

水稻斑点叶变异研究进展

黄奇娜^{1,2, #} 杨 杨^{1,2, #} 施勇烽¹ 陈 洁¹ 吴建利^{1, *}

(¹中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室/国家水稻改良中心, 浙江 杭州 310006; ²杭州师范大学 生命与环境科学学院, 浙江 杭州 310036; # 共同第一作者; * 通讯联系人, E-mail: beishangd@163.com)

Recent Advances in Research on Spotted-Leaf Mutants of Rice (*Oryza sativa*)

HUANG Qi-na^{1,2, #}, YANG Yang^{1,2, #}, SHI Yong-feng¹, CHEN Jie¹, WU Jian-li^{1, *}

(¹State Key Laboratory of Rice Biology/Chinese National Center for Rice Improvement, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; ²College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; # These authors contributed equally to this paper; * Corresponding author, E-mail: beishangd@163.com)

HUANG Qina, YANG Yang, SHI Yongfeng, et al. Recent advances in research on spotted-leaf mutants of rice (*Oryza sativa*). *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(2): 108-115.

Abstract: Many rice spotted-leaf mutants are ideal sources for understanding the mechanisms involved in blast resistance, bacterial blight resistance and programmed cell death in plants. The genetic controls of 49 spotted-leaf mutants in rice have been characterized and a few couple of *spl/Spl* genes have been isolated as well. This article reviews on the origin, genetic modes, isolation and characterization of spotted-leaf genes responsible for their phenotypes, and their resistance responses to main rice diseases.

Key words: rice; spotted-leaf; mutagenesis; disease resistance; programmed cell death

黄奇娜, 杨 杨, 施勇烽, 等. 水稻斑点叶变异研究进展. 中国水稻科学, 2010, 24(2): 108-115.

摘 要: 大多数水稻斑点叶突变体是研究稻瘟病抗性、白叶枯病抗性以及植物程序性细胞死亡机理的理想材料。已经阐明了 49 份水稻斑点叶突变体的遗传模式, 并成功克隆分离了若干斑点叶基因。综述了这些突变体的来源、遗传模式、基因定位和克隆, 基因的功能以及它们对水稻主要病害的反应。

关键词: 水稻; 斑点叶; 诱变; 抗病性; 程序性细胞死亡

中图分类号: Q943.2; S511.03

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2010)02-0108-08

可遗传的变异是水稻进化的基础, 通过变异水稻发生一系列肉眼可见或不可见的变化。水稻斑点叶(spotted-leaf)属于肉眼可见的叶片形态变异, 发生变异的叶片上产生色泽、形状和大小不同的斑点, 在有些突变体中斑点还会出现在叶鞘、枝梗和谷壳上^[1]。

这种斑点的发生是在没有明显逆境、机械和农药损伤或者病原菌侵染的条件下, 由植物体自发形成的, 大多数情况下与无毒病原菌侵染时产生的病斑相似。由于斑点的颜色多为褐色, 类似于水稻胡麻斑病和稻瘟病, 许多学者又称之为类病变或类病斑(lesion mimic, lesion simulating disease)^[2-3]。鉴于有些突变体叶片上的斑点可能纯粹是颜色的变化(例如白色), 斑点处的细胞也并不一定死亡, 与病原菌引起的水稻病斑差异较大, 因而国际水稻遗传学协会(Rice Genetics Cooperative)推荐的名称斑点叶, 可涵盖所有的斑点类型, 可能更加确切。此外, 如同稻瘟病基因的命名一样, 许多早期的突变体与基因的名称仍然被保留使用, 例如褐斑叶(brown

leaf spot, 简称 *bl*)。即便如此, 斑点叶突变体和基因的命名还是比较混乱, 新鉴定的突变体和基因名称仍然各式各样, 没有统一起来, 不过, 在没有完成等位性研究的情况下, 正确地统一名称还存在一定难度。

1 水稻斑点叶变异的来源

斑点叶变异无非是由自然变异和人工诱变两种途径产生。1923 年 Emerson 报道了一个玉米斑点叶(blotched)突变体, 这可能是首例植物斑点叶突变体遗传研究的报道。1965 年日本学者 Sekiguchi 发现了第一个自然突变的水稻斑点叶突变体, 后来被称为 sekiguchi lesion(*sl*)突变体, 由 1 个隐性基

收稿日期: 2009-08-24; **修改稿收到日期:** 2009-10-23。

基金项目: 水稻生物学国家重点实验室自主课题(ZZKT200801); 浙江省自然科学基金资助项目(R307131, Y3080522)。

第一作者简介: 黄奇娜(1984—), 女, 硕士研究生; 杨杨(1985—), 女, 硕士研究生。

因控制^[4]。随着水稻基因组测序的完成和功能基因组学的发展,近年来,斑点叶突变体发掘、鉴定的报道大量增加,绝大多数突变体是通过物理、化学以及生物学方法诱变产生的^[5-6]。特别要提到的是,在转基因研究中,许多外源基因都能使转化体产生斑点症状^[7]。

截至 2009 年,国际上已有 10 余个国家的大学

和研究机构通过理化和生物诱变法获得近 20 万份水稻突变体,且以日本晴和中花 11 等粳稻品种为背景的突变体居多^[8]。大多数突变体可以免费提供,其中包含大量斑点叶突变体^[1]。迄今,国际水稻遗传学协会注册和记录的斑点叶突变体有 17 个(*sp11*~*sp111*,*bl1*~*bl6*),包括这 17 份突变体在内,遗传模式已经清楚的斑点叶突变体共有 49 个(表 1)。

表 1 水稻斑点叶突变体的遗传模式与功能特征

Table 1. Genetic models and characters of spotted-leaf mutants in rice.

