

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2015.00861

## 一份新的水稻斑点叶突变体 *spl32* 的鉴定和基因定位

钟振泉\*\* 罗文龙\*\* 刘永柱 王慧 陈志强\* 郭涛\*

华南农业大学 / 国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东广州 510642

**摘要:** 从 F<sub>2</sub> (粤晶丝苗 2 号/H4) 群体中, 鉴定出一份显性斑点叶突变体 *spl32* (*spotted leaf 32*)。其叶片褐色斑点受自然光诱导, 在幼穗分化期从叶尖逐渐扩散至叶鞘, 台盼蓝染色表明斑点并非由细胞死亡引起。以从 F<sub>5</sub> 杂合个体分离出的正常叶色植株为对照, 斑点叶植株的穗粒数、结实率显著降低。斑点出现后, *spl32* 的 POD 活性和 MDA 含量均显著高于对照; 同时, *spl32* 叶片光合色素含量降低, 但荧光动力学参数并无显著变化。抽穗期人工接菌表明, *spl32* 对水稻白叶枯病菌抗性较对照显著提高。遗传分析表明 *spl32* 斑点性状由一个显性基因 *Spl32(t)* 控制, 利用 F<sub>2</sub> (02428/*spl32*) 群体将其定位在第 11 染色体 Ind-c 和 RM206 之间, 推测该基因为一个新的水稻斑点叶基因。

**关键词:** 水稻; 斑点叶突变体; 白叶枯病抗性; 遗传分析; 基因定位

## Characterization of a Novel Spotted Leaf Mutant *spl32* and Mapping of *Spl32(t)* Gene in Rice (*Oryza sativa*)

ZHONG Zhen-Quan\*\*, LUO Wen-Long\*\*, LIU Yong-Zhu, WANG Hui, CHEN Zhi-Qiang\*, and GUO Tao\*

National Engineering Research Centre of Plant Space Breeding / South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** A dominant spotted-leaf mutant of rice was isolated from F<sub>2</sub> (Yuejingsimiao 2/H4) population. The mutant, designated as *spl32* (*spotted-leaf 32*), initiated brown spots on leaf apex at the panicle differentiation period, and then gradually spread them to whole leaf and sheath. Trypan blue staining indicated that the formation of spots was not caused by cell death. Taken normal green leaf plants segregated from heterozygous F<sub>5</sub> as control (CK), we found seeds per panicle and seed setting rate of spotted leaf plants were significantly lower than these of CK. After appearance of spots, the POD activity and MDA content of *spl32* were significantly higher than these of CK, while photosynthetic pigment content in *spl32* was reduced, without significant changes in chlorophyll fluorescence parameters. The resistance to rice bacterial blight in *spl32* was greatly improved by inoculation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* at heading period. The spotted-leaf trait of *spl32* was verified to be controlled by a dominant gene that temporarily designated as *Spl32(t)*. The novel rice spotted-leaf gene was mapped between markers Ind-c and RM206 on chromosome 11 with a F<sub>2</sub> (02428/*spl32*) population.

**Keywords:** Rice (*Oryza sativa* L.); Spotted-leaf mutants; Bacterial blight resistance; Genetic analysis; Mapping

植物斑点叶(spotted leaf)突变体是指植物在没有遭受病原物浸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<sup>[1-2]</sup>。突变体产生的斑点类似于病原菌侵染时产生的病斑, 因此又称为类病变突变体(lesion mimic mutants, *lmm*)或类病斑(lesion simulating disease)突变体<sup>[3]</sup>。除少部分突变体斑点的形成可能由色素积累外, 大部分是由植物本

身细胞死亡引起。这类斑点叶突变体的表型多与病原菌侵染后的过敏反应(hypersensitive response, HR)症状类似<sup>[4]</sup>, 而且许多斑点叶突变体对某些植物病原物表现出了一定的抗性<sup>[5-7]</sup>, 能激发病程相关蛋白的表达<sup>[2,8-9]</sup>, 可以提高植株的持久、广谱抗病性。

