the hydro peroxide lyase *OsHPL3* reveals crosstalk between the HPL and AOS branches of the oxylipin pathway in rice. *PLoS ONE*, 2012, 7(11): 1-14.
- [37] Tong X, Qi J, Zhu X, et al. The rice hydro peroxide lyase *OsHPL3* functions in defense responses by modulating the oxylipin pathway. *Plant J*, 2012, 71(5): 763-775.