论文

水稻类病变突变体*spl-3t*的精细定位与候选基因分析

饶玉春^{1,2†*}, 徐娜^{1†}, 胡娟¹, 焦然¹, 徐江民¹, 宋周琳¹, 黄玲¹, 路梅¹, 王跃星^{2*}, 胡江^{2*}

1. 浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004;

2. 中国水稻研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: ryc@zjnu.cn; wangyuexing@caas.cn; hujiang588@163.com

收稿日期: 2018-08-02; 接受日期: 2018-09-20; 网络版发表日期: 2018-10-10

国家转基因重大科技专项子课题(批准号: 2016ZX08009003-003-008)、国家自然科学基金(批准号: 31671666)、中国农业科学院科技创新工程(批准号: Y2016XT05)、浙江省科协育才工程资助项目(批准号: 2017YCGC008)和水稻生物学国家重点实验室开放项目(批准号: 160106)资助

摘要 水稻类病变突变体*spl-3t*是由粳稻品种云稻经化学诱变剂甲基磺酸乙酯(ethyl methyl sulfonate, EMS)诱变获得. 经过连续3代的种植, 表型明显, 性状稳定一致且未发现分离. 该突变体苗期无明显表型, 生长4~5周后, 叶片开始出现轻微锈褐色坏死斑点; 抽穗后病斑逐渐向四周扩散并最终形成中心枯黄、边缘红褐色的不规则斑块; 成熟期坏死斑连接成片并覆盖整张叶片. 突变体*spl-3t*与其野生型云稻品种相比, 叶片中的胼胝质含量明显积累. 还发现, *spl-3t*对白叶枯菌表现很敏感. 同时, *spl-3t*还具有株高、结实率下降、穗长增加等表型. 遗传分析表明, *spl-3t*的突变性状受单隐性核基因控制. 利用图位克隆的方法, 将*spl-3t*基因定位在水稻第3号染色体109 kb区间内, 该区间包含15个候选基因, 目前暂无类似表型的基因报道. 对所有候选基因编码区及启动子区域进行了测序, 未发现与野生型有差异的突变位点. 通过RNA-seq分析及qRT-PCR验证, 发现候选基因热激转录因子(*LOC_Os03g06630*)在*spl-3t*与其野生型有极显著差异, 该基因是热胁迫防御响应中的中心调节子, 在高温响应中发挥重要作用, 能够在热处理时出现上调具有保护作用的基因使植株获得较高的基础耐热性. 因此推测该基因的表现修饰造成了类病变性状的产生. 本研究为类病变形成的分子机制提供了新的素材和依据.

关键词 水稻, 类病变, 精细定位, 候选基因

植物类病变(lesion mimic)是一类植物在非生物胁迫和生物胁迫都不存在的条件下, 植物的叶片和叶鞘甚至茎秆以及种子上自发产生大小和形状不一的病斑. 类病变突变体在植物中普遍存在, 最早在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、玉米(*Zea mays*)、大麦(*Hor-*

deum vulgare L.)及水稻(*Oryza sativa*)等植物中发现了该类突变体^[1-4]. 过去的几十年中, 许多类病变突变体和相关候选基因被成功分离和克隆^[5-7]. 病斑是由过敏反应(hypersensitiveresponse, HR)导致的细胞凋亡而留下的, 而过敏反应是植物和病原体不亲和互相作用后

引用格式: 饶玉春, 徐娜, 胡娟, 等. 水稻类病变突变体*spl-3t*的精细定位与候选基因分析. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 1101-1114
Rao Y C, Xu N, Hu J, et al. Fine mapping and candidate gene analysis of a lesion mimic mutant *spl-3t* in rice (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 1101-1114, doi: 10.1360/N052018-00072

发生的一种细胞快速坏死的典型抗病反应, 是植物自发的一种抗病机制, 反应中涉及细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)^[8,9].

水稻是世界上重要的粮食作物之一, 同时也是重要的模式植物. 水稻类病变突变体的研究对于水稻的抗病机制、分子育种乃至水稻的产量和品质都有着深远的影响. 水稻类病变的发生机理极为复杂, 病变的发生和抗病基因突变或表达异常、细胞程序性死亡失控、蛋白酶功能丧失或信号分子的参与、温度和光照等环境因素以及植株抗病生理过程等密切相关^[10~14]. 此外, 不同植物中的病斑发生率是光依赖性的^[15], 表明光刺激是诱导病斑形成的重要原因. *spl18*基因编码的蛋白质OsAT1与烟草中过敏反应诱导的酰基转移酶序列相似, *OsAT1*在*spl18*中表达水平很高, 过度表达导致类病变的出现, 与此同时也增强对稻瘟病的抗性^[16]. Zeng等人^[17]鉴定并分离了一个对稻瘟病和白叶枯病具有广谱抗性的类病变突变体*spl11*, 其编码一个UG-box/Armadillo重复蛋白, 该蛋白具有E3泛素连接酶活性. 另外参与E3泛素连接酶复合物形成的*OsCUL3a*, 可以促进水稻细胞死亡正调节因子*OsNPR1*的降解^[18], 这说明泛素化系统在控制植物细胞死亡和防御中起着负调控的作用, 也进一步表明自发形成的类病斑与失控的细胞程序性死亡有着很大的关联. Jiang等人^[19]在试验中证明*OsSSI2*编码脂肪酸脱氢酶, 在水稻防御反应中同样起负调控的作用, 在脂肪酸脱氢酶功能缺失后会导致水稻叶片发生类病变并且延缓生长. 糖代谢过程中尿苷二磷酸乙酰葡萄糖胺焦磷酸化酶(UAP1)突变会导致水稻叶片出现类病斑^[20]. 活性氧(reactive oxygen species, ROS)在水稻类病变发生的过程中也起着很重要的作用^[21], H₂O₂以及O₂可能导致氧迸发, 进而导致水稻细胞程序性死亡, 产生类病变. *SPL5*编码剪接因子3b的亚基3(SF3b3), 它可能通过RNAs前体剪接作用控制细胞死亡及防御反应^[22]. 此外, *OsLSD1*基因的表达是光诱导或暗抑制, 同时*OsLSD1*在调节植物PCD方面起负调控的作用, 所以在光照下会促进*OsLSD1*产生病斑^[23].

