

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.08.007

王秋雨, 赵梦灿, 卫航航, 等. 水稻类病斑突变体 *spl45* 的鉴定与基因精细定位 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(8): 73-86.

水稻类病斑突变体 *spl45* 的 鉴定与基因精细定位

王秋雨^{1,2}, 赵梦灿³, 卫航航¹, 卢奕成¹, 谭毓丹¹,
李鑫荧¹, 刘晶巧¹, 钱奕明¹, 王少忠¹, 刘冰洋¹,
张美洁¹, 杨佳程¹, 蒋文昌¹, 张长伟¹

1. 西南大学 水稻研究所/南方山地农业教育部工程研究中心, 重庆 400715;
2. 西南大学宜宾研究院, 四川 宜宾 644000; 3. 开封市农林科学研究院, 河南 开封 475004

摘要: 旨在对水稻类病斑突变体 *spl45* 进行详细鉴定, 以便更深入地了解类病斑突变体的抗病机制。采用 EMS 诱变处理 Xingong 1B, 筛选出类病斑突变体, 多代自交后形成 *spl45*。对突变体 *spl45* 进行表型鉴定、农艺性状考察、光合特性分析、遮光处理、组织化学染色、生理指标检测、抗病性鉴定及基因定位等一系列试验。利用 *spl45* 与 Jinhui 10 杂交得到 F₁ 代, 再自交获得 F₂ 代, 用于基因定位。结果发现: 水稻类病斑突变体 *spl45* 三叶期时开始出现褐色斑点型类病斑, 且类病斑表型随植物生长不断增长最终分布于整个植株的叶片和叶鞘。*spl45* 植株与野生型相比矮化显著, 产量显著降低。*spl45* 叶片斑点受光诱导, 其叶片的光合色素明显低于野生型, 叶绿体出现严重受损现象。台盼蓝染色、DAB 染色、过氧化物酶活性检测及 TUNEL 检测发现突变体 *spl45* 植株叶片中有 H₂O₂ 积累及大量 PCD 信号, 并且 POD、CAT、SOD 活性显著降低。通过抗病性鉴定, 发现病斑突变体 *spl45* 与野生型比较, 其稻瘟病抗谱范围拓宽, 同时对稻瘟病和白叶枯病抗性也有所提升。利用图位克隆技术将该基因定位于水稻第 12 号染色体上的 65 kb 区间内, 只有 LOC_Os12g37870 基因的第 5 个外显子经历了单碱基突变(由 A 突变为 T), 导致编码的氨基酸由天冬氨酸变成缬氨酸, 因此把 LOC_Os12g37870 作为候选目的基因(OsSPL45)。qRT-PCR 结果显示, 在突变体 *spl45* 叶片中部分抗病相关基因的表达量极显著高于野生型, OsSPL45 基因在水稻根、茎、叶、鞘、穗中均有表达。研究结论: OsSPL45 与 OsSPL30 互为等位基因, 且基因突变导致突变体 *spl45* 存在褐色类病斑斑点, 抗病相关基因表达被激活, 对稻瘟病及白叶枯病的抗性相对增强。

关键词: 水稻; 类病斑突变体; 突变体 *spl45*; 抗病性;
基因定位

中图分类号: S511

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1673-9868(2025)08-0073-14



收稿日期: 2024-12-23

基金项目: 国家重点研发计划课题(2024YFD1200903); 重庆市技术创新与应用发展项目(CSTB2022020007)。

作者简介: 王秋雨, 硕士研究生, 主要从事水稻遗传研究。

通信作者: 张长伟, 教授, 硕士研究生导师。

Identification and Mapping of a Lesion Mimic Mutant *spl45* Gene in Rice

WANG Qiuyu^{1,2}, ZHAO Mengcan³, WEI Hanghang¹, LU Yicheng¹,
TAN Yudan¹, LI Xinying¹, LIU Jingqiao¹, QIAN Yiming¹,
WANG Shaozhong¹, LIU Bingyang¹, ZHANG Meijie¹,
YANG Jiacheng¹, JIANG Wenchang¹, ZHANG Changwei¹

1. Rice Research Institute of Southwest University/Engineering Research Center of South Upland Agriculture, Ministry of Education, Chongqing 400715, China;
2. Yibin Academy of Southwest University, Yibin Sichuan 644000, China;
3. Kaifeng Academy of Agriculture and Forestry, Kaifeng Henan 475004, China

Abstract: To identify the rice lesion mimic mutant spotted leaf 45 (*spl45*) and further understand the mechanism of disease resistance. Treatment of Xinong 1B with ethyl methanesulfonate (EMS) to screen the lesion mimic mutants, *spl45* formed after multiple generations of selfing. A series of tests including phenotypic identification, agronomic traits investigation, photosynthetic characteristics analysis, shading treatment, histochemical staining, physiological index detection, disease resistance identification and gene localization were performed for *spl45* line. *spl45* line was crossed with Jinhui 10 to obtain F₁ generation and then selfed to obtain F₂ generation for gene mapping. The brown spot-like lesions began to appear at the three-leaf stage of the mutant *spl45* plants, and the lesions increased with the growth of the plant and eventually distributed in the leaves and leaf sheathes of the entire plant. Compared with the wild type, the growth of *spl45* plants was severely stunted and the yield was significantly decreased. The leaf spots of *spl45* were induced by light, and the photosynthetic pigments of leaves were significantly lower than those of the wild type, and the chloroplasts were seriously damaged. The results of Trypan blue staining, diaminobenzidine (DAB) staining, peroxidase activity detection and TdT-mediated dUTP Nick-END Labeling (TUNEL) detection showed the accumulation of hydrogen peroxide (H₂O₂) and a large number of programmed cell death (PCD) signals in the leaves of mutant *spl45* plants, and the activities of peroxidase (POD), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were significantly reduced. The results of resistance identification showed that the resistance spectrum of *spl45* to rice blast was wider than that of the wild type, and the resistance to rice blast and leaf blight was enhanced. Map-based cloning located the gene in the 65 kb region of chromosome 12. Sequencing revealed that only one gene (*LOC_Os12g37870*) in this region had a single base replacement mutation (A/T) in the fifth exon, resulting in the change of encoded amino acid from aspartic acid to valine. Therefore, *LOC_Os12g37870* was selected as a candidate target gene (*OsSPL45*). Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) results showed that the expression levels of some disease-resistance genes in *spl45* leaves were significantly higher than those of the wild type. *OsSPL45* gene expressed in root, stem, leaf, sheath and ear of rice. The results reveal the *OsSPL45* is allelic to *OsSPL30*. The plants of this mutant could show spot-like lesions and inhibited plant growth, while the expression of some resistance-related genes is activated, thereby enhancing the resistance to rice blast and bacterial blight.