斑点叶突变体或类病变突变体广泛存在于各种植物, 包括水稻、玉米、大麦和小麦等<sup>[6]</sup>。到目前为

本研究由国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2012AA101201), 国家自然科学基金项目(31200250)和广东省科技计划项目(2011A020102004)资助。

\* 通讯作者(Corresponding authors): 郭涛, E-mail: guo.tao@vip.163.com; 陈志强, E-mail: chenlin@scau.edu.cn

第一作者联系方式: 钟振泉, E-mail: zhongzhq1990@163.com; 罗文龙, E-mail: lovenlong@163.com

\*\*同等贡献(Contributed equally to this work)

Received(收稿日期): 2014-11-06; Accepted(接受日期): 2015-03-19; Published online(网络出版日期): 2015-03-30.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20150330.1614.001.html>

止, 在水稻中至少已经发现了 50 多个斑点叶突变体<sup>[6]</sup>, 其中 *spl5*<sup>[10]</sup>、*spl7*<sup>[11]</sup>、*spl11*<sup>[12]</sup>、*spl18*<sup>[13]</sup>、*spl28*<sup>[7]</sup>、*OsLSD1*<sup>[14]</sup>、*NPRI*<sup>[15]</sup>、*OsPtila*<sup>[16]</sup>、*OsACDR1*<sup>[17]</sup>、*OsSSI2*<sup>[18]</sup>、*OsSL*<sup>[19]</sup>、*RLINI*<sup>[20]</sup>、*RLS1*<sup>[21]</sup>、*NLSI*<sup>[22]</sup>、*lms1*<sup>[23]</sup>、*lm*<sup>[24]</sup> 和 *CHLI*<sup>[25]</sup> 等斑点叶或类病变相关基因已经被克隆。这些基因的作用机制各不相同, 且突变体性状大多是由局部细胞死亡引起的。如第一个被克隆的水稻类病变突变基因 *spl7* 负向调控细胞死亡<sup>[11]</sup>; Zeng 等<sup>[12]</sup> 克隆到的 SPL11 蛋白可能在控制植物细胞死亡及防御反应的泛素系统中起作用; Mori 等<sup>[13]</sup> 克隆的 SPL18 编码一个酰基转移酶, 与防卫反应基因 *PR1* 和 *PBZ1* 的表达相关, 且显著提高对稻瘟病和白叶枯病的抗性; *OsLSD1* 编码一个锌指蛋白, 负向调控细胞死亡<sup>[14]</sup>; *spl5* 编码 1 个转录剪接因子 3b 亚基 3 (SF3b3), 与细胞坏死和抗性反应中的 RNA 成熟前体的剪接相关<sup>[10]</sup>。可见斑点产生过程非常复杂, 涉及许多生化代谢途径。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。

斑点叶突变体是植物育种中一类重要的抗病种质资源, 尤其是突变表型对产量、品质等重要农艺性状无明显影响时, 有可能在育种中得到直接应用。在大麦中发现的类病变突变体 *mlo*, 对几乎所有已知的白粉病 (*Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei*) 生理小种都具有持久抗性<sup>[26]</sup>。自 1979 年以来, 带有 *mlo* 基因的大麦品种一直保持高抗性, 在欧洲许多国家已经大面积种植<sup>[27]</sup>。已报道的水稻斑点叶突变体中, 大多数对病原菌抗性出现不同程度增强, 如 *spl10*、*spl11*、*spl17*、*spl28* 和 *spl26* 等对稻瘟病和白叶枯病表现出广谱抗性<sup>[7,12,28-29]</sup>。然而, 大部分突变体在类病变往往伴随细胞坏死、植株矮小、产量减少等不良的农艺性状, 如 *spl30*、*spl31* 等会导致结实率和千粒重降低<sup>[30-31]</sup>, *spl28*、*RLS1*、*lms1* 等会引起植株早衰<sup>[13,21,23]</sup>, 这限制了它们在水稻育种实践中的直接应用。因此, 不断挖掘和鉴定新的水稻斑点叶突变体, 对水稻抗病机制研究和抗病育种实践都有重要意义。