目前的研究表明, 大多数水稻类病变突变体都一定程度地表现出抗性增强. 在已经被鉴定的突变体中, *spl1*, *spl9*, *spl10*, *cdr1*, *cdr3*等11个突变体表现出稻瘟病抗性增强^[24~26], *spl21*, *spl24*, *lmes1*, *hm197*, *llml*^[27~30]等12个突变体为白叶枯病抗性增强; *spl11*, *spl28*,

Lmr^[31,32]等19个突变体的稻瘟病抗性和白叶枯病抗性同时都增强; 其中突变体*spl2*, *spl3*, *spl4*, *spl6*, *ncrl*^[33~35]没有表现出抗性增强, 其抗性不变甚至降低. 水稻类病变突变体除了表现出一定的抗病性, 也会出现水稻防卫相关基因的组成性表达. 胍胍质(callose)在植物生长发育过程中起到重要的调节作用, 它的合成与分解可以帮助植株抵抗外来的生物或非生物胁迫^[36]. 有些突变体会致使胍胍质的积累, 这些会促使防御基因表达从而使水稻的抗病性增强. 如在突变体*spl33*中, 与野生型相比胍胍质明显积累, 植株抗病性增强^[37]. 抗病性的增强, 有时候突变对植株也会有一定危害. 李秀兰等人^[38]对水稻类病变突变体C23进行遗传分析发现, *spl29(t)*会导致抽穗期增长、株高降低、每穗粒数和有效分蘖数减少、千粒重以及结实率降低. 另外突变体*bl2*伴随着植株发育异常以及产量的降低^[39]. 水稻生长发育需要一定的适宜温度范围, 生殖生长期遇35℃以上的高温就会对水稻产生危害. 高温胁迫会明显降低植物的光合作用和代谢酶活性, 刺激植株体激活抗逆系统, 包括激素调节、防御基因启动、热激蛋白响应等, 以此抵抗外界不良环境^[40,41].

本研究利用化学诱变剂甲基磺酸乙酯(ethyl methyl sulfonate, EMS)诱变处理获得了一份水稻类病变突变体*spl-3t*, 从表型、生理和遗传等方面对其进行鉴定, 明确其遗传特性并进行基因定位, 采用实时荧光定量PCR分析抗病相关基因在野生型和突变体中的表达差异, 以期为进一步研究该基因对类病变形成的分子机制提供依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料和群体的构建

本研究利用EMS诱变粳稻品种云稻筛选到一份类病变突变体*spl-3t*, 经多代自交后突变体性状能稳定遗传. 将突变体*spl-3t*与常规籼稻TN1, 浙辐802进行杂交, 鉴定F₁代和F₂代的表型及分离比进行遗传分析. 同时在F₂分离群体中选择类病变表型的隐性单株提取DNA用于基因定位. 所有材料种植于浙江省金华市浙江师范大学实验田, 管理方式同常规大田.

1.2 农艺性状调查及光合参数测定

在肥力水平均匀一致的田块种植云稻及突变体

spl-3t, 在成熟期随机各取10株, 测量和统计其株高、穗长、千粒重、结实率等. 孕穗期, 在晴天上午9:30~11:00, 取长势相对一致的单株各10株. 利用LI-6400XT型便携式光合作用测定仪分别测定野生型和突变型的光合参数. 处理测定3~5片具有代表性的剑叶, 每叶重复测定3次(取其平均值作为一次重复). 测量时, 使用红、蓝光源, 光强恒定为1200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, 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.

1.3 叶片的电子显微镜观察

选取三叶期云稻和突变体*spl-3t*叶片中上部位的叶片, 用刀切成0.5~1 cm, 立即放入经预冷的2.5%戊二醛固定液中进行固定, 而后用缓冲液清洗3次, 再用锇酸溶液进行过夜处理. 经缓冲液清洗后对其进行乙醇梯度脱水, 并用乙酸异戊酯过渡, 用液化 CO_2 HCP-2临界点干燥, H5GB型真空喷镀仪镀碳膜, 在Hitachi TM-1000扫描电子显微镜(日本)上观察并记录.

材料前期固定后, 样品经过乙醇梯度脱水后, 用丙烯酸树脂进行渗透、包埋. 在超薄切片机上进行切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染, 最后用Hitachi H-7650型透射电子显微镜(日本)下观察并记录.

1.4 叶片胼胝质的测定

采用苯胺蓝荧光染色法观察胼胝质的沉积. 即将突变体*spl-3t*和野生型云稻叶片组织分别做徒手横切片, 将挑选出的厚薄均匀一致的切片在96%乙醇中浸泡过夜, 置于磷酸缓冲溶液(phosphate-buffered saline, PBS) (0.07 mol/L, pH 9)中30 min, 用0.005%苯胺蓝

(0.07 mol/L PBS buffer, pH 9)染色60 min, 20%甘油封片. 在Leica TCSSP5 AOBS激光共聚焦显微镜下用紫外光激发观察.

1.5 白叶枯病菌接种及抗病性的鉴定

从-80°C冰箱取出白叶枯病菌PX061, PX086, PX079, PX071, PX0112, PX099生理小种, 用10 μL 枪头在PDA培养基上划线, 放在28°C的培养箱暗培养3~5 d. 刮取菌液溶入适量无菌水(菌液浓度约为 $10^9/\text{mL}$)中, 振荡摇匀后备用. 在分蘖期, 用灭过菌的剪刀沾取菌液后剪去野生型和突变体剑叶叶片顶端1~3 cm, 从而使病原菌通过伤口直接进入水稻维管束组织. 接菌后15 d测量病斑的长度.