Key words: rice; lesion mimic mutant; mutant *spl45*; disease resistance; gene mapping

在自然界的物种中, 基因突变会产生某一类突变体植株, 这类植株的性状主要表现在无明显病原菌侵染、机械损伤等相关条件刺激下, 茎秆、叶片、叶鞘、穗等部位会自发产生坏死斑点, 其表型特征与过敏反应(Hypersensitive Response, HR)相似, 但不存在致病因子, 人们将这类突变体统称为类病斑突变体(Lesion Mimic Mutants, LMMS)^[1-2]。一般植物类病斑突变体内会引起大量过氧化物(Reactive Oxygen Species, ROS)积累、相关防御基因表达上调、细胞程序性死亡(Programmed Cell Death, PCD)、植保素激增等自发防御反应^[3-4]。

水稻在生长发育过程中会遭遇多种病害威胁, 主要包括白叶枯病、稻瘟病、纹枯病、白粉病等, 而在我国南方地区稻瘟病和白叶枯病为常见的两种水稻植株病害。其中, 水稻稻瘟病是由稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)引起的一种真菌性病害, 全球每年因该病造成的产量损失有 10%~30%, 严重时竟会导致稻谷颗粒无收^[5-6]。白叶枯病则是由革兰氏阴性黄单胞杆菌致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)引起的细菌性病害, 也是我国南方稻区主要的细菌性病害, 严重降低水稻的光合作用, 对稻米产量及品质具有较大影响^[7-9]。研究表明, 类病斑突变体植株往往表现出对稻瘟病及白叶枯病抗性效果显著^[10-12], 如 *rbl1* 通过影响磷脂酰肌醇的合成来控制 PCD 与免疫反应, 突变体植株对稻瘟病菌和白叶枯病菌的抗性明显优于野生型^[13], *spl33* 编码一个 eEF1A-like 蛋白, 能够负调控植物的免疫反应, 其功能缺失使 *spl33* 对病原稻瘟病和白叶枯病具有广谱抗性^[14], *lmm8* 存在原卟啉原氧化酶(Protoporphyrinogen Oxidase, PPOX)的基因缺陷而表现出对稻瘟病菌与白叶枯病菌的高抗性等^[15]。学者们认为研究导致水稻类病斑发生的基因是破译防御途径的关键, 有助于提高植物广谱病原体抗性。

本研究的前期工作已获得遗传性状稳定的类病斑突变体 *spl45*, 并对突变体 *spl45* 进行了一系列性状考察及相关实验, 可为深入探究候选目的基因的分子调控机制, 创制优良抗病水稻种质资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

突变体植株 *spl45*, 利用甲基磺酸乙酯(Ethyl Methane Sulphonate, EMS)诱变剂处理籼型杂交水稻 Xinong 1B 获得, 经世代自交后突变体植株表型稳定。将突变体 *spl45* 与 Jinhui 10 杂交所得 F₁ 代再自交获得 F₂ 代, 用于基因定位。

1.2 实验方法

1.2.1 突变体 *spl45* 的表型分析

于 2023 年 4 月在西南大学水稻研究所歇马基地进行材料种植, 分别栽种野生型(WT)Xinong 1B 及突变体 *spl45* 植株, 采用常规水稻种植管理方式, 从苗期开始观察突变体与野生型植株的表型差异, 拍照记录类病斑出现的时期及形态特征。

1.2.2 农艺性状考察

在植株完全成熟后, 分别随机选取 10 株 WT、10 株突变体 *spl45* 植株, 对其株高、穗长、穗粒数、结实率等农艺性状进行详细调查, 并对这些数据结果进行 *t* 检验分析。

1.2.3 光合色素含量和光合参数测定

选择分蘖期具有代表性的 WT 和突变体 *spl45* 植株, 参照 Arnon^[16] 和张晓艳等^[17] 的方法进行光合色素含量测定, 剪碎剑叶、倒二叶、倒三叶后称取 0.1 g 放入 10 mL 丙酮和纯水混合液(V/V=4:1)试管中, 黑暗处理 48 h 期间多次振荡后, 测定 663 nm、645 nm、470 nm 处的吸光度值, 计算光合色素含量。

利用便携式光合作用测定仪(Li-6800)测定抽穗期剑叶、倒二叶、倒三叶叶片的光合参数。每组样品重复 3 次,野生型和突变体结果进行 t 检验分析。

1.2.4 冷冻切片

植株分蘖期分别在 WT 和突变体 *spl45* 的剑叶中部剪取约 1 cm 长的叶片,石蜡包埋后用冷冻切片机将其切成 25 μm 薄片,将薄片放置在载玻片用 ddH₂O 反复冲洗,使载玻片中仅有叶片薄片,盖上盖玻片,在荧光显微镜(OLYMPUS, 18A16537)下观察拍照。

1.2.5 遮光处理

对分蘖期 WT 及突变体 *spl45* 的倒二叶进行遮光。以 WT 为对照,用宽度为 2 cm 的锡纸对 *spl45* 未产生斑点的叶片进行遮光处理,7 d 后将锡纸摘除并拍照,复光 7 d 后再次拍照观察。

1.2.6 组织化学染色

台盼蓝染色:在植株分蘖期剪取有表型的 WT 和突变体 *spl45* 叶片,然后将叶片浸泡在台盼蓝溶液中,真空 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅加热 2 min 后冷却,在室温下放置 12 h 后,再用 25 mg/mL 水合氯醛溶液进行脱色。脱色后进行拍照记录。

二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)染色:植株分蘖期剪取有表型的 WT 和突变体 *spl45* 叶片进行二氨基联苯胺(DAB)染色,将叶片放入 1 mg/mL 的 DAB 染液中,真空处理 15 min 后避光室温下放置 20 h,然后将 DAB 染液倒掉,再将叶片浸泡在无水乙醇中进行水浴脱色,更换无水乙醇反复脱色使叶绿素完全去除,观察叶片中褐色斑点的相应位置,拍照保存。

脱氧核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TdT-mediatedd UTP Nick-END Labeling, TUNEL)染色:取分蘖期 WT 和突变体 *spl45* 的叶片放入甲醛-乙酸-乙醇(FAA)固定液中室温放置 24 h,再放入装有包埋剂(Tissue-Tek, SAKURA)的离心管中,待包埋剂完全凝固,利用切片机(Thermo Scientific, USA)切至 6~12 μm 厚度蜡片,然后将蜡片移至载玻片上用 ddH₂O 展开,再置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱 3 d,除去多余水分。依次进行脱蜡、透膜、末端标记、DAPI 染色,吸去载玻片液体,封片,利用激光共聚焦显微镜拍照,方法参照 DeadEnd 荧光 TUNEL 系统试剂盒(Promega, 美国)执行。

1.2.7 生理指标测定

在分蘖阶段随机选取 3 株突变体 *spl45* 和 WT 倒二叶,取 0.2 g,使用南京建成生物公司的试剂盒来检测过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的含量,结果进行 t 检验分析。

1.2.8 稻瘟病和白叶枯病抗病性鉴定

在西南大学水稻研究所歇马基地内对 WT 和突变体 *spl45* 进行稻瘟病抗谱测定及白叶枯病抗性鉴定检验。参照黄富等^[18]的方法进行稻瘟病菌接种液制备,对 3 叶期水稻幼苗进行单孢悬浮液喷施接种稻瘟病,田间抗病等级评价参照国际水稻研究所(IRRI)水稻稻瘟病评级系统标准^[19]。再参照孙富等^[20]的方法对 WT 和突变体 *spl45* 进行水稻白叶枯病人工接种鉴定。

1.2.9 突变体遗传分析与基因精细定位

以 Jinhui 10 为母本、以突变体 *spl45* 为父本进行杂交获得 F₁ 代,而后 F₁ 自交获得 F₂ 代群体,利用卡方检测分析 F₂ 群体的分离比。构建基因混池,利用实验室已备差异引物进行连锁位点的初步确认,在初定位区间内设计 indel 标记进行基因精细定位,引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列