突变体 Mutant	野生型 Wild type	诱变剂 ¹⁾ Mutagen ¹⁾	染色体 Chromosome location	遗传模式 ²⁾ Genetic mode ²⁾	斑点类型 ³⁾ Lesion type ³⁾	功能或抗性特征 ⁴⁾ Characterization ⁴⁾	参考文献 Reference
<i>sp11</i>	Asahi	Spontaneous	12	SR	扩散型 Propagation	稻瘟病抗性增强 ER to blast	[4, 9-10]
<i>sp12</i>	Katsumonbyo	Spontaneous	2	SR		稻瘟病抗性无变化 Unchanged R to blast	[10-11]
<i>sp13</i>	Norin 8	γ -ray	3	SR		稻瘟病抗性无变化或降低 Unchanged/reduced R to blast	[10-11]
<i>sp14</i>	Norin 8	γ -ray	6	SR		稻瘟病抗性无显著变化 Unchanged R to blast	[10-11]
<i>sp15</i>	Norin 8	γ -ray	7	SR		双抗增强 ER to blast and BB	[10-11]
<i>sp16</i>	Kinmaze	MNU	1	SR		稻瘟病抗性无变化或降低 Unchanged/reduced R to blast	[10-11]
<i>sp17</i>	Norin 8	γ -ray	5	SR		热激转录因子;抗性不变或降低 Heat stress transcription factor; Unchanged/reduced R to blast	[10, 12]
<i>sp18</i>	Kinmaze	MNU	5	SR		未知 Unknown	[10-11]
<i>sp19</i>	Norin 8	γ -ray	7	SR		稻瘟病抗性增强 ER to blast	[10-11]
<i>sp110</i>	IR24	MNU	10	SR		未知 Unknown	[10]
<i>sp111</i>	IR68	EMS	12	SR		U-box/Armadillo repeat protein, 双抗增强 ER to blast and BB	[11, 13-16]
<i>Sp112</i>	Hinohikari	MNU		SD		双抗增强 ER to blast and BB	[17]
<i>Sp113</i>	Hinohikari	MNU		SD		双抗增强 ER to blast and BB	[17]
<i>Sp114</i>	Taichung 65	MNU		SR		双抗增强 ER to blast and BB	[17]
<i>Sp115</i>	Koshihikari	MNU		SD		双抗增强 ER to blast and BB	[17]
<i>sp116</i>	IR64	DEB		SR	扩散型 Propagation	未知 Unknown	[1]
<i>sp117</i>	IR64	DEB		SR	扩散型 Propagation	双抗增强 ER to blast and BB	[1]
<i>Sp118</i>	Nipponbare	T-DNA		SD	起始型 Initiation	酰基转移酶, 双抗增强 acyltransferase, ER to blast and BB	[18]
<i>sp119</i>	IR64	DEB		SR	扩散型 Propagation	白叶枯病抗性增强 ER to BB	[1]
<i>sp120</i>	IR64	FN		SR	起始型 Initiation	稻瘟病抗性增强 ER to blast	[1]
<i>sp121</i>	IR64	DEB		SR		对 PXO99 的抗性增强 ER to PXO99	[1]
<i>sp122</i>	IR64	DEB		SR	起始型 Initiation	对 PXO86 和 PXO87 的抗性增强 ER to PXO86/87	[1]
<i>sp123</i>	IR64	DEB		SR		对 PXO86 和 PXO87 的抗性增强 ER to PXO86/87	[1]
<i>Sp124</i>	IR64	DEB		SD	起始型 Initiation	对 PXO86、PXO87 和 PXO99 的抗性均增强 ER to PXO86/87/99	[1]
<i>sp125</i>	IR64	DEB		SR		对 PXO86、PXO87 和 PXO99 的抗性均增强 ER to PXO86/87/99	[1]
<i>Sp126</i>	IR64	DEB		SD	纯合致死 HL	双抗增强 ER to blast and BB	[1]
<i>Sp127</i>	IR64	DEB		SD	纯合致死 HL	对 PXO86、PXO87 和 PXO99 的抗性均增强 ER to PXO86/87/99	[1]
<i>sp128</i>	Hwacheongbye	MNU	1	SR		编码 AP1M1, 双抗增强 Encodes AP1M1, ER to blast and BB	[19]
<i>bl1</i>	Norin 8	Spontaneous	2	SR		双抗增强 ER to blast and BB	[10]
<i>bl2</i>	Norin 8	Spontaneous	6	SR		双抗增强 ER to blast and BB	[10]
<i>bl3</i>	Norin 8	Spontaneous	6	SR		双抗增强 ER to blast and BB	[10]
<i>bl4</i>	Norin 8	³² P	3	SR		双抗增强 ER to blast and BB	[10]
<i>bl5</i>	Norin 8	³² P/X-ray		SR		双抗增强 ER to blast and BB	[10]
<i>bl6</i>	Norin 8	³² P		SR		双抗增强 ER to blast and BB	[10]
<i>cdr1</i>	Kinmaze	MNU		SR	起始型 Initiation	稻瘟病抗性增强 ER to blast	[20-21]
<i>cdr2</i>	Kinmaze	MNU		SR	起始型 Initiation	稻瘟病抗性增强 ER to blast	[20]
<i>Cdr3</i>	Kinmaze	MNU		SD	纯合致死 HL	稻瘟病抗性增强 ER to blast	[20]
<i>ebr3</i>	CO39	FN		SR		双抗增强 ER to blast and BB	[22]
<i>ncr1</i>	CO39	FN		SR		抗性无变化 Unchanged R	[22]
<i>MI009</i>	Norin 8	γ -ray		SR	起始型 Initiation	稻瘟病和胡麻斑病抗性增强 ER to blast and BS	[23]
<i>lrd32</i>	Zhonghua 11	γ -ray		DR		未知 Unknown	[24]
<i>lrd39</i>	Zhonghua 11	γ -ray		SR		未知 Unknown	[24]
<i>lrd40</i>	Zhonghua 11	γ -ray		SR		白叶枯病抗性增强 ER to BB	[24-25]
<i>lrd42</i>	Zhonghua 11	γ -ray		SR		未知 Unknown	[24]
<i>blm</i>	Hwacheong	MNU		SR	起始型 Initiation	广谱抗稻瘟病 Broad-spectrum R to blast	[26]
<i>lmi</i>	3037	γ -ray	8	SR	起始型 Initiation	未知 Unknown	[27]
<i>lmm1</i>	Katy	EMS		SR	扩散型 Propagation	稻瘟病和纹枯病抗性增强 ER to blast and SB	[28-29]
<i>Ostsd1</i>	Nipponbare	cDNA	8	SR		锌指蛋白, 抗稻瘟病 Zinc-finger protein, ER to blast	[30]
<i>tml</i>	Nipponbare	Tos17	5	SR		胞质质蛋白激酶, 双抗增强 Cytoplasmic protein kinase, ER to blast and BB	[31]