1.6 *spl-3t*的基因定位

利用本实验室保存的均匀分布于水稻12条染色体的SSR引物对突变体与云稻进行多态性筛选, 然后用21个*spl-3t*/TN1的 F_2 类病变单株进行连锁分析, 初步确认目的基因所在的染色体位置. 在定位区间内进一步开发了10对多态性较好的InDel标记(表1), 以*spl-3t*/TN1的 F_2 分离群体中678株表现出突变体表型的单株对目的基因进行精细定位. 基因组DNA采用十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB)法提取^[42]. 10 μL 的PCR体系包括: DNA模板1 μL , 10 $\times$ PCR缓冲液1 μL , 正反向引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各0.5 μL , dNTPs 1 μL , rTaq酶0.2 μL , 加dd H_2O 补足10 μL . PCR扩增程序如下: 94°C下预变性4 min; 94°C下变性30 s, 55°C~60°C下退火30 s (温度因引物不同而

表 1 精细定位和测序所用分子标记

引物名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	引物类型
P1	TCGTCCATCCATTGATGCTAATC	TGCCATTTATCATTTGCCATTC	Indel
P2	GATTTGGTTAACTCGGGCCT	CCTAATTATGGACTTGGGTGGAC	Indel
P3	TCCCCTCTCACCTCGATCA	CACCACCACCACCACCAC	Indel
P4	TTCCAGCATTCCTATCATCAACT	TTCGCTCTCTTATAACTGCGT	Indel
P5	CATCCAGTGAAACCCTGCAC	CCAGGGGACGGATCGATC	Indel
P6	ATATCTGTGGTTGATTCA	ACTATTCAGCATTCCTA	Indel
P7	CCATTCTCGCAATCGTCA	CCTCTGCCACCTTTAGCT	Indel
P8	GTGGTAGCTGATTTTGTT	ATGGAGCAGTTCTGGTAA	Indel
P9	TTTCAAGAAATCCAACCAA	GCCTGCACTACTCCTCCC	Indel
P10	TTGAGAGACGAGCGAGAGAG	AGTGTGGTGAGCATAGCAGTTG	Indel

异), 72℃下延伸30 s, 40个循环; 最后72℃下延伸10 min. PCR产物用4%琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后在凝胶成像仪拍照保存并读取数据.

1.7 候选基因的测序及表达分析

从水稻基因组注释数据库(rice genome annotation project)查阅位于定位区间内的所有可读框(open reading frame, 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. 采用高保真DNA聚合酶KOD-Plus-Ver.2扩增候选基因的基因组DNA片段, 将PCR产物直接测序.

接下来利用TRIzol总RNA提取试剂盒(Invitrogen, 美国)提取出现明显表型时野生型和突变体*spl-3t*叶片总RNA, DNase I 处理后的RNA样品再按照逆转录试剂盒ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Toyobo, 上海)的说明反转录成cDNA. 利用实时荧光定量PCR (qRT-PCR)方法, 分析各基因在野生型和突变体*spl-3t*中的表达量. 以基因*OsActin*作为内参基因, 每个反应做3个平行复孔, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行相对定量分析^[43], 重复做3次独立反应. 实时PCR仪器为7500实时PCR体系(ABI, 美国), 对所得到的实验数据通过Excel和SPSS19.0软件进行统计分析, 采用*t*检验比较不同数据间的差异. qRT-PCR反应体系(20 μL)是: cDNA模板2 μL, SYBRqPCR Mix (Toyobo) 10 μL, 正反引物(10 μmol/L)各0.8 μL, dd H₂O补足至20 μL. qRT-PCR扩增程序如下: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s; 55℃ 10 s; 72℃ 15 s, 40个循环. 所需引物见表2.

1.8 热胁迫高温处理

在*spl-3t*表型尚未明显出现之前, 利用RXZ型智能

人工气候箱, 将幼苗期的野生型与突变体分别移至含有水稻营养液的塑料桶中, 进行38℃~40℃ (Tmin/Tmax)高温处理24 h, 相对湿度保持在75%左右^[44,45], 每早晚更换营养液一次. 观察表型并拍照记录.

1.9 基因芯片检测及数据处理

在孕穗期, 分别剪取野生型和突变体*spl-3t*的幼穗, 用液氮速冻, RNA提取按照TRIzol总RNA提取试剂盒(Invitrogen)说明书进行. Illumina HiSeq文库构建根据制造商的说明(Illumina, 加拿大)进行. 通过磁珠富集带有polyA的mRNA, 采用离子打断的方式, 将RNA打断到200~300 bp片段. 以RNA为模板, 用6碱基随机引物和逆转录酶合成cDNA第一链, 并以第一链cDNA为模板进行第二链cDNA的合成, 第二链cDNA合成时, 其中的碱基T被替换成U, 从而达到链特异性文库的目的. 文库构建完成后, 采用PCR扩增进行文库片段富集, 之后根据片段大小进行文库选择, 文库大小在300~400 bp. 接着, 通过Agilent 2100 Bioanalyzer对文库进行质检, 再对文库总浓度及文库有效浓度进行检测. 然后根据文库的有效浓度以及文库所需数据量, 将含有不同Index序列(各样本加上不同的Index, 最后根据Index区分各样本的下机数据)的文库按比例进行混合. 混合文库统一稀释到2 nM, 通过碱变性, 形成单链文库. 随后采用第二代测序技术(next-generation sequencing, NGS), 基于Illumina HiSeq测序平台, 对这些文库进行双末端(Paired-End, PE)测序.