引物名称	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')
RM6869	GAGCTCCTTG TAGTGACCCG	ATCAGCCTCGCCAGCTTC
RM6410	AGCTACTACCCACGGCAATG	ACCTCCATGTGCTCCCATAC
RM8013	GTGGAGGTGGTGGTCGAGT	CCTCCAAGAAGCTCTCTCTCC
RM7614	CAAGGTTTCATGCACGATCAGC	GCCCAATACTTCCGGCCTAA
Indel6-1	TGCGAACGGAGAGTTTGGTT	CACTTGACCAAGGCGCAAA
Indel6-2	GTGTCGCATTGGTTGGCAAT	GGTGACCTTGTAGCTACGG
Indel6-3	CGGATAGCGAACGATTTGCG	GATACCGAGCCTACTGTGCGG
Indel6-4	TGGACCGTGAGAGACCATTTG	AACTAACCGTTGGAGGCCAA

1.2.10 目的基因和病程相关基因的表达分析

基因表达分析使用 KKFast Plant RNAPURE Kit(庄盟生物)提取野生型和突变体 *spl45* 的 RNA, 用 RT MIX with DNase Kit(yuyi-Landi 生物, 中国)进行逆转录。所得产物稀释 20 倍后, 使用 CFX Connect 系统(Bio-Rad, 美国)和 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(TaKaRa, 日本)进行反转录定量分析(Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR), 设置 3 个生物重复。所有相关基因表达引物均参照 Gramene 数据库(<http://www.Gramene.org/>)中的基因序列, 以 *OsActin1* 为内参基因进行设计, 定量引物序列如表 2 所示。

表 2 定量引物序列

引物名称	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')
<i>OsPR1a</i> -qPCR	TTCATCACCTGCAACTACTCG	TGCATAAACACGTAGCATAGCAT
<i>OsPR1b</i> -qPCR	AACTACGCCAGCCAGAGA	CTTGCGGAGAACCTCTTC
<i>OsNPR1</i> -qPCR	AAGAACACTTAGCTCGGATGAC	CTTCTCGTGTCAACTCACCA
<i>OsPR10</i> -qPCR	CACCATCTACACCATGAAGC	AGCACATCCGACTTTAGGAC

采用 GraphPad Prism 8.0.2(<http://www.graphpad.com/>)软件进行统计分析。并用 *t* 检验对实验数据进行验证。

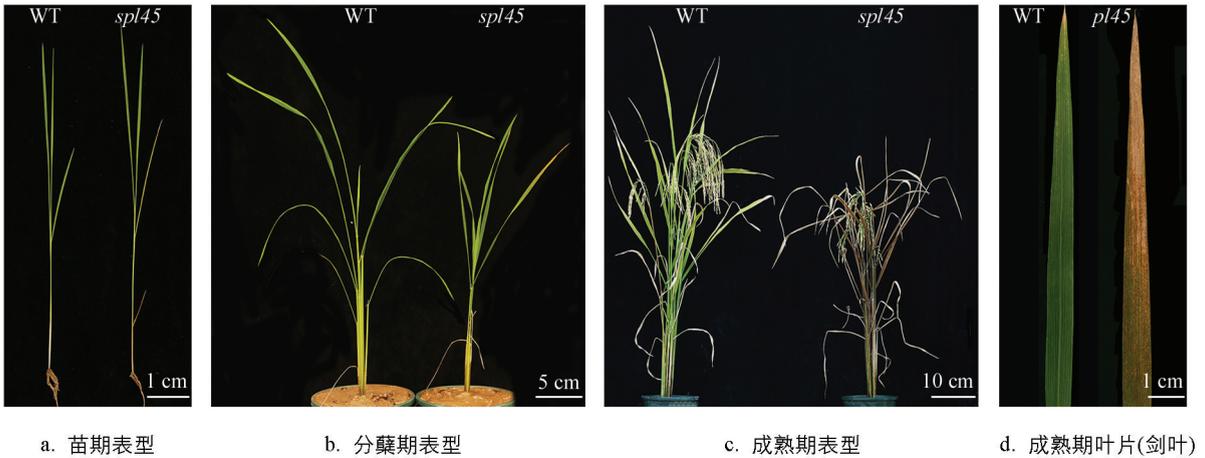
2 结果与分析

2.1 WT 和突变体 *spl45* 的表型鉴定

WT 和突变体 *spl45* 的表型鉴定如图 1a-d 所示。突变体 *spl45* 在三叶期从最下部叶片开始出现褐色类病斑, 由叶尖逐渐向内扩散至叶鞘, 随着时间的推移, 坏死斑点数目越来越多, 至分蘖期除新生叶外, 其余叶片及叶鞘均出现类病斑表型, 并且突变体 *spl45* 植株还表现出明显的早衰和矮化现象。

2.2 WT 和突变体 *spl45* 的主要农艺性状分析

对 WT 和突变体 *spl45* 的主要农艺性状数据, 如株高、穗长、有效穗数、每穗粒数等进行统计分析(表 3), 发现相较于 WT, 突变体 *spl45* 的株高、穗长、有效穗数、千粒质量和结实率都呈现出极显著下降状态($p < 0.01$), 分别降低了 16.7%、11.2%、19.9%、19.6%、50.0%, 但在每穗粒数方面无统计学意义。

图 1 WT 和突变体 *spl45* 的表型鉴定表 3 WT 和突变体 *spl45* 的主要农艺性状

材料	株高/cm	穗长/cm	有效穗数/株	每穗粒数/粒	千粒质量/g	结实率/%
WT	87.52±3.05	22.48±1.00	7.90±1.10	128.14±11.38	243.76±9.78	92.66%±0.02
突变体 <i>spl45</i>	72.88±1.85**	19.95±0.84**	6.33±0.71**	116.82±13.31	196.02±16.00**	46.33%±0.08**