¹⁾ EMS—乙基甲磺酸; MNU—N-甲基亚硝基脲; DEB—双环氧丁烷; FN—快中子。²⁾ SR—单隐性; SD—单显性; DR—双隐性。³⁾ 许多突变体的斑点类型原作者并未具体定义。⁴⁾ 双抗增强,指稻瘟病和白叶枯病抗性增强;抗性增强,指至少对 1 个菌株或小种的抗性增强;PXO86、PXO87 和 PXO99 指菲律宾白叶枯病菌小种 PXO86、PXO87 和 PXO99。

¹⁾ EMS, Ethyl methanesulfonate; MNU, Methyl nitrosoourea; DEB, Diepoxybutane; FN, Fast neutron. ²⁾ SR, Single recessive; SD, Single dominant; DR, Double recessive. ³⁾ HL, Homozygous lethal; The lesion types of many mutants were not determined by the authors. ⁴⁾ R, Resistance; ER, Enhanced resistance; BB, Bacterial blight; SB, Sheath blight; BS, Brown spot; PXO86, PXO87 and PXO99 are races of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

2 水稻斑点叶突变体的一般表型特征

水稻斑点叶突变体的主要特征是叶片或叶鞘上出现不同颜色、大小和形状的斑点。斑点的颜色以褐色最常见,偶尔可见红褐色(如 *Spl26*)、暗褐色(如 *spl16*)、橙黄色(如 *spl1*)和白色(如 *spl20*)^[1]。斑点颜色的定义通过肉眼观察确定,因此,不同学者的描述有一定差异。斑点的形状有圆斑、椭圆斑、杆状斑和线形斑。斑点的大小差异很大,从针尖大小、2~10 mm 至更大的融合斑都有报道。但不论差异多大,上述斑点类型都是在无病原菌、无机械损伤、无农药损伤和无逆境条件下产生的。与水稻一样,斑点叶变异在其他植物中(拟南芥、玉米、大麦、烟草等)也广泛存在^[2, 32-34]。有些斑点具有相对稳定的分布位置和大小,故有学者把它称为起始型(initiation)斑点,例如 *blm* 和 *M1009*^[23, 26]。而另一些斑点在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,因此,有学者称之为扩散型(propagation)或反馈型(feedback)斑点,例如 *spl1* 和 *lmm1*^[4, 28-29]。之所以划分为起始型和扩散型两类,是因为认为植物中存在激发和抑制程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)两种途径^[34]。很多时候斑点叶突变体又被称为类病斑突变体(lesion mimic mutant),因为他们共同的特征是斑点部位的细胞坏死,这种坏死斑与植物过敏反应(hypersensitive response, HR)形成的病斑非常相似。

斑点发生的时间在不同的突变体表现不同。多数突变体的斑点出现在幼苗早期即播种后的2~3周(如 *spl1-4* 和 *spl9*)。本实验室通过 EMS 诱变 IR64 获得的一个水稻斑点叶突变体 *HM42* 的斑点出现得更早,发生在播种后1周的第1叶上,这种褐色斑点伴随植株整个生命周期的每一片叶(未发表数据)。而 *spl6* 和 *spl7* 的斑点出现在播种后3周左右,有些晚至孕穗期才出现斑点^[1]。

有些突变体的斑点受到温度和光照等环境因子的影响,例如,水稻突变体 *spl7* 的斑点在高温和太阳光下表达,而 *Osld1* 在低温和短日照条件下表达。这种现象在水稻和其他植物中还有许多报道^[2, 23-24, 27, 35-37]。说明有些斑点叶基因参与光温调节的代谢途径,可能与植物的光合作用以及耐逆境有关。

除了产生斑点以外,许多突变体还伴随其他农艺性状的改变,包括株高、育性、分蘖力和产量等。

水稻突变体 *sl*、*cdr1* 和 *spl5* 均为矮化植株^[4, 11, 20]; *spl3* 和 *spl4* 部分不育,产量下降^[11]; *spl9* 叶片变窄、卷曲以及结实率降低^[1]。我们观察到水稻斑点叶突变体 *HM42* 除表现矮秆以外,还伴随育性降低和分蘖力严重下降(未发表数据)。此外,有些斑点叶突变是致死的,突变体无法完成整个生命周期^[38];还有些突变体是纯合致死的,只能通过杂合体保存^[1]。可见斑点叶基因作用广泛,几乎涉及植物的生长、发育、衰老和死亡等所有生理生化过程。

3 水稻斑点叶突变体与过敏性反应

并非所有的斑点叶突变体都能形成坏死斑(necrotic lesion),但其中有一类突变体能在无任何外界因子的作用下产生类似病原菌侵染时的过敏性反应(HR),局部形成坏死斑,即所谓的类病斑突变体。与 HR 相似,类病斑处的细胞坏死,同属程序性细胞死亡,而程序性细胞死亡(PCD)在植物生长发育、衰老和保持健康中起重要作用,因此,类病斑突变体成为科学家对 PCD 机理研究和认知的理想材料之一。