通过TopHat程序(<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/>)和BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对和分析测序结果. 利用HTSeq(<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/>)和DESeq(<http://www-huber.embl.de/users/anders/DESeq/>)程序检测差异表达基

表 2 实时荧光定量PCR的引物序列

引物名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>LOC_Os03g06570</i>	AGGATTCAGGCCACCTTCAG	CAGAGCTTGCAACTTCACGA
<i>LOC_Os03g06580</i>	AACTGTTCCATTGACCGTGC	GGTCTGTTGGGAGGGAGAAA
<i>LOC_Os03g06620</i>	GTGAAGAGGACCAGAGGCTT	CCAGTCATCAGCATTACGGC
<i>LOC_Os03g06630</i>	AAAATGAAGGGGCTCGAGGA	TGGCTGATTTGAGTCCTGT
<i>LOC_Os03g06654</i>	AGAGAGATGTTTGGGGCCTC	TTTGGGCCTCTTGAGACCAT
<i>LOC_Os03g06670</i>	TTCTCGAGTACCTAACCGCC	ACGCTTCACCTTGAGATCCT
<i>LOC_Os03g06680</i>	TGAAGAGGCTGTTCGAGAGG	GACTCATCTTCTCCCCGAC

因. 基因的功能运用KEGG分析工具(<http://www.genome.jp/kegg/>)进行分析. 本研究的测序和生物信息服务在上海派森诺生物科技有限公司完成.

2 结果与分析

2.1 *spl-3t*的表型分析

突变体*spl-3t*苗期无表型, 生长4~5周后, 叶片开始出现轻微锈褐色坏死斑点, 病斑首先出现在下部几张叶片, 刚抽出的新叶无病斑表型(图1A). 抽穗后, 病斑逐渐向四周扩散并最终形成中心枯黄边缘红褐色的不规则斑块(图1C). 随着植株的生长, 病斑由下部几张叶片向上部叶片蔓延, 病斑面积也随之扩大, 开花后几乎所有叶片都出现了红褐色病斑, 至成熟期*spl-3t*坏死斑连接成片并覆盖整张叶(图1B). 类病变突变体还伴随着其他农艺性状的改变. 与野生型相比, 突变体*spl-3t*株高显著下降10.7%, 结实率下降7.1%, 千粒重无明显差异, 穗长显著增加(表3).

待有表型后选取突变体植株上尚未出现坏死斑点的叶片, 中部用锡箔纸遮光处理, 5 d后该叶片未遮光处出现明显坏死斑点, 揭去锡箔纸观察遮光处坏死斑点的形成情况, 发现锡箔纸遮光处的叶片无坏死斑点, 遮光处与未遮光处形成鲜明对比(图1D). 结果表明, 突变体的细胞坏死是一类受光照诱导的细胞死亡.

水稻剑叶是光合产物输向穗部的主要供应者, 它的光合速率对产量有重要影响. 突变体*spl-3t*剑叶蒸腾

速率与细胞间CO₂浓度均低于野生型, 这可能是因为坏死斑减少了叶片的光合作用面积(表3).

2.2 *spl-3t*的电子显微镜观察

在透射电子显微镜下比较了云稻与*spl-3t*叶肉细胞的结构, 结果表明, 突变体的叶绿体比野生型的小, 数目也比野生型的少, 且形态不规则化(图2A和B). 突变体的叶绿体中充斥着大量大颗粒的淀粉粒, 而在野生型中看不到对应的淀粉粒, 且作为叶绿体脂类物质储存库的嗜锍颗粒数量明显减少(图2C和D), 说明这可能就是导致突变体光合速率降低的原因.

扫描电子显微镜显示, 突变体叶片的表面比野生型的光滑. 突变体的叶片表面叶毛稀少, 且野生型叶片表面存在大量的刺状突起, 而突变体中刺状突起的数目明显减少(图3A和B). 另外, 突变体叶片表面的硅质化突起明显少于野生型, 而气孔数目并无明显变化, 野生型气孔周围存在着硅质化突起, 在突变体气孔周围没有发现(图3C和D). 气孔周边的硅质化突起可能与气孔水分蒸腾后的硅化物沉积有关, 对水稻生长发育有一定的影响.

利用透射电子显微镜观察野生型及*spl-3t*突变体植株叶绿体超微结构(图2), 结果显示, 野生型叶绿体呈纺锤形, 基粒丰富且堆叠致密, 类囊体片层堆垛整齐, 叶绿体结构完整. 突变体*spl-3t*叶绿体类囊体降解, 基粒片层减少, 基粒堆叠排列松散, 叶绿体结构异常.

图1 突变体*spl-3t*及其野生型的表型特征

A: 野生型与突变体*spl-3t*的分蘖期表型, 标尺: 3 cm; B: 野生型与突变体*spl-3t*的成熟期表型, 标尺: 5 cm; C: 野生型与突变体*spl-3t*叶片表型, 标尺: 1 cm; D: 突变体*spl-3t*遮光前后对比, 标尺: 1 cm

表 3 水稻突变体*spl-3t*和野生型的主要农艺性状、光合参数及白叶枯病菌数据比较^{a)}

数据比较(the data comparison)		野生型	<i>spl-3t</i>
农艺性状(agronomic traits)	千粒重(thousand seed weight)	25.428±1.532	24.600±1.13
	株高(plant height)	82.666±2.516	73.666±1.5275**
	穗长(panicle length)	16.366±0.321	18.166±0.019*
	结实率(setting percentage)	73.975±12.051	68.786±8.131
光合参数(photosynthetic parameters)	净光合速率(Net photosynthetic rate(Pn))	9.36±0.346	9.923±0.977
	气孔导度(stomatal conductance, Gs)	0.113±0.013	0.093±0.023
	蒸腾速率(transpiration rate, Tr)	263.00±15.716	225.67±1.693
	细胞内CO ₂ 浓度(intracellular CO ₂ concentration (Ci))	3.833±0.208	3.767±0.404
白叶枯菌种(<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>)	PX061	0.148±0.099	3.936±0.773**
	PX086	0.645±0.603	5.863±1.440**
	PX079	0.209±0.108	2.463±0.868*
	PX071	0.230±0.177	3.201±1.173**
	PX0112	0.143±0.082	1.709±0.501*
	PX099	4.633±2.149	7.510±1.899*

a) *和**分别代表水稻突变体*spl-3t*与野生型间差异达显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)水平(t 检验)