注: ** 表示 $p < 0.01$ 水平差异具有统计学意义。

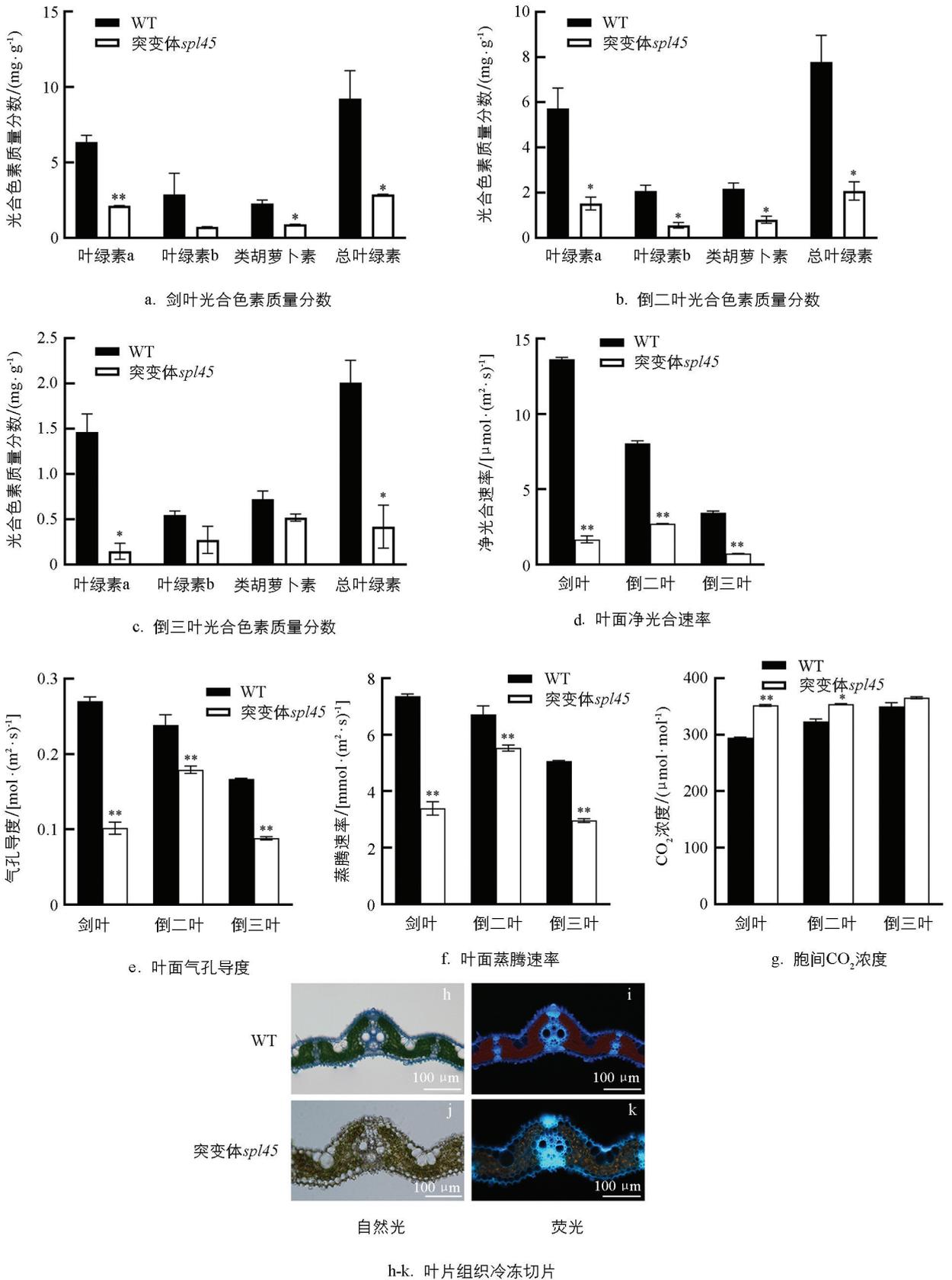
2.3 WT 和突变体 *spl45* 的光合特性分析

在 WT 和突变体 *spl45* 植株的抽穗期,对剑叶至倒三叶的光合色素质量分数进行检测。结果显示,突变体 *spl45* 植株剑叶、倒二叶、倒三叶中的叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素和总叶绿素的光合色素质量分数都显著低于 WT(图 2a-c)。与此同时,突变体 *spl45* 植株剑叶、倒二叶、倒三叶的净光合速率、气孔导度及叶面蒸腾速率效果也显著低于 WT,而突变体 *spl45* 植株剑叶和倒二叶的胞间 CO_2 浓度却明显升高(图 2d-g)。这些结果表明,与 WT 相比突变体 *spl45* 光合能力减弱。

为了进一步验证突变体 *spl45* 的光合能力相较于 WT 减弱,本研究对分蘖期的 WT 和突变体 *spl45* 叶片组织进行冷冻切片,发现突变体 *spl45* 在自然光下叶绿体明显失绿。在荧光显微镜下进行观察,发现其叶片中叶绿体自发产生的红色荧光强度明显弱于 WT(图 2h-k),说明突变体 *spl45* 的叶绿体出现严重受损,光合能力减弱。

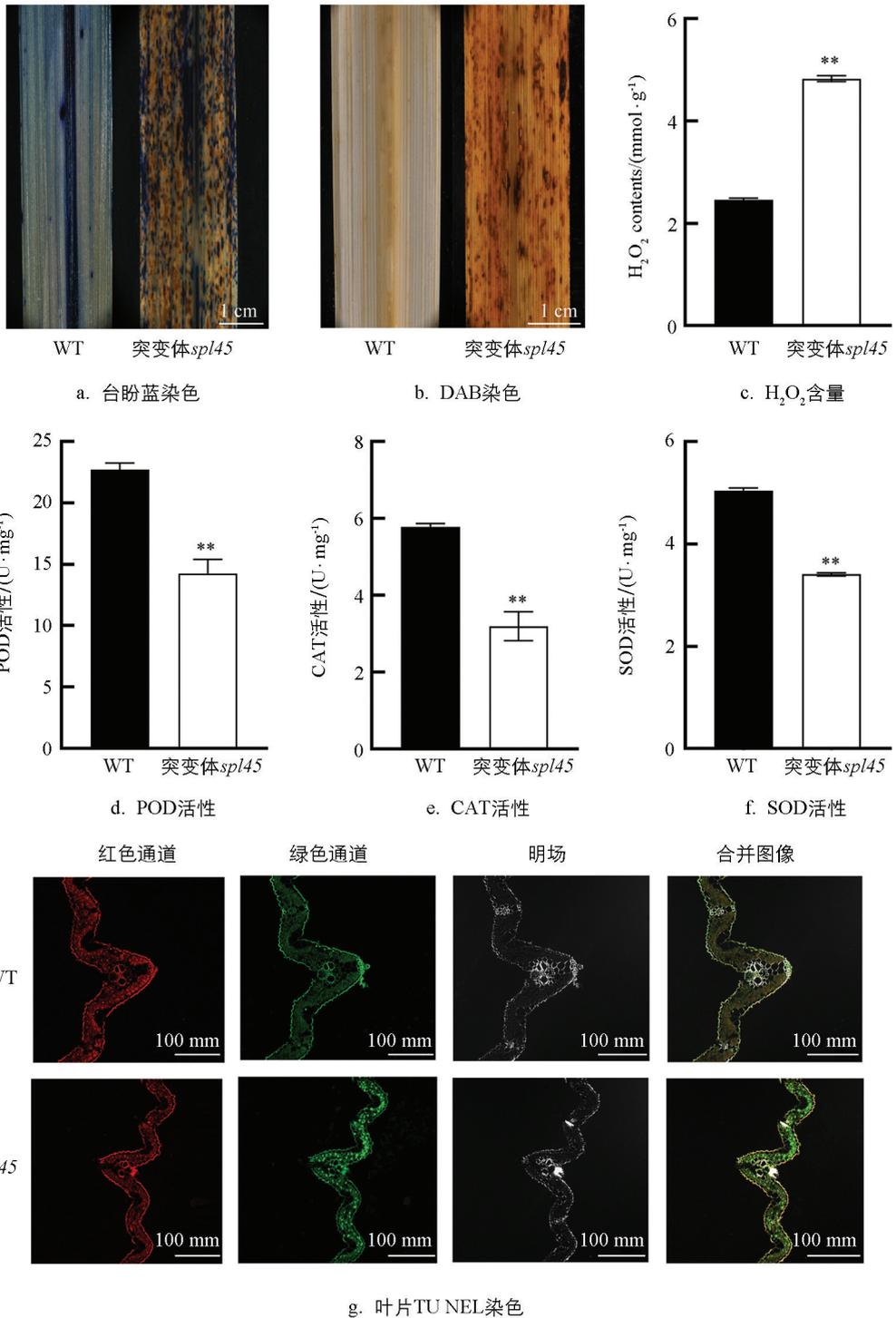
2.4 突变体 *spl45* 叶片的 ROS 积累与 PCD 分析

对分蘖期 WT 和突变体 *spl45* 进行了台盼蓝染色与 DAB 染色比较,以深入了解突变体 *spl45* 所引发的生理生化反应。台盼蓝染色结果显示,突变体 *spl45* 叶片的类病斑区域部位及周边被染成了深蓝色,而 WT 叶片则呈现出均匀的浅蓝色(图 3a),意味着突变体 *spl45* 叶片上出现了严重的细胞程序性死亡现象。通过对突变体 *spl45* 叶片的 DAB 染色,可以观察到病斑区域有严重的褐色斑点出现(图 3b),表明突变体 *spl45* 叶片上积累了大量的过氧化物;通过对 WT 和突变体 *spl45* 叶片进行 H_2O_2 含量和过氧清除酶活性测定,发现突变体 *spl45* 的 H_2O_2 含量显著高于 WT(图 3c),与 DAB 染色结果一致;其 POD、CAT 和 SOD 的活性显著低于 WT(图 3d-f)。由图 3 可知,突变体 *spl45* 在清除活性氧方面的能力有所降低,进一步导致了大量过氧化物积累,从而触发了细胞的程序性死亡。