植物与病原菌互作符合“基因对基因”理论,寄主中的主基因遭遇不亲和病原菌的无毒基因时,抗性得到表达,寄主产生 HR 病斑;当寄主遭遇亲和性病原菌时,抗性得不到表达,寄主表现为不同程度的感病甚至死亡。对于类病斑突变体而言,其抗性的表达与病原菌的亲合性有关。在毒性病原菌存在时,有些突变体的抗性水平得到增强,表现为病斑数目降低、病斑变小以及病叶面积减小,但总体属于感病范畴^[1];但有些突变体表现出对一种或几种病原菌的广谱抗病能力^[11, 17, 32];有些突变体抗性水平与野生型保持一致^[22, 39];还有些突变体的抗性反而较野生型降低,即为功能失去型突变^[40]。在无毒病原菌存在时,多数突变体表现与野生型一样正常的 HR,但有些突变体的 HR 增强,例如拟南芥的 *cpr5* 突变体和水稻的 *OsLSD1* 转基因植株^[30, 41];有些突变体感染很低浓度的病原菌时就可诱发 HR 或强化的 HR^[42-43];还有些突变体的 HR 受到部分或完全抑制^[44-45]。此外,有些突变体则对不同的无毒基因的反应各不相同^[46]。上述情况说明程序性细胞死亡可能存在多种信号传导途径。

许多抗性增强的突变体都伴随着防卫反应组分表达的变化或增强,包括胍胍质和酚类物质积累,病程相关的蛋白 PR1、PBZ1 和 PR5 等表达量增加,植保素 稻壳酮 A (momilactone A) 和 樱花素

(sakuranetin)的合成,植物激素水杨酸、乙烯和茉莉酸,以及一氧化氮和活性氧自由基等信号分子的产生。实际上,我们对PCD的认知,有些就来自对类病斑突变体的研究^[3]。在已经克隆的6个水稻类病斑基因中,都有类似HR的特征,但它们对病原菌的抗性差异很大,对环境因子的反应也不尽相同,说明水稻中存在多种激活HR的途径。

4 水稻斑点叶突变体的遗传模式

可稳定遗传的水稻斑点叶突变体均遵守孟德尔遗传规律。绝大多数突变体受单隐性基因控制,也有不少受单显性基因控制的情况,个别突变体受到2个隐性基因控制^[1, 24]。有的突变体是母体遗传的^[1],在本文不对此进行讨论。

在表1中列出的49个遗传模式明确的斑点叶突变体中,40个为单隐性基因控制,1个为双隐性基因控制,8个为单显性基因控制。最早发现的sekiguchi斑点突变体受到单隐性基因控制,1970年Kiyosawa发现该性状与第12染色体上的稻瘟病抗性基因*Pita*紧密连锁,因而确定该隐性基因位于第12染色体上,并以*sl*命名,现正式命名为*spl1*^[4, 10]。受到两个隐性基因控制的突变体为*lrd39*,但基因尚未定位^[24]。受到单显性基因控制的8个突变体分别为*Spl12*、*Spl13*、*Spl15*、*Spl18*、*Spl24*、*Spl26*、*Spl27*和*Cdr3*,除了*Spl18*位于第8染色体外,另外7个基因的位置也未确定(表1)。

目前,除了第4、第9和第11染色体未发现斑点叶基因外,其他染色体上均有1~2个基因。在所列的49个突变体中,未必存在49个不同的基因,因为它们的等位性没有一一测定,这方面的工作有待各方相互合作,加强研究。此外,水稻斑点叶变异的遗传模式并不复杂,主要受1~2个基因控制。

5 水稻斑点叶基因的克隆和功能分析

利用突变体构建基因定位群体,通过图位克隆法分离目的基因是目前水稻中采用最多的基因克隆方法。此外,通过T-DNA、转座子和反转座子插入诱变也是基因分离的常见方法。在已经克隆的6个水稻斑点叶基因中,*spl7*、*spl11*和*spl28*采用了图位法,*Spl18*采用了T-DNA插入法,*OsPtil*采用了*Tos17*插入法,*OsLSD1*采用了同源克隆法。下面对这6个基因进行简要介绍。

首先克隆分离的斑点叶基因是*spl7*^[12]。*spl7*突变体(KL210)是粳稻品种农林8号经过 γ -射线诱

导产生的,突变体表型受发育时期和环境因子的影响。幼苗期和新叶上不产生斑点,植株分蘖后开始出现斑点;在高温($>35^{\circ}\text{C}$)和紫外线的诱导下产生斑点,在低温(26°C)和日光灯下不产生斑点。遗传分析表明,该性状受单隐性基因控制,位于第5染色体上。2002年Yamanouchi等^[12]通过图位克隆法分离得到*spl7*基因及其野生型等位基因*Spl7*(来自染色体片段代换系SL18,该代换系包含籼稻品种Kasalath的第5染色体)。突变型与野生型仅有1个碱基的差异,这一差异造成第40位上一个氨基酸残基的改变(突变体为半胱氨酸/野生型为色氨酸)。序列分析发现*Spl7*基因编码一个热激转录因子蛋白(heat stress transcription factor protein),属于A4型植物热激蛋白,与玉米、番茄和拟南芥的热激转录因子序列高度同源。实际上,植物热激蛋白高度保守,且保守区主要位于DNA结合域(DNA binding domain, DBD)中,*spl7*发生碱基代换的位置也正好位于DBD中,在已知的植物热激蛋白中,这一位置上的氨基酸全是色氨酸。因此,推测突变体中的半胱氨酸改变了野生型基因的功能,导致斑点的发生。幼苗期野生型和突变体基因均表达,但不出现斑点,其后表达量增加,在高温下表达量显著增加且在突变型中的表达增加更明显^[12]。