图 2 突变体*spl-3t*及其野生型叶片的透射电子显微镜图

A, C: 野生型透射电子显微镜图; B, D: 突变体*spl-3t*透射电子显微镜图(N: 细胞核; C: 叶绿体; Thy: 类囊体; S: 淀粉颗粒; Og: 嗜饿小体)

图3 突变体*spl-3t*及其野生型叶片的扫描电子显微镜图

A, C: 野生型叶片扫描电子显微镜图, 标尺: 500 μm ; B, D: 突变体*spl-3t*叶片扫描电子显微镜图, 标尺: 500 μm

2.3 胼胝质的测定

苯胺蓝染色显微技术已广泛应用于检测植物组织中的胼胝质沉积^[46]。胼胝质的沉积与消解与植物的抗性有关, 在一定条件下, 逆境时会迅速合成并沉积以抵御外界刺激, 但若不能正常降解导致胼胝质的积累, 则会对植物本身产生负面影响^[47,48]。在分蘖期, 针对野生型云稻和突变体*spl-3t*接了6种致病性不同的白叶枯病菌(表3), 结果显示, 种白叶枯病菌突变体均表现为易感。对其叶片中胼胝质的含量进行测定, 发现相比于野生型, *spl-3t*叶片中胼胝质降解缓慢且积累明显增多(图4)。证明胼胝质的过量积累可能导致筛板的表面或筛孔内发生堵塞, 抗性减弱。

2.4 *spl-3t*的遗传分析

突变体*spl-3t*植株经过连续多代种植突变性状均表现稳定。将*spl-3t*突变体与TN₁, 浙辐802分别杂交, 其F₁植株未出现病斑, 为正常表型, 表明该性状受隐性基因控制。分别统计这两个F₂分离群体正常植株和有病斑植株数量, 经卡方(χ^2)测验, 符合3:1的分离比(表4)。遗传分析表明*spl-3t*类病变性状由单隐性核基因控制。

2.5 *spl-3t*的精细定位及候选基因分析

为了定位*spl-3t*基因, 首先从均匀分布在水稻12条染色体上的262对SSR引物中筛选出120对在突变体和TN1双亲间显示多态性的标记。随后从*spl-3t*/TN1的F₂分离群体中随机挑选21株突变体表型的单株, 利用挑选出来的120对引物进行*spl-3t*基因连锁分析。结果发现在第3号染色体的SSR标记P1处表现出连锁现象。在连锁标记上下游设计新的Indel标记, 用这21个单株将目的基因区间锁定在分子标记P1与P10之间。在此区间再次设计新的分子标记, 用678个F₂突变体表型单株最终将该基因定位在P4和P5之间大约109 kb的区间内(图5)。根据水稻基因组数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)数据信息, 其间包含15个可读框, 它们分别编码IQ钙调蛋白结合基序家族蛋白(*LOC_Os03g06570*)、MTN26L2-MtN26家族蛋白前体(*LOC_Os03g06580*)、1,2-二羟基-3-酮-5-甲基硫代戊烯双加氧酶蛋白(*LOC_Os03g06620*)、热激转录因子(*LOC_Os03g06630*)、YUCCA基因(*LOC_Os03g06654*)、核心组蛋白H2A/H2B/H3/H4结构域含蛋白(*LOC_Os03g06670*)、植物特异性结构域

图 4 突变体*spl-3t*及其野生型叶片胼胝质积累图

A, C: 野生型叶片胼胝质积累图, 标尺: 25 μm; B, D: 突变体*spl-3t*叶片胼胝质积累图, 标尺: 25 μm

图 5 目的基因的图位克隆

A: *spl-3t*基因初步定位结果; B: *spl-3t*基因的精细定位; C: *spl-3t*定位区间包含15个候选基因

表 4 突变体的遗传分析

杂交组合	F ₁ 表型	F ₂ 表型			χ^2 (3:1)
		正常表型	突变表型	总株数	
<i>spl-3t</i> /TN ₁	正常表型	1704	559	2263	0.107
<i>spl-3t</i> /ZF802	正常表型	526	173	699	0.03

TIGR01615家族蛋白(*LOC_Os03g06680*)和8个未知功能蛋白(*LOC_Os03g06520*, *LOC_Os03g06530*, *LOC_Os03g06540*, *LOC_Os03g06550*, *LOC_Os03g06560*, *LOC_Os03g06600*, *LOC_Os03g06610*, *LOC_Os03g06640*). 进一步对所有候选基因编码区及启动子区域进行了测序, 未发现与野生型有差异的突变位点.