*、** 分别表示 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 水平差异具有统计学意义。

图 2 WT 和突变体 *spl45* 的光合特性



** 表示 $p < 0.01$ 水平差异具有统计学意义。

图 3 WT 和突变体 *spl45* 的 ROS 积累和 PCD 分析

为进一步验证在突变体 *spl45* 出现的类病斑表型是细胞程序性死亡, 本研究对材料叶片进行了 TUNEL 检测。结果显示, 在 WT 叶片细胞中几乎没有绿色荧光信号存在, 而突变体 *spl45* 叶片细胞中的绿色荧光信号极为明显(图 3g), 表明在突变体 *spl45* 叶片中存在大量的 PCD 信号, 能够触发植株叶片细胞发生细胞程序性死亡。

2.5 突变体 *spl45* 类病斑表型受光照影响分析

在抽穗期突变体 *spl45* 倒二叶叶片尖部刚出现斑点时, 利用锡纸对未出现斑点的叶片部位进行遮光, WT 也采取相应处理。7 d 后去除锡纸拍照观察, 发现 WT 遮光部分没有斑点产生而突变体 *spl45* 有少量斑点产生(图 4a)。复光一周后, WT 未产生斑点, 而突变体 *spl45* 迅速产生大量新的斑点且斑点遍布整个叶片(图 4b)。由此可见, 突变体 *spl45* 叶片斑点产生受光照的影响。

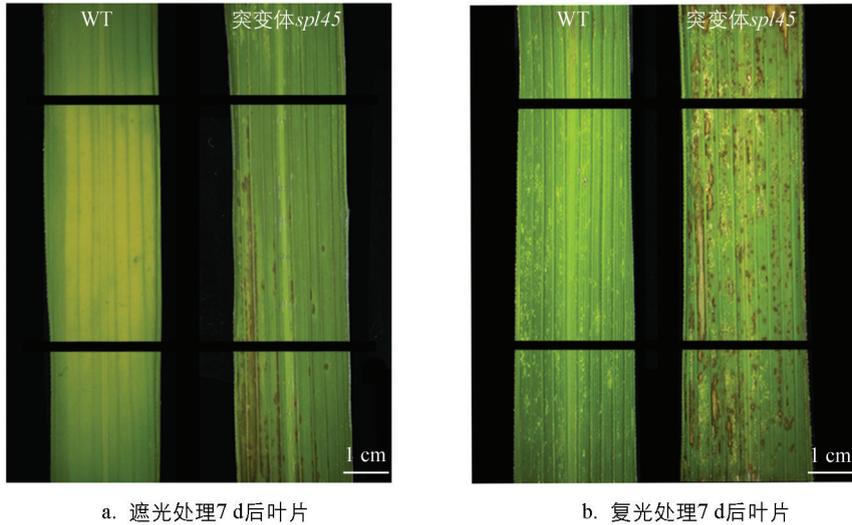


图 4 WT 和突变体 *spl45* 的遮光处理

2.6 抗谱及抗性鉴定

在大田中对 WT 和突变体 *spl45* 进行稻瘟病抗谱测定(表 4)。供试稻瘟病菌株划分为 ZA、ZB、ZC、ZD 共 4 个生理种群。苗期 WT 和突变体 *spl45* 接种稻瘟病菌 7 d 后待病情相对稳定时统计发病情况。结果显示, 突变体 *spl45* 对稻瘟病的总群抗谱频率宽于 WT, 其对优势生理种群 ZB、次优势生理种群 ZC 的抗病频率分别为 100%、92.31%, 对 ZA、ZD 两个生理种群的抗谱频率与 WT 无差异, 表明突变体 *spl45* 的稻瘟病抗谱较 WT 有所拓宽。对 WT 和突变体 *spl45* 进行稻瘟病抗性鉴定, 发现突变体 *spl45* 稻瘟病抗性显著提高(图 5a—b)。

孕穗期对 WT 和突变体 *spl45* 进行白叶枯病菌接种试验, 接种 14 d 时调查其叶片病斑蔓延情况并记录病斑长度和病斑占叶片比, 发现突变体 *spl45* 的白叶枯病菌病斑长度和病斑占叶片比显著低于 WT(图 5c—e)。

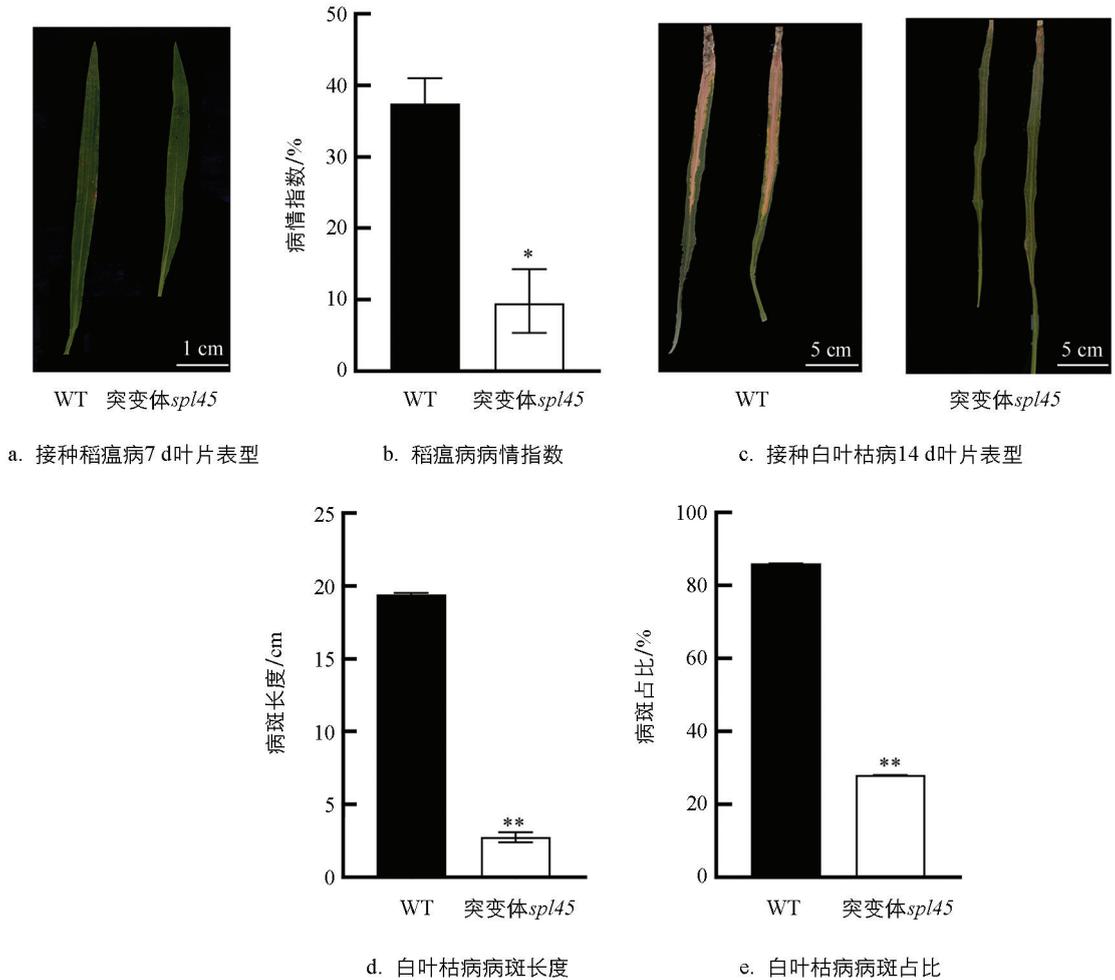
综上, 突变体 *spl45* 相较于 WT, 其稻瘟病抗谱拓宽, 稻瘟病和白叶枯病抗性增强。