在酵母和果蝇中,热激蛋白三级结构的中心包含一个疏水域,与特异DNA识别有关,这一结构就位于DBD中。因此,半胱氨酸取代色氨酸后可能使热激蛋白的疏水性被完全或部分破坏,导致蛋白三级结构的稳定性改变,无法行使正常功能^[12]。不过植物热激蛋白如何行使正常功能、包括调节转录、对逆境的反应以及阻止细胞死亡的机理均有待进一步研究。

第2个分离的基因是*spl11*^[16]。*spl11*突变体是籼稻品种IR68经乙基甲磺酸(ethyl methanesulfonate, EMS)诱变产生,斑点在最高分蘖期出现,主要沿中脉分布。该性状受单隐性基因控制^[14],位于第12染色体上^[13, 15]。2004年Zeng等^[16]利用图位法克隆了该基因,其大小为2085 bp,单拷贝,编码一个U-box/Armadillo重复蛋白,而且具有E3泛素连接酶活性,而泛素化途径在哺乳动物的PCD中起重要作用^[47]。由于*spl11*突变体的抗性具有广谱性^[11],因此,*Spl11*基因可能具有细胞死亡与防卫反应的负反馈调节因子的作用。野生型基因与突变体等位基因也仅有1个碱基差异,位于第1外显子内,野生型中为T,突变体中为C,这一改变使

得突变体产生1个终止密码,无法形成完整的转录产物,导致斑点叶性状的发生,所以 *spl11* 也是一个功能失去型突变体。

与 *spl7* 一样, *spl11* 基因控制斑点叶发生的机理并不清楚。在植物中,与泛素化有关的蛋白质降解参与多种代谢途径,例如激素的调控与光形态发生^[48]。*Spl11* 基因的分离说明,泛素化途径在植物中也与 PCD 有关,而且,突变体对稻瘟病和白叶枯病菌抗性的非特异性增强,显示抗性与主基因无关,而可能与下游的防卫反应信号的传导有关,暗示细胞死亡途径与稻瘟病和白叶枯病抗性防卫反应途径可能存在交叉。有意思的是 SPL11 与 SPIN1 蛋白互作,一起调控水稻的开花时间,表明 *Spl11* 是一个具多重功能的基因^[49]。

第3个分离的水稻斑点叶基因是 *OsLSD1*^[30]。该基因是利用序列测定以及同源性比较,从水稻 cDNA 文库中筛选得到的,它与拟南芥的 *LSD1* 和 *LOL1* 基因同源度较高(58%和 85%)。*OsLSD1* 为单拷贝,位于第8染色体上,编码含143个氨基酸残基的锌指蛋白。反义链 *OsLSD1* 转基因成株期植株叶片在特定条件下(较低温度和较短日照)产生不连续的褐色坏死斑^[30]。该基因为组成性表达,但在光诱导下表达水平提高。正义链和反义链转基因植株对毒性稻瘟病小种的抗性比野生型增强,而且植株内的防卫反应相关蛋白 PR-1 和 PBZ1 的 mRNA 水平显著提高。此外,反义链转基因植株对无毒稻瘟病小种的 HR 也明显加强。有意思的是, *OsLSD1* 似乎是一个多效性的基因,首先,过表达的 *OsLSD1* 能提高愈伤分化和植株再生频率;其次,过表达的 *OsLSD1* 能提高植株的叶绿素 b 含量,这可能使转化体的光合作用能力提高,从而促进生长、分化和再生;第三,过表达 *OsLSD1* 能提高烟草转基因植株对腐马毒素 B1 的耐性,由于腐马毒素 B1 可诱导程序性细胞死亡, *OsLSD1* 实际上起到阻止细胞死亡的作用^[30]。

OsLSD1 与拟南芥 *LOL1* 同源性更高,但它与拟南芥 *LSD1* 在功能上更接近^[50]。它们都属于锌指蛋白,表达受光诱导,都能提高对毒性菌株的抗性,PR-1 等防卫反应基因的表达水平提高,抗性增强发生在类 HR 病斑形成之前,以及对无毒菌株表现强化的 HR 症状。相反,拟南芥 *LOL1* 的过表达可加速细胞死亡,起正向调控作用^[51],而水稻 *OsLSD1* 能促进愈伤的分化和幼苗再生能力,能增强对稻瘟病抗性以及腐马毒素 B1 的耐性,对细胞

死亡起负向调控作用。高度同源而功能相反可能与两者的结构不同有关, *LOL1* 具有糖基化和磷酸化位点,但 *OsLSD1* 没有。单子叶和双子叶植物是否存在不同 PCD 调控方式,现在还是一个谜,而且, *OsLSD1* 如何诱发坏死斑的机理也有待深入研究。

第4个分离的斑点叶基因是 *OsAT1*^[18]。利用 T-DNA 插入诱变日本晴, Mori 等分离到一个显性斑点叶突变体 *Spl18*。序列分析表明,该基因编码一个大小为 485 个氨基酸残基的酰基转移酶,该酶在烟草中受过敏性反应的诱导而表达。在野生型水稻中,它是组成性表达的,但在叶片和根中 *OsAT1* 的转录水平很低,在较老的穗和叶鞘中的表达量较高,而在幼穗中的表达水平最高;在突变体中,叶片上斑点数目越多, *OsAT1* 的转录水平就越高,而且防卫反应基因 PR1 和 PBZ1 的转录水平也越高;此外,野生型中检测不到植保素,而斑点叶突变体中稻壳酮 A 和樱花素均能检出;抗性分析表明,突变体对稻瘟病和白叶枯病的抗性明显增强。