2.6 热胁迫处理后表型观察与分析

在幼苗期的野生型及突变体未出现明显表型差异之前(图6A)对植株进行高温处理, 24 h后发现, 野生型和突变体*spl-3t*均出现叶片失水、卷曲枯黄的现象, 但野生型较突变体更为缓和, 大部分叶片仍保持平展及绿色(图6B和C). 相对于正常生长条件下的突变体, 处理后的*spl-3t*表型提早出现, 叶片出现更明显的类病斑性状(图6D). 同时, 将高温处理后的野生型和突变体植株, 对候选区间内的7个已知功能基因进行了qRT-PCR实验, 结果如图7所示. 其中编码热激转录因子(*LOC_Os03g06630*)处理前在*spl-3t*中表达量高于野生型, 高温处理后与对照相比其表达量显著下降. 该基因是

热胁迫防御响应中的中心调节子, 在高温响应中发挥重要作用, 能够在热处理时出现上调具有保护作用的基因使植株获得较高的基础耐热性. 且有报道指出, 热激转录因子与类病斑的产生有直接的相关性^[4,49~51]. 因此推测热激转录因子*LOC_Os03g06630*就是我们的候选基因, *spl-3t*的表型可能是由于该基因的甲基化或者乙酰化修饰导致, 具体结果尚需进一步的实验才能确定.

2.7 基因芯片数据分析

在分蘖期*spl-3t*出现明显病斑, 对光敏感明显的下降, 且株高较野生型显著降低并且每穗着粒数也明显降低(图1; 表3), 为了研究突变体产生病斑可能发生的途径, 在孕穗期通过Illumina HiSeq测序平台分析了野生型和*spl-3t*的幼穗中与类病变相关通路基因的表达情况. 通过两样品差异表达检测分析, 结果发现与野生型相比, *spl-3t*中检测到1662个差异表达基因, 其中677个基因上调表达($\log_2$ 比值 ≥ 1), 985个基因下调表达($\log_2$ 比值 ≤ -1). 根据KEGG分析, 这些差异基因参与了不同的代谢途径和信号通路, 包括了核糖体的生物

图6 突变体*spl-3t*及其野生型高温胁迫表型图

A: 高温处理前表型, 标尺: 5 cm; B: 高温处理后表型, 标尺: 5 cm; C: 高温处理后叶片表型对比, 标尺: 2 cm; D: 突变体*spl-3t*高温处理前后对比, 标尺: 2 cm

合成、苯丙素的生物合成、萜类化合物的代谢、氨基酸和核苷酸糖代谢等(图8A)。其中, 编码自然抗性相关的巨噬细胞蛋白基因*OsNRAMP1*, bHLH转录因子*OsIRO2*和低氮耐性基因*TOND1*等相关耐性保护基因, 在突变体*spl-3t*中与野生型相比, 表达量均显著性下降, 这也验证了*spl-3t*对白叶枯病易感及叶片发黄、生长受到抑制的表型。并且发现其他热激蛋白基因*OsHSP71.1*, *Oshsp18.0-CII*, *hsp82A*, *OsHSP24.1*表达

量也存在差异(图8B)。因此推测可能由于该热激转录因子基因的表现修饰下调了这些具有保护作用的基因, 植株抗性减弱并造成了类病变性状的产生。

3 讨论

植物类病变的发生与细胞程序化死亡、胼胝质、酚类化合物的积累以及过氧化物的合成有着密切的联

图7 突变体*spl-3t*及其野生型高温胁迫前后候选区间内基因表达情况分析

A: 高温处理前7个候选功能基因的表达图; B: 高温处理后7个候选功能基因的表达图(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, $n=3$)

图8 突变体*spl-3t*及其野生型相比差异表达基因的KEGG富集分析和挑选的差异表达基因的表达热图

A: 突变体*spl-3t*和野生型相比差异表达基因(DEG)的KEGG富集分析; B: 挑选的差异表达基因的表达热图

系^[52]. 类病变的发生往往伴随着植株的抗性增强和防卫相关基因的组成性表达. 因此, 利用突变体挖掘新的抗病相关基因以及培育新的抗病品种, 是水稻抗病研究中的一种重要方式, 具有重要意义. 根据表型可以将水稻类病变突变体分为起始型和扩散型; 根据遗传特点又可将突变体分为显性和隐性两种突变类型, 不同突变类型表现出来的表型特征也不尽相同^[53]. 本研究报道的*spl-3t*突变体斑点出现后能向四周扩散, 至成熟期坏死斑连接成片并覆盖整张叶片, 说明*spl-3t*属于扩散型突变体. 另外还发现突变体*spl-3t*的叶绿体中含有大量淀粉粒, 光合作用产生的蔗糖通常以蔗糖—Pi的形式运输至植株的各个部位, 并以淀粉粒的形式储藏于胞质淀粉体中用于维持植株的正常生长发育所需^[54]. *spl-3t*的叶绿体存在大量的淀粉粒可能与蔗糖—Pi的运输失衡有关. 气孔是叶片表面重要的特化结构, 通常气孔附卫细胞上存在硅质化突起^[55], 一般认为水稻表皮硅质化特性具有屏障保护作用, 并与叶片气孔细胞的开闭有关系, 从而影响水稻蒸腾作用的光合作用^[56]. 扫描电子显微镜显示, 突变体*spl-3t*叶

片表面的硅质化颗粒明显减少, 有文献报道, 叶片表面硅质化颗粒的减少不仅使植株变矮, 而且抗性明显下降, 并可能影响根系生长, 导致植株结实率下降^[57]. 研究表明, 抗性强的植物胼胝质形成的少且迟缓^[58], 突变体*spl-3t*叶片中胼胝质的含量较野生型云稻叶片中的胼胝质含量明显减少, 接菌实验结果表明, 突变体植株更易感, 这说明水稻的抗性与胼胝质含量有关.

目前在我们定位的区间内暂无类似表型的基因报道. 我们对15个候选基因编码区与启动子区域进行了测序, 未发现与野生型有差异的突变位点. 结合基因芯片与qRT-PCR的分析, 我们发现其中一个候选基因热应激转录因子(*LOC_Os03g06630*)在*spl-3t*与其野生型有极显著差异. 通过实验验证, 在高温胁迫下, 突变体*spl-3t*的类病变表型提前出现, 且该基因明显下调. 因此猜测*spl-3t*的表型可能是由于该基因的甲基化或者乙酰化修饰导致, 具体结果尚需进一步的实验才能确定. 利用表观遗传学效应也能有效改善水稻产量等重要农艺性状^[59], 有着很重要的应用前景, 本研究为其提供了新的素材.