从 2 个正常绿叶品种粳稻粤晶丝苗 2 号和 H4 的 F<sub>2</sub> 群体中, 我们鉴定出了一份新的斑点叶突变体, 暂命名为 *spl32* (*spotted leaf 32*)。通过连续 2 年 4 代的观察, 在田间种植条件下, *spl32* 的突变表型能够稳定遗传。本研究从形态学、生理生化、遗传机制等方面对 *spl32* 开展研究, 以期对突变基因的克隆、

功能分析及应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

斑点叶突变体 *spl32* 的 2 个亲本中, 粤晶丝苗 2 号系广东省农业科学院水稻研究所选育的优质、高产、抗病水稻品种, H4 是本实验室从中二软占的空间诱变后代中获得的水稻高抗稻瘟病株系。

以从斑点叶突变体 F<sub>5</sub> 杂合个体分离出的正常叶色植株为对照, 用于农艺性状、酶活性及抗病性的对比; 以粳稻日本晴和 02428 分别与 *spl32* 杂交, 构建遗传分析和基因定位的 F<sub>2</sub> 群体。

### 1.2 表型鉴定

2013 年晚季和 2014 年早季, 将突变体 *spl32* 和对照种植于华南农业大学科研教学实验基地, 小区种植、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。

### 1.3 光照对斑点形成的影响

通过遮光试验<sup>[32]</sup>了解光照对斑点发生的影响。在大田条件下, 用宽度约为 1 cm 的锡箔纸对突变体 *spl32* 叶片已有斑点和无斑点部位进行遮光处理, 7 d 后观察斑点发生及变化情况。

### 1.4 突变体的组织化学分析

在突变体 *spl32* 出现斑点后, 取抽穗期突变体 *spl32* 植株上表现斑点的剑叶及其对照相同部位叶片进行台盼蓝染色<sup>[33]</sup>。将叶片浸泡在 70 的台盼蓝溶液中, 缓慢真空渗透 5 min, 浸泡 10 min, 然后加热沸腾 2 min, 室温放置 12 h 后于 2.5 g mL<sup>-1</sup> 的水合氯醛中脱色 3~4 d, 用体视镜观察细胞死亡情况并照相记录。

### 1.5 抗活性氧化酶活性测定

分别测定突变体 *spl32* 和对照在分蘖期、抽穗期、灌浆期和成熟期的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶 (peroxidase, POD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的含量。

SOD 活性采用 SOD (WST-1 法) 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<sup>[34]</sup> 测定, 以每分钟内 OD<sub>470nm</sub> 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<sup>[35]</sup>测定; MDA 含量采用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法<sup>[36]</sup>测定。

### 1.6 光合色素含量测定

采用 95%丙酮-乙醇法<sup>[37]</sup>分别测定突变体 *spl32* 及其对照抽穗期、扬花期和成熟期的叶片光合色素含量。将 0.2 g 待测样品剪碎, 浸泡于 25 mL 的 95% 的丙酮-乙醇=2:1 的水溶液中, 黑暗环境浸泡 48 h, 利用 PE 分光光度计测定浸提液的光吸收值, 3 次重复。按 Lichtenthaler 等<sup>[38]</sup>修正的 Arnon 法计算叶片叶绿素含量。