酰基转移酶家族在水稻中有 14 个基因,分布于 6 条染色体的 10 个基因座位上^[18]。*OsAT1* 位于第 10 染色体上,单拷贝。拟南芥的 *ssi2* 突变体是由甘油-3-磷酸酰基转移酶(ACT1)变异引起的,突变体产生类病斑,与水杨酸和茉莉酮酸介导的防卫反应有关^[52-53]。由于 ACT1 与油酸的降解有关,说明脂肪酸代谢也与植物的抗性相关。至于其他水稻酰基转移酶基因的变异或过表达是否也能产生斑点叶以及 *OsAT1* 造成斑点叶的机理目前均是个未知数。

第5个水稻斑点叶基因 *OsPtila* 也是在 2007 年克隆的^[31]。突变体 *ttml* 由 *Tos17* 插入日本晴基因组引起,植株严重矮化,叶片两面产生边界模糊的小褐色斑点。该性状是由 *Tos17* 插入 *OsPtila* 基因的第 3 外显子引起,以隐性的方式遗传。突变体在产生斑点后,对稻瘟病和白叶枯病菌的抗性均增强,同时,4 种防卫反应基因(*PR1b*、*PR5*、*PR10a* 和 *PAL*)的表达量增加,植株中的稻壳酮 A 含量也显著增高,过表达野生型基因 *OsPtila* 使转化体对稻瘟病和白叶枯病菌的抗性都明显下降,说明 *OsPtila* 负向调控防卫反应信号的传导以及抗性的表达。

OsPtila 基因编码一个有活性的蛋白激酶,预测编码 361 个氨基酸残基,与番茄的 *SIPtil* 基因高度同源(87%)。有趣的是,转 *OsPtila* 基因全长 cDNA 和 *SIPtil* 基因全长 cDNA 均能使 *ttml* 转化体的斑点消失,且 *PR1* 基因不表达,说明两者具有相同的功能。不同的是,前者的转化体对毒性稻瘟

病菌株的抗性也跟着消失,而后者的转基因烟草对无毒丁香假单胞杆菌的抗性增强,进一步说明 *OsPtila* 起负调控作用,而 *SIPtil* 起正调控作用。同时还表明,单子叶植物水稻和双子叶植物番茄中控制过敏性反应下游的基因存在差异^[31]。

过表达 *OsPtila* 基因对亲和性与非亲和性菌株抗性均降低,同时,如果用 RNA 干扰(RNAi)水稻 *RAR1* 基因的表达,突变体就不会产生斑点,*PR1b* 表达随之下降,株高也得到部分恢复。这些都说明该基因既调节主基因主导的抗性也调控基础抗性(basal resistance)。*OsPtil* 负向调控 *RAR1* 介导的防卫反应信号的传导,且对不同亲和性菌株的反应不同,说明它可能并不参与所有主基因介导的抗性反应^[31]。

最近克隆的斑点叶基因是 *spl28*^[19]。与野生型相比,利用 N-甲基亚硝基脲(MNU)诱变 Hwacheongbyeon 获得的 *spl28* 突变体不仅出现斑点叶,而且在开花后,植株的叶片开始迅速衰老,到开花后期枯萎,最后在成熟期死亡。该斑点叶性状受一个隐性基因控制,位于第 1 染色体上。它编码网格相关受体蛋白复合体中亚基 $\mu 1$ (AP1M1),亚细胞定位表明 SPL28::GFP 融合蛋白位于高尔基体上,可能与运输泡形成以及高尔基体和细胞膜间的物质运输有关,但有待于进一步验证。

该基因在野生型与突变体之间仅有 1 个碱基差异,这种变化使突变体形成一个终止密码子,目前不清楚敲除或使 AP1M1 失活导致斑点叶发生的原因。与大多数斑点叶变异一样,*spl28* 突变体出现胼胝质、过氧化物和酚类物质积累、防卫反应基因 *PR1* 和 *PR2* 得到表达、樱花素和稻壳酮 A 极显著增加等类 HR 现象。抗性鉴定也表明,突变体对多个白叶枯病和稻瘟病小种的抗性普遍增强。然而与大多数 *spl* 突变体不同的是,*spl28* 还表现早衰,叶绿素含量、可溶性蛋白质含量等比野生型明显降低,与衰老相关的基因 *SAG12* 高度表达。AP1M1 在原核与真核生物中高度保守,但到底与衰老有何关系却鲜有报道^[19]。

除了上述 6 个水稻斑点叶基因外,用 RNA 干扰水稻的 *SRT1* 基因也能引起过氧化氢的释放、DNA 降解以及类 HR-PCD 的发生,*OsSRT1* 编码组蛋白脱乙酰基酶,对染色质和基因组的稳定具有重要作用^[54]。此外,Takahashi 等^[21]还从 *cdrl* 突变体中分离到 PHB1 蛋白(prohibitin)。因为在酵母和哺乳动物中,编码该蛋白的基因参与程序性细

胞死亡,而水稻 PHB1 蛋白也位于线粒体上,说明 *OsPHB1* 有可能也参与植物线粒体介导的防卫反应和程序性细胞死亡,但这方面的研究在植物特别是水稻中鲜有报道。

6 结论与展望

HR 是研究得最多的一种程序性细胞死亡,绝大多数斑点叶突变体也都有类 HR 特征,部分细胞死亡的知识就是来源于对这类突变体的研究。但植物如何调控 HR,如何将细胞死亡限制于被病原菌侵染的部位,而不至于扩散到周围正常的细胞中,从而避免 PCD 失去控制,这仍然是个谜。

已经克隆的水稻斑点叶基因编码的产物包含热激蛋白、泛素连接酶、酰基转移酶、锌指蛋白、蛋白激酶和网格蛋白相关的受体蛋白复合体。它们不仅广泛参与多种生化代谢途径,也是水稻应对生物与非生物逆境,通过类似 HR 的形式来保护自己的方式。实际上,与斑点叶形成有关的分子远非这些,在其他植物中发现的细胞膜相关蛋白^[32]、离子通道蛋白^[46]、脂肪酸/脂质代谢相关因子^[55-56]、卟啉^[57-58]以及酚类化合物^[59]也都与斑点叶的发生有关。可见斑点叶突变体的遗传模式虽不复杂,但斑点形成的机制却相当复杂,不仅与植物防卫反应有关,还与叶绿素代谢、脂肪酸代谢、耐逆境胁迫以及解毒作用等途径有关。