参考文献

- 1 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
- 2 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: 25–31
- 3 Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, et al. The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, 1997, 88: 695–705
- 4 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: 7530–7535
- 5 Chen X, Fu S, Zhang P, et al. Proteomic analysis of a disease-resistance-enhanced lesion mimic mutant *spotted leaf 5* in rice. *Rice*, 2013, 6: 1
- 6 Wang F, Wu W, Wang D, et al. Characterization and genetic analysis of a novel light-dependent lesion mimic mutant, *lm3*, showing adult-plant resistance to powdery mildew in common wheat. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0155358
- 7 Chai T, Zhou J, Liu J, et al. *LSD1* and *HY5* antagonistically regulate red light induced-programmed cell death in Arabidopsis. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 292
- 8 Van Hautegeem T, Waters A J, Goodrich J, et al. Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends Plant Sci*, 2015, 20: 102–113
- 9 Zhou Q, Zhang Z, Liu T, et al. Identification and map-based cloning of the light-induced lesion mimic mutant 1 (*LILI*) gene in rice. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 2122
- 10 DomÍnguez F, Cejudo F J. Programmed cell death (PCD): an essential process of cereal seed development and germination. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 366
- 11 Petrov V, Hille J, Mueller-Roeber B, et al. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 69
- 12 Sun C, Liu L, Tang J, et al. *RLIN1*, encoding a putative coproporphyrinogen III oxidase, is involved in lesion initiation in rice. *J Genet Genom*, 2011, 38: 29–37
- 13 Vega-Sánchez M E, Verhertbruggen Y, Christensen U, et al. Loss of Cellulose synthase-like F6 function affects mixed-linkage glucan deposition,

- cell wall mechanical properties, and defense responses in vegetative tissues of rice. *Plant Physiol*, 2012, 159: 56–69
- 14 Harkenrider M, Sharma R, De Vleeschauwer D, et al. Overexpression of rice *Wall-Associated Kinase 25 (OsWAK25)* alters resistance to bacterial and fungal pathogens. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0147310
- 15 Mühlenbock P, Szechynska-Hebda M, Plaszczyca M, et al. Chloroplast signaling and *LESION SIMULATING DISEASE1* regulate crosstalk between light acclimation and immunity in arabidopsis. *Plant Cell*, 2008, 20: 2339–2356
- 16 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
- 17 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
- 18 Liu Q, Ning Y, Zhang Y, et al. *OsCUL3a* negatively regulates cell death and immunity by degrading *OsNPR1* in rice. *Plant Cell*, 2017, 29: 345–359
- 19 Jiang C J, Shimono M, Maeda S, et al. Suppression of the rice fatty-acid desaturase gene *OsSSI2* enhances resistance to blast and leaf blight diseases in rice. *Mol Plant Microbe Interact*, 2009, 22: 820–829
- 20 Wang Z, Wang Y, Hong X, et al. Functional inactivation of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1 (*UAPI*) induces early leaf senescence and defence responses in rice. *J Exp Bot*, 2015, 66: 973–987
- 21 Van Durme M, Nowack M K. Mechanisms of developmentally controlled cell death in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2016, 29: 29–37
- 22 Jin B, Zhou X, Jiang B, et al. Transcriptome profiling of the *spl5* mutant reveals that *SPL5* has a negative role in the biosynthesis of serotonin for rice disease resistance. *Rice*, 2015, 8: 18
- 23 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
- 24 Liu G, Wang L, Zhou Z, et al. Physical mapping of a rice lesion mimic gene, *Spl1*, to a 70-kb segment of rice chromosome 12. *Mol Genet Genom*, 2004, 272: 108–115
- 25 Mizobuchi R, Hirabayashi H, Kaji R, et al. Isolation and characterization of rice lesion-mimic mutants with enhanced resistance to rice blast and bacterial blight. *Plant Sci*, 2002, 163: 345–353
- 26 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
- 27 Wu C, Bordeos A, Madamba M R S, et al. Rice lesion mimic mutants with enhanced resistance to diseases. *Mol Genet Genom*, 2008, 279: 605–619
- 28 Li Z, Zhang Y, Liu L, et al. Fine mapping of the lesion mimic and early senescence 1 (*lmes1*) in rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiol Biochem*, 2014, 80: 300–307
- 29 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: 447–456
- 30 Wang J, Ye B, Yin J, et al. Characterization and fine mapping of a light-dependent leaf lesion mimic mutant 1 in rice. *Plant Physiol Biochem*, 2015, 97: 44–51
- 31 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: 258–274
- 32 Fekih R, Tamiru M, Kanzaki H, et al. The rice (*Oryza sativa* L.) *LESION MIMIC RESEMBLING*, which encodes an AAA-type ATPase, is implicated in defense response. *Mol Genet Genom*, 2015, 290: 611–622
- 33 Kojo K, Yaeno T, Kusumi K, et al. Regulatory mechanisms of ROI generation are affected by rice *spl* mutations. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47: 1035–1044
- 34 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 Exp Bot*, 2015, 66: 7045–7059
- 35 Kang S G, Matin M N, Bae H, et al. Proteome analysis and characterization of phenotypes of lesion mimic mutants spotted leaf 6 in rice. *Proteomics*, 2007, 7: 2447–2458
- 36 Campbell M A, Ronald P C. Characterization of four rice mutants with alterations in the defence response pathway. *Mol Plant Pathol*, 2005, 6: 11–21
- 37 Wang S, Lei C, Wang J, et al. *SPL33*, encoding an eEF1A-like protein, negatively regulates cell death and defense responses in rice. *J Exp Bot*,