表 4 WT 和突变体 *spl45* 的稻瘟病抗谱测定

材料名称	总群抗谱频率/%	种群抗谱频率/%			
		ZA	ZB	ZC	ZD
Xinong 1B(WT)	91.67	100	84.21	92.3	100
突变体 <i>spl45</i>	97.91	100	100.00	92.31	100

2.7 突变体 *spl45* 的遗传分析

采用 Jinhui 10 号作为母本与突变体 *spl45* 作父本进行杂交获得 F_1 , 然后 F_1 自交得到 F_2 , 共 2 590 株。本研究观察到在 F_2 群体中有性状分离现象。突变体 *spl45* 基因的遗传分析如表 5 所示, 其中正常株为 1 947 株, 突变株为 643 株, 分离比为 3.03 : 1。通过卡方分析($\chi^2 = 0.68 < \chi_{0.05}^2 = 3.84$), 卡方值远小于临界值, 符合 3 : 1 的理论分离比。由此可知, 突变体 *spl45* 表型是受一对隐性基因控制。



*、**表示 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 水平差异具有统计学意义。

图 5 WT 和突变体 *spl45* 的抗病性鉴定

表 5 突变体 *spl45* 基因的遗传分析

组合	F ₁	F ₂			分离比
		总数	正常型	突变型	
突变体 <i>spl45</i> /Jinhui 10	正常叶色	2 590	1 947	643	3.03 : 1

2.8 *OsSPL45* 的基因定位

OsSPL45 的基因定位如图 6 所示。以突变体 *spl45* 与 Jinhui 10 杂交的 F₂ 群体作为材料进行基因定位, 并使用均匀分布在水稻所有染色体上的 SSR(Simple Sequence Repeats) 标记引物进行差异性条带检验, 发现在第 12 号染色体编号为 RM6410 和 RM8013 的分子标记之间存在显著的连锁效应。本研究在这两个分子标记之间设计 4 对 InDel 标记, 并将目标基因定位于 Indel6-1 和 Indel6-2 之间的 65 kb 区间上。利用 Gramene 数据库(<http://www.gramene.org>) 和 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 来预测候选基因。经过序列检测发现, 仅有编号为 *LOC_Os12g37870* 的基因编码区上第 5 个外显子经历了从碱基 A 到 T 的突变, 导致其编码的氨基酸从天冬氨酸转变为缬氨酸, 因此将 *LOC_Os12g37870* 作为 *OsSPL45* 的候选目的基因。

2.9 病程相关基因及候选目的基因的表达模式分析

病程相关基因和目的候选基因相对表达量如图 7 所示。通过 qRT-PCR 技术对分蘖期 WT 和突变体 *spl45* 叶片中病程相关基因进行检测, 发现突变体 *spl45* 的 *OsPR1a*、*OsPR10*、*OsNPR1* 和 *OsPR1b* 表达量极显著高于 WT, 表明突变体 *spl45* 类病斑的出现可能触发了这些病程相关基因的过量表达, 从而增强

了对稻瘟病菌和白叶枯病菌的抵抗力(图 7a-d)。

对孕穗期 WT 根、茎、叶、鞘、穗候选目的基因的表达模式进行分析, 结果显示 *OsSPL45* 在水稻各个部位均有表达, 特别是在茎、叶、叶鞘中的表达量尤为显著(图 7e)。

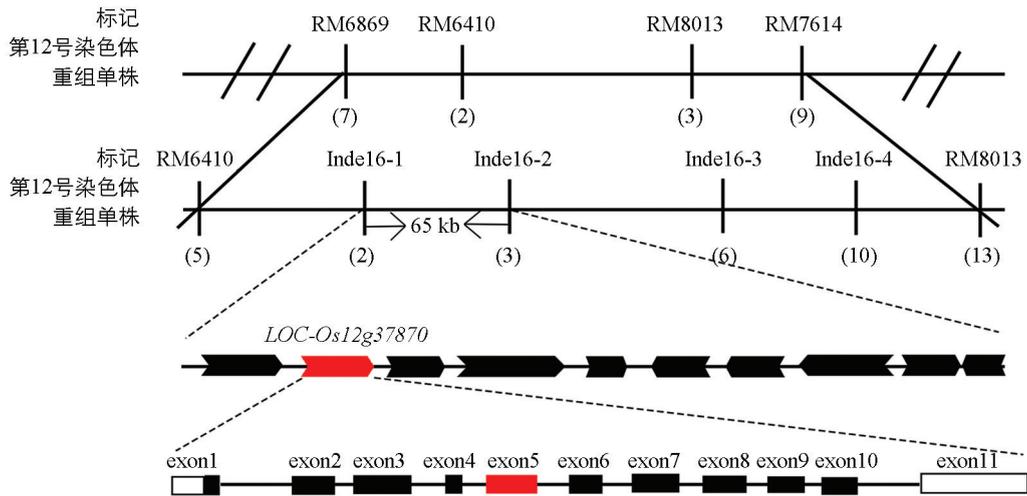
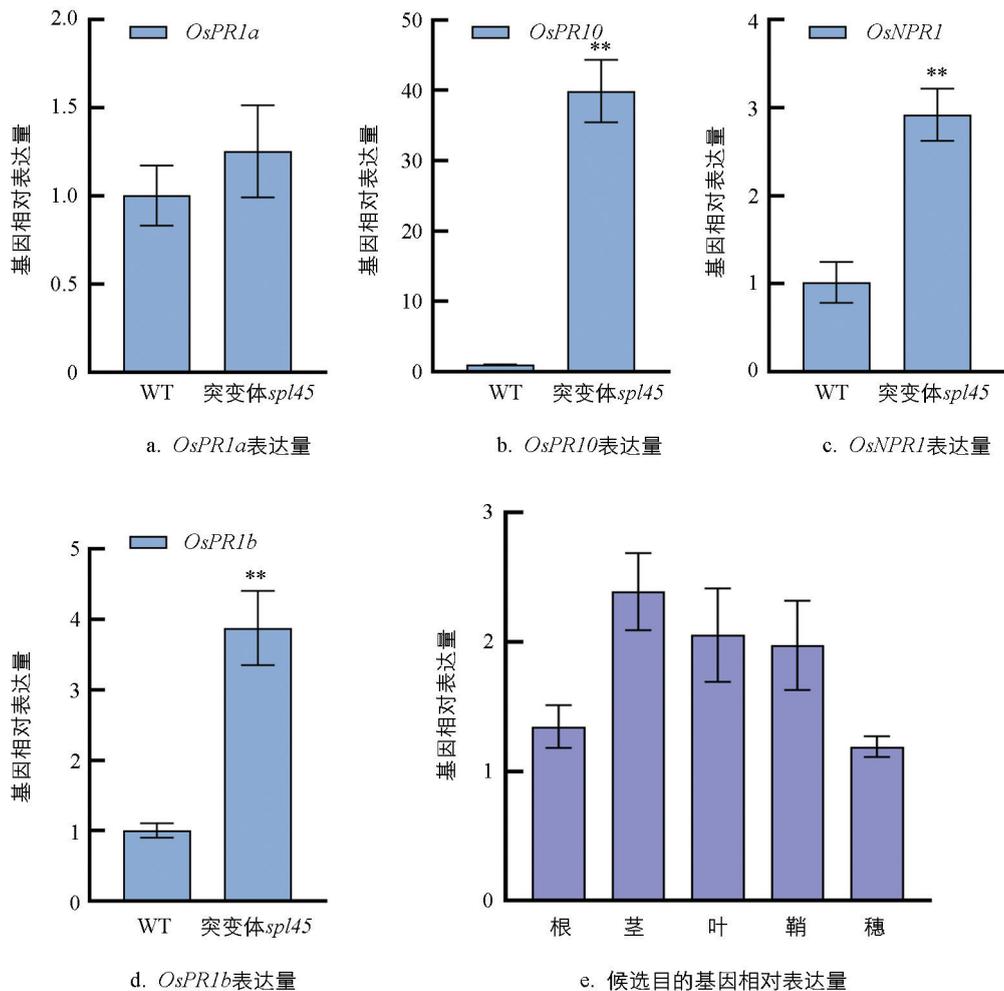