确定相关的酶、蛋白和化合物在 PCD 中的因果关系,是阐明 PCD 的关键环节之一。目前已经发现一些化合物/蛋白参与 PCD 或 PCD 的信号传导。这些物质包括酚类、胼胝质、活性氧中间产物(包括过氧化氢和自由基)、PR 蛋白、植保素、水杨酸、茉莉酸、乙烯和一氧化氮等。有些物质发生在 HR 的下游,例如,HR 可诱导水杨酸的积累,进而诱发植物的系统获得性抗性^[33],相反,有些物质发生在 HR 的上游,例如活性氧中间产物可能直接诱导 HR 产生以及随后的防卫反应^[60]。有些分子,例如一氧化氮,具有多重功能,不仅与 PCD 有关^[61],还参与植物的生长和发育^[62]。因此,除了发掘更多突变体和克隆分离相应的基因外,鉴定这些分子的靶标物质还有许多路要走,但这也是揭开植物病斑发生和 PCD 机理的关键。

参考文献:

- [1] Wu C J, Bordeos A, Madamba M R S, et al. Rice lesion mimicking mutants with enhanced resistance to diseases. *Mol Genet*

- Gen, 2008, 279: 605-619.
- [2] Dietrich R A, Delaney T P, Uknes S J, et al. *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*, 1994, 77: 565-577.
- [3] Lorrain S, Vaillau F, Balague C, et al. Lesion mimic mutants: Keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 263-271.
- [4] Kiyosawa S. Inheritance of a particular sensitivity of the rice variety, Sekiguchi-Asahi, to pathogens and chemicals, and linkage relationship with blast resistance. *Bull Nat Inst Agric Sci (Jpn): Ser D Physiol Genet*, 1970, 21: 61-71.
- [5] Bhat R N, Upadhyaya M, Chaudhury A, et al. Chemical and irradiation induced mutants and TILLING//Upadhyaya N M. Rice Functional Genomics: Challenges, Progress and Prospects. New York: Springer, 2007: 149-180.
- [6] Wu J L, Lei C, Wu C, et al. Chemical- and irradiation-induced mutants of indica rice IR64. *Plant Mol Biol*, 2005, 59: 85-97.
- [7] Mittler R, Rizhsky L. Transgene-induced lesion mimic. *Plant Mol Biol*, 2000, 44: 335-344.
- [8] Krishnan A, Guiderdoni E, An G, et al. Mutant resources in rice for functional genomics. *Plant Physiol*, 2009, 149: 165-170
- [9] Ueno M, Shibata H, Kihara J, et al. Increased tryptophan decarboxylase and monoamine oxidase activities induce Sekiguchi lesion formation in rice infected with *Magnaporthe grisea*. *Plant J*, 2003, 36: 215-228.
- [10] Yoshimura A, Ideta O, Iwata N. Linkage map of phenotype and RFLP markers in rice. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 49-60.
- [11] 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 Interact*, 2000, 13: 869-876.
- [12] Yamanouchi U, Yano M, Lin H, et al. A rice spotted leaf gene, *Spl7*, encodes a heat stress transcription factor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(11): 7530-7535.
- [13] Sanchez A C, Khush G S. Chromosomal localization of five mutant genes in rice, *Oryza sativa*, using primary trisomics. *Plant Breeding*, 2000, 119: 84-86.
- [14] Singh K, Multani D S, Khush G S. A new spotted leaf mutant in rice. *Rice Genet Newsl*, 1995, 12: 192-193.
- [15] Zeng L R, Yin Z, Chen J, et al. Fine genetic mapping and physical delimitation of the lesion mimic gene *Spl11* to a 160-kb DNA segment of the rice genome. *Mol Genet Gen*, 2002, 268: 253-261
- [16] 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: 2795-2808.
- [17] Mizobuchi R, Hirabayashi H, Kaji R, et al. Differential expression of disease resistance in rice lesion-mimic mutants. *Plant Cell Rep*, 2002, 21: 390-396.
- [18] 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: 847-860.
- [19] Qiao Y L, Jiang W Z, 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*, 2009, 185(1): 258-274.
- [20] 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: 535-545.
- [21] Takahashi A, Kawasaki T, Wong H L, et al. Hyperphosphorylation of a mitochondrial protein, prohibitin, is induced by calyculin A in a rice lesion-mimic mutant *cdr1*. *Plant Physiol*, 2003, 132: 1861-1869.
- [22] Campbell M A, Ronald P C. Characterization of four rice mutants with alterations in the defense response pathway. *Mol Plant Pathol*, 2005, 6: 11-21.
- [23] Arase S, Zhao C M, Akimitsu K, et al. A recessive lesion mimic mutant of rice with elevated resistance to fungal pathogens. *J Gen Plant Pathol*, 2000, 66: 109-116.
- [24] 王建军, 朱旭东, 王友林, 等. 水稻类病斑突变体的生理与遗传分析. 植物生理与分子生物学报, 2004, 30: 331-338.
- [25] 王建军, 朱旭东, 王友林, 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: 111-116.
- [26] Jung Y H, Lee J H, Agrawal G K, et al. The rice (*Oryza sativa*) blast lesion mimic mutant, *blm*, may confer resistance to blast pathogens by triggering multiple defense-associated signaling pathways. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43: 397-406.
- [27] 刘道峰, 程祝宽, 刘国庆, 等. 水稻类病斑突变体 *lmi* 的鉴定及其基因定位. 科学通报, 2003, 48: 831-835.
- [28] 王忠华, 贾育林. 水稻类病斑突变体 *lmml* 的诱变与初步分析. 核农学报, 2006, 20: 255-258.
- [29] 王忠华, 林 卉, Valent B, 等. 水稻抗稻瘟病菌防卫反应的细胞学分析与防卫基因表达. 中国水稻科学, 2007, 21: 335-340.
- [30] Wang L, Pei Z, Tian Y, et al. OsLSD1, a rice zinc finger protein, regulates programmed cell death and callus differentiation. *Mol Plant Microbe Interact*, 2005, 18: 375-384.
- [31] Takahashi A, Agrawal G K, Yamazaki M, et al. Rice *Ptila* negatively regulates RAR1-dependent defense responses. *Plant Cell*, 2007, 19: 2940-2951.
- [32] Buschges R, Hollricher K, Panstruga R, et al. The barley *Mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, 1997, 88: 695-705.
- [33] Malamy J, Carr J P, Klessig D F, Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 1990, 250: 1002-1004.
- [34] Walbot V, Hoisington D A, Neuffer M G. Disease lesion mimics in maize//Kosuge T, Meredith C. Genetic Engineering of Plants. New York, Plenum, 1983: 431-442.