2017, 68: 899–913

- 38 李秀兰, 王平荣, 曲志才, 等. 水稻类病突变体C23的遗传分析与基因的精细定位. 中国农业科学, 2010, 43: 3691–3697
- 39 Matin M N, Saief S A, Rahman M M, et al. Comparative phenotypic and physiological characteristics of spotted leaf 6 (*spl6*) and brown leaf spot2 (*bl2*) lesion mimic mutants (LMM) in rice. *Mol Cells*, 2010, 30: 533–543
- 40 刘媛媛. 高温胁迫对水稻生理生化特性的影响研究. 重庆: 西南大学, 2008
- 41 马义虎, 杨祥田. 高温胁迫对水稻的影响及其对策的研究进展. 中国农学通报, 2015, 31: 1–8
- 42 Wu K S, Tanksley S D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Molec Gen Genet*, 1993, 241-241: 225–235
- 43 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- 44 姜华武. 水稻胚乳淀粉合成相关基因克隆与高温影响稻米品质的分子生理学机制研究. 杭州: 浙江大学, 2003
- 45 高亮之. 水稻气象生态. 北京: 农业出版社, 1992
- 46 Tucker M R, Paech N A, Willemse M T M, et al. Dynamics of callose deposition and β -1,3-glucanase expression during reproductive events in sexual and apomictic Hieracium. *Planta*, 2001, 212: 487–498
- 47 Cheng B, Yu X, Ma Z, et al. *Phytophthora sojae* effector Avh331 suppresses the plant defence response by disturbing the MAPK signalling pathway. *Physiological Mol Plant Pathol*, 2012, 77: 1–9
- 48 Liu B, Li J F, Ao Y, et al. Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity. *Plant Cell*, 2012, 24: 3406–3419
- 49 Ma J, Chen S, Zhang J, et al. Identification and genetic mapping of a lesion mimic mutant in rice. *Rice Sci*, 2012, 19: 1–7
- 50 Huang X, Li Y, Zhang X, et al. The arabidopsis *LSD1* gene plays an important role in the regulation of low temperature-dependent cell death. *New Phytol*, 2010, 187: 301–312
- 51 王建军, 张礼霞, 王林友, 等. 水稻类病变(lesion resembling disease)突变体对光照和温度的诱导反应. 中国农业科学, 2010, 43: 2039–2044
- 52 Bruggeman Q, Raynaud C, Benhamed M, et al. To die or not to die? Lessons from lesion mimic mutants. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 24
- 53 Lorrain S, Vailleau F, Balagué C, et al. Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 263–271
- 54 Levine M. Photosynthesis and sucrose production. Topics in Dental Biochemistry. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. 17–27
- 55 Zhang C, Wang L, Zhang W, et al. Do lignification and silicification of the cell wall precede silicon deposition in the silica cell of the rice (*Oryza sativa* L.) leaf epidermis? *Plant Soil*, 2013, 372: 137–149
- 56 杨窑龙, 饶玉春, 刘慧娟, 等. 水稻早衰叶突变体*es-t*的遗传分析与精细定位. 科学通报, 2011, 19: 1539–1545
- 57 Fernández H M, Benvenuto M L, Borrelli N L, et al. Early silicification of leaves and roots of seedlings of a panicoid grass grown under different conditions: anatomical relations and structural role. *Plant Biol J*, 2016, 18: 1025–1030
- 58 Luna E, Pastor V, Robert J, et al. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol Plant Microbe Interact*, 2011, 24: 183–193
- 59 饶玉春, 杨窑龙, 马伯军, 等. 水稻表观遗传的研究进展. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2012, 35: 316–321

Fine mapping and candidate gene analysis of a lesion mimic mutant *spl-3t* in rice

Rao YuChun^{1,2}, Xu Na¹, Hu Juan¹, Jiao Ran¹, Xu JiangMing¹, Song ZhouLin¹, Huang Ling¹,
Lu Mei¹, Wang YueXing² & Hu Jiang²

¹ College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China;

² State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China

The lesion mimic mutant *spl-3t* was obtained by chemical mutagen EMS from Yun Rice. After three successive generations of planting, the phenotype was obvious, the characters were stable and consistent, and no isolation was found. The mutant had no obvious phenotype in seedlings, and grew slight rust brown necrotic lesions after 4–5 weeks. After the heading, the lesions gradually spread to the surrounding area and eventually formed irregular patches with the center withered and reddish brown. Necrotic plaques in mature stage are linked to sheaths and cover entire leaves. *Spl-3t* accumulated significantly callose content in the leaves compared with the wild type of Cloud Rice. It was also found that *spl-3t* was sensitive to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. At the same time, *spl-3t* also had reduced in plant height, seeded setting rate and increased in spike length. Genetic analysis showed that the *spl-3t* mutation was controlled by a single recessive nuclear gene. The *spl-3t* gene was located in the 109-kb region of chromosome 3 of rice by map-based cloning. There were 15 candidate genes in this region. No similar phenotype was reported at present. We sequenced the coding region and promoter region of all the candidate genes and found no mutation sites that were different from the wild type. By RNA-seq analysis and qRT-PCR verification, we found that the heat shock transcription factor (*LOC_Os03g06630*) of the candidate gene was significantly different from the wild type in *spl-3t*, which was a defense response to heat stress. The central regulator, which plays an important role in high temperature response, can up-regulate the protective gene during heat treatment to obtain higher basic heat tolerance. Therefore, it is speculated that the epigenetic modification of the gene results in the generation of lesion mimic traits. This study provides new evidence and basis for the molecular mechanism of lesion formation.

rice, lesion mimic, fine mapping, candidate genes

doi: [10.1360/N052018-00072](https://doi.org/10.1360/N052018-00072)