图 6 *OsSPL45* 的基因定位



** 表示 $p < 0.01$ 水平差异具有统计学意义。

图 7 病程相关基因和候选目的基因相对表达量

3 讨论与结论

3.1 讨论

根据出现的时间阶段,类病斑表型可以被分为 3 个不同类型,包括全生育期型、营养生长阶段起始型及生殖生长阶段起始型^[21]。全生育期型指的是从突变体植物幼苗期一直到种子成熟的过程中,植物体持续出现有类病斑现象,而后两种类型则是在植株生长到某一特定阶段后出现类病斑表型。例如, *lms1* 突变体在幼苗期便出现了褐色类病斑,这些类病斑会随着植株发育而逐渐扩散,最终在结实期斑点会遍布整个植株^[22]。从突变体 *spl41* 的三叶期开始,植株叶片上开始逐渐出现红褐色斑点,然后叶片上的坏死斑数量和面积逐渐增加,导致整个叶片变黄并枯死^[23]。像 *lmm7*^[24] 和 *spl33*^[14] 等突变体类病斑,在分蘖期才出现类病斑症状,并在后期生长阶段持续形成这类病斑。突变体 *spl45* 在幼苗期叶尖上就开始出现褐色斑点,随着植株生长和发育,这些坏死的褐色病斑数量逐渐增加,到了成熟期病斑已经遍布整个植株的叶片和叶鞘,表明 *spl45* 是一个典型的全生育期型水稻类病斑突变体。

大部分类病斑突变体的斑点会受到自然光的诱导且光合能力下降^[12]。遮光实验及光合特性分析结果表明,突变体 *spl45* 上的类病斑受到光诱导,对自然光的利用能力减弱。类病斑突变体斑点部位及周围通常出现细胞程序性死亡,植株抗病能力有所转变的特点^[25-27]。植物细胞 PCD 信号对植物有效免疫和防御病原体侵入具有至关重要的作用^[28-29],通过诱导植物细胞死亡有助于限制病原体在入侵部位生长和增殖,从而提高自身抗病能力。已经报道的许多水稻类病斑突变体,如 *spl21*、*spl4*、*LIL1*、*sles*、*lmes6* 等发病部位常存在大量细胞程序性死亡,坏死病斑的部位及周围通常有活性氧过量积累,对某些常见水稻病害抗性显著增强^[30-34]。本研究突变体 *spl45* 表现出明显的细胞死亡现象,在叶片内有大量 H_2O_2 积累,清除酶稳态被破坏,对稻瘟病和白叶枯病具有广谱抗性,同时突变体 *spl45* 中部分防卫基因被激活,这些基因的表达量显著高于正常值。

近年来,水稻中与类病斑形成相关的基因相继被克隆出来,这些类病斑基因可编码不同类型的蛋白,包括转录调控因子、泛素连接酶、剪切因子、离子通道蛋白、蛋白激酶等^[35]。例如, *spl33* 编码蛋白可以结合不同的靶蛋白,从而介导不同的细胞凋亡过程^[14, 36]。*oscul3a* 突变体编码 Cullin 蛋白, Cullin3、RBX1 和 BTB 蛋白组成 RING 型 E3 泛素连接酶,然后介导 OsNPR1 泛素化,从而负调控细胞死亡和免疫反应^[37]。*llb* 编码叶绿体甲基转移酶 OsMTS1,可以直接或间接抑制油菜素内酯与茉莉酸的介导反应来影响水稻的防卫反应和生长应答^[38]。本研究发现突变体 *spl45* 的变异表现受到一对隐性基因控制,经测序发现突变体 *spl45* 的 *LOC_Os12g37870* 基因编码区上第 5 外显子的碱基发生突变(A/T),编码氨基酸由天冬氨酸变为缬氨酸,导致翻译的蛋白质失去原有功能。*OsSPL45* 与先前报道的 *OsSPL30*^[39] 互为等位基因,但突变位点存在差异。据分析, *OsSPL45* 异常编码一种 ATP 柠檬酸裂解酶(ATP-citrate lyase, ACL),该酶正常情况下在糖类的三羧酸循环(TCA)过程中催化柠檬酸和 CoA 生成草酰乙酸和乙酰 CoA,其中乙酰 CoA 处于调节能量流动和物质循环的代谢中心,其分子合成对水稻生长和应激反应至关重要^[40-42]。然而, *OsSPL45* 具体如何影响 TCA 过程还需进一步研究。

3.2 结论

突变体 *spl45* 是全生育期型受光诱导的水稻类病斑突变体,其三叶期开始出现褐色斑点类病斑,至分蘖期斑点分布于整个植株的叶片和叶鞘,并且该突变体在整个生长发育期都具有矮化和早衰表型。突变体 *spl45* 相较于 WT 光合色素含量降低,光合作用受阻,从而导致产量等农艺性状显著下降。突变体 *spl45* 的 H_2O_2 积累量在出现类病斑的部位相较于 WT 显著升高、PCD 信号增强,POD、CAT、SOD 活性较 WT 显著降低。突变体 *spl45* 叶片中抗性相关基因过量表达,对稻瘟病和白叶枯病的抗性相较于 WT 也显著增强。遗传分析表明,突变体 *spl45* 表型是由一对隐性核基因控制,且该基因定位于突变体的 12 号染色体上,通过测序把 *LOC-Os12g37870* 作为 *OsSPL45* 的候选目的基因。

参考文献:

- [1] 焦然, 徐娜, 胡娟, 等. 水稻类病斑突变体性状及分子机理研究进展 [J]. 中国水稻科学, 2018, 32(3): 285-295.
- [2] HEATH M C. Hypersensitive Response-Related Death [J]. Plant Molecular Biology, 2000, 44(3): 321-334.
- [3] 张习春, 李祖军, 唐会会, 等. 广谱抗性基因 *Pi9* 导入改良水稻“大粒香”稻瘟病抗性的研究 [J]. 中国稻米, 2024, 30(4): 86-88.
- [4] YAN J J, FANG Y X, XUE D W. Advances in the Genetic Basis and Molecular Mechanism of Lesion Mimic Formation in Rice [J]. Plants, 2022, 11(16): 2169.
- [5] 朱小丽, 陶跃之, 周波. 水稻抗稻瘟病基因的复等位分布特征及其在基因挖掘中的应用 [J]. 浙江农业学报, 2015, 27(10): 1789-1796.
- [6] DEVANNA B N, JAIN P, SOLANKE A U, et al. Understanding the Dynamics of Blast Resistance in Rice-*Magnaporthe oryzae* Interactions [J]. Journal of Fungi, 2022, 8(6): 584.
- [7] JI Z Y, WANG C L, ZHAO K J. Rice Routes of Countering *Xanthomonas oryzae* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(10): 3008.
- [8] 徐夏萌, 沈丽丽, 闫佳丽, 等. 我国水稻白叶枯病和条斑病发生与防控研究进展 [J]. 植物保护, 2023, 49(5): 43-49.
- [9] NIÑO-LIU D O, RONALD P C, BOGDANOVA A J. *Xanthomonas oryzae* Pathovars: Model Pathogens of a Model Crop [J]. Molecular Plant Pathology, 2006, 7(5): 303-324.
- [10] SONG G, KWON C T, KIM S H, et al. The Rice *SPOTTED LEAF4* (*SPL4*) Encodes a Plant Spastin that Inhibits ROS Accumulation in Leaf Development and Functions in Leaf Senescence [J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 9: 1925.
- [11] 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.
- [12] CAI L J, 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.
- [13] SHA G, SUN P, KONG X J, et al. Genome Editing of a Rice CDP-DAG Synthase Confers Multipathogen Resistance [J]. Nature, 2023, 618(7967): 1017-1023.
- [14] WANG S, LEI C L, WANG J L, 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.
- [15] ZHAO M C, GUO Y X, SUN H, et al. Lesion Mimic Mutant 8 Balances Disease Resistance and Growth in Rice [J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1189926.
- [16] ARNON D I. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris [J]. Plant Physiology, 1949, 24(1): 1-15.
- [17] 张晓艳, 李连国, 郭金丽, 等. 欧李叶片光合色素提取方法的比较分析 [J]. 北方园艺, 2021, 40(9): 140-149.
- [18] 黄富, 程开禄, 彭国亮, 等. 四川省水稻品种抗稻瘟病性规范化鉴定评价体系 [J]. 中国农业大学学报, 1998, 3(S1): 22-26.
- [19] INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. Standard Evaluation System for Rice (SES). Los Baños, Philippines: IRRI, 2002: 14-18
- [20] 孙富, 唐梅, 卢宏琮, 等. 抗稻瘟病水稻恢复系的分子标记辅助选育及抗性鉴定 [J]. 南方农业学报, 2024, 55(4): 1070-1078.
- [21] 沈旺鑫, 史小品, 杜海波, 等. 水稻类病斑突变体基因克隆及发生机制研究进展 [J]. 江苏农业学报, 2022, 38(3): 837-848.
- [22] 余瑶, 王紫瑶, 周思睿, 等. 水稻类病斑突变体 *lms1* 的表型鉴定与抗病分子机制分析 [J]. 作物学报, 2024, 50(4): 857-870.
- [23] 任伊佳, 朱柏光, 陶均, 等. 水稻类病斑突变体 *spl41* 的表型鉴定及生理分析 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(6):

1967-1973.

- [24] 孙志广, 代慧敏, 陈庭木, 等. 水稻类病斑突变体 *lmm7* 的鉴定与基因定位 [J]. 中国水稻科学, 2022, 36(4): 357-366.
- [25] ZAVALIEV R, UEKI S, EPEL B L, et al. Biology of Callose (β -1, 3-Glucan) Turnover at Plasmodesmata [J]. Protoplasma, 2011, 248(1): 117-130.
- [26] RADFORD J E, VESK M, OVERALL R L. Callose Deposition at Plasmodesmata [J]. Protoplasma, 1998, 201(1): 30-37.
- [27] 于东立, 宋晓欧, 鲍亚林, 等. 通过定量蛋白组学研究 OsGLO1 对稻瘟病抗性的调控机制 [J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(1): 71-78.
- [28] DANGOL S, CHEN Y F, HWANG B K, et al. Iron- and Reactive Oxygen Species-Dependent Ferroptotic Cell Death in Rice- Magnaporthe oryzae Interactions [J]. The Plant Cell, 2019, 31(1): 189-209.
- [29] ZHU X B, ZE M, MAWSHENG C, et al. Deciphering Rice Lesion Mimic Mutants to Understand Molecular Network Governing Plant Immunity and Growth [J]. Rice Science, 2020, 27(4): 278-288.
- [30] 宋莉欣, 黄奇娜, 奉保华, 等. 水稻斑点叶突变体 *spl21* 的鉴定与基因定位 [J]. 作物学报, 2015, 41(10): 1519-1528.
- [31] KE S W, LIU S C, LUAN X, et al. Mutation in a Putative Glycosyltransferase-Like Gene Causes Programmed Cell Death and Early Leaf Senescence in Rice [J]. Rice, 2019, 12(7): 1-14.
- [32] ZHOU Q, ZHANG Z F, LIU T T, et al. Identification and Map-Based Cloning of the Light-Induced *Lesion Mimic Mutant 1 (LIL1)* Gene in Rice [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 2122.
- [33] LEE D, LEE G, KIM B, et al. Identification of a Spotted Leaf Sheath Gene Involved in Early Senescence and Defense Response in Rice [J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1274.
- [34] 胡瑶洁, 刘亚萍, 郑君妍, 等. 水稻类病变早衰突变体 *lmes6* 的表型鉴定与基因定位 [J]. 作物学报, 2024, 50(11): 2764-2774.
- [35] WANG S H, LIM J H, KIM S S, et al. Mutation of *SPOTTED LEAF3 (SPL3)* Impairs Abscisic Acid-Responsive Signalling and Delays Leaf Senescence in Rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(22): 7045-7059.
- [36] WANG S, LEI C L, WANG J L, 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.
- [37] LIU Q N, NING Y S, ZHANG Y X, et al. OsCUL3a Negatively Regulates Cell Death and Immunity by Degrading Os-NPR1 in Rice [J]. The Plant Cell, 2017, 29(2): 345-359.
- [38] HONG Y B, ZHANG Y X, SINUMPORN S, et al. Premature Leaf Senescence 3, Encoding a Methyltransferase, Is Required for Melatonin Biosynthesis in Rice [J]. Plant Journal, 2018, 95(5): 877-891.
- [39] RUAN B P, HUA Z H, ZHAO J, et al. OsACL-A2 Negatively Regulates Cell Death and Disease Resistance in Rice [J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(7): 1344-1356.
- [40] KRIVORUCHKO A, ZHANG Y M, SIEWERS V, et al. Microbial Acetyl-CoA Metabolism and Metabolic Engineering [J]. Metabolic Engineering, 2015, 28: 28-42.
- [41] XING S F, VAN DEENEN N, MAGLIANO P, et al. ATP Citrate Lyase Activity is Post-Translationally Regulated by Sink Strength and Impacts the Wax, Cutin and Rubber Biosynthetic Pathways [J]. Plant Journal, 2014, 79(2): 270-284.
- [42] 段文静, ATP-柠檬酸裂解酶编码基因 OsACL-A2 正向调控铁参与抗病的机制研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2024.

责任编辑 夏娟

崔玉洁