- [35] Fuse T, Iba K, Satoh H, et al. Characterization of a rice mutant having an increased susceptibility to light stress at high temperature. *Physiol Plant*, 1993, 9: 799-804.
- [36] Gray J, Janick-Buckner D, Buckner B, et al. Light-dependent death of maize *llsl* cells is mediated by mature chloroplasts. *Plant Physiol*, 2002, 30: 1894-1907.
- [37] Hoisington D A, Neuffer M G, Walbot V. Disease lesion mimics in maize: I. Effect of genetic background, temperature, developmental age, and wounding on necrotic spot formation with *Lesl*. *Dev Biol*, 1982, 93: 381-388.
- [38] 陈健, 赵增琳, 张世宏, 等. 一个水稻 T-DNA 插入类病斑突变体的初步研究. 吉林农业大学学报, 2008, 30(2): 133-137.
- [39] 郝中娜, 张红志, 陶荣祥. 水稻类病斑突变体的初步研究. 核农学报, 2007, 21: 328-332.
- [40] Greenberg J T, Silverman F P, Liang H. Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related response from disease resistance in the *Arabidopsis* mutant *acd5*. *Genetics*, 2000, 156: 341-350.
- [41] Bowling S A, Clarke J D, Liu Y, et al. The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell*, 1997, 9: 1573-1584.
- [42] Jambunathan N, Siani J M, McNellis T W. A humidity-sensitive *Arabidopsis* copine mutant exhibits precocious cell death and increased disease resistance. *Plant Cell*, 2001, 13: 2225-2240.
- [43] Mach J M, Castillo A R, Hongstraten R, et al. The *Arabidopsis* accelerated cell death gene *acd2* encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 265: 302-310.
- [44] Rate D N, Cuenca J V, Bowman G R, et al. The gain-of-function *Arabidopsis* *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell*, 1999, 11: 1695-1708.
- [45] Yu I C, Parker J, Bent F A. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis* *dnd1* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 7819-7824.
- [46] Balague C, Lin B, Alcon C, et al. HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell*, 2003, 15: 365-379.
- [47] Lee J C, Peter M E. Regulation of apoptosis by ubiquitination. *Immunol Rev*, 2003, 193: 39-47.
- [48] Sullivan J A, Shirasu K, Dong X W. The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nat Rev Genet*, 2003, 4: 885-898.
- [49] Vega-Sanchez M E, Zeng L, Chen S, et al. SPIN1, a K homology domain protein negatively regulated and ubiquitinated by the E3 ubiquitin ligase SPL11, is involved in flowering time control in rice. *Plant Cell*, 2008, 20: 1456-1469.
- [50] 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: 685-694.
- [51] Epple P, Mack A A, Morris V R F, et al. Antagonistic control of oxidative stress-induced cell death in *Arabidopsis* by two related plant-specific zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 6831-6836.
- [52] Kachroo A, Lapchyk L, Fukushige H, et al. Plastidial fatty acid signaling modulates salicylic acid- and jasmonic acid-mediated defense pathways in the *Arabidopsis* *ssi2* mutant. *Plant Cell*, 2003, 15: 2952-2965.
- [53] Kachroo A, Venugopal S C, Lapchyk L, et al. Oleic acid levels regulated by glycerolipid metabolism modulate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 5152-5157.
- [54] Huang L, Sun Q, Qin F, et al. Down-regulation of a SILENT INFORMATION REGULATOR2-related histone deacetylase gene, *OsSRT1*, induces DNA fragmentation and cell death in rice. *Plant Physiol*, 2007, 144: 1508-1519.
- [55] Brodersen P, Petersen M, Pike H M, et al. Knockout of *Arabidopsis* *accelerated-cell-death11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev*, 2002, 16: 490-502.
- [56] Kachroo P, Shanklin J, Shah J, et al. A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 9448-9453.
- [57] Hu G, Yamada K, Briggs S P, et al. A porphyrin pathway impairment is responsible for the phenotype of a dominant disease lesion mimic mutant of maize. *Plant Cell*, 1998, 10: 1095-1105.
- [58] Ishikawa A, Okamoto H, Iwasaki Y, et al. A deficiency of coproporphyrinogen: III. oxidase causes lesion formation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2001, 27: 89-99.
- [59] Gray J, Close P S, Briggs S P, et al. A novel suppressor of cell death in plants encoded by the *Llsl* gene of maize. *Cell*, 1997, 89: 25-31.
- [60] Jabs T, Dietrich R A, Dangl J L. Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science*, 1996, 273: 1853-1856.
- [61] Zhang C, Czymbek K J, Shapiro A D. Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the *Arabidopsis* hypersensitive response. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16: 962-972.
- [62] Delledonne M. NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 390-396.