### 1.7 叶绿素荧光动力学参数测定

测定突变体 *spl32* 和对照在抽穗期、扬花期、灌浆期和成熟期的叶绿素荧光动力学参数。随机选取长势相对一致的单株各 7 株, 利用 MINI-PAM 型便携式光合作用测定仪在凌晨时分测定剑叶固定部位。荧光程序设置为暗处理 30 min, 光强为 6000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  饱和光处理 45 s。光系统 II (PSII) 最大量子产量  $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ ; PSII 的实际量子产量  $\Delta F/F_m' = (F_m' - F)/F_m'$ ; 光化学猝灭系数  $q_p = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$ ; 非光化学猝灭 NPQ =  $(F_m - F_m')/F_m'$ 。

### 1.8 突变体 *spl32* 对水稻白叶枯病的抗性鉴定

用水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo) 分别接种突变体 *spl32*、对照和  $F_2$  (*spl32*/日本晴) 及  $F_2$  (02428/*spl32*) 群体。在田间条件下, 选取播种 60 d 后的水稻单株, 每个单株选 3 张全展新叶, 剪叶接种。其中对照和突变体分别接种全展倒一叶、倒二叶和倒三叶, 3 组重复; 2 个  $F_2$  群体分别接种有斑点植株和正常绿叶植株各 50 株, 3 周后测量病斑长度, 并统计分析。

### 1.9 遗传分析及作图群体的构建

2013 年早季, 以 *spl32* 为母本、日本晴为父本, 以及以 02428 为母本、*spl32* 为父本, 各配制杂交组合获得相应  $F_1$  种子。2013 年晚季种植  $F_1$ , 2014 年早季种植  $F_2$ , 利用  $F_2$  分离群体进行斑点叶性状的遗传分析和基因初步定位。

### 1.10 基因定位

采用 Michelmore 等<sup>[39]</sup>提出的近等基因池分析法定位目标基因, 即根据  $F_2$  表型, 分别选取 15 株正常植株和 15 株突变植株, 剪取等量叶片, 构建正常基因池和突变基因池。按 CTAB 法<sup>[40]</sup>提取亲本、基因池和  $F_2$  群体 DNA。参照 <http://www.gramene.org/microsat/SSR> 引物序列, 根据粳稻日本晴和籼稻

93-11 的序列差异比设计 Indel 引物, 并由上海生物工程技术有限公司合成。PCR 扩增体系含 2×PCR Reaction Mix 10  $\mu\text{L}$  (含 100  $\text{mmol L}^{-1}$  KCl、20  $\text{mmol L}^{-1}$  Tris-HCl、3  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ 、400  $\text{mmol L}^{-1}$  dNTP)、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ 、引物 (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ 、模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ 、超纯水补至 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件为 94 5 min; 94 30 s, 55 30 s, 72 30 s, 35 个循环; 72 7 min。PCR 产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染显色后读胶。

### 1.11 图谱构建

$F_2$  定位群体中, 将具有 *spl32* 突变亲本带型的单株记为 A, 具有 02428 带型的单株记为 B, 具有杂合带型的单株记为 H。根据公式  $[(H+2A)/2n] \times 100$  计算遗传距离并构建连锁图谱, 其中 H 表示定位群体中出现杂合带型单株的数量, A 表示出现 *spl32* 突变带型的单株数, n 表示用于定位的隐性群体总株数。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变体的表型鉴定和真实性鉴定

田间生长情况下, 早季播种约 45 d 后 (幼穗分化期) 突变体 *spl32* 开始在叶尖出现褐色斑点, 此后斑点由叶边缘向叶片内部扩散, 呈连续状分布; 灌浆后在叶鞘也逐渐出现斑点 (图 1)。 *spl32* 的斑点从幼穗分化期开始持续到成熟, 属于全生育期扩散型斑点叶突变体。

田间观察发现, *spl32* 在成熟期没有明显的早衰现象。晚季农艺性状分析表明, 与对照相比, *spl32* 突变体在株高、单株穗重和千粒重等方面无明显差异; 但每穗粒数显著低于对照, 每穗实粒数和结实率极显著低于对照 (表 1)。

利用均匀分布于 12 条染色体上的 617 个 SSR 标记分析 *spl32* 及其双亲粤晶丝苗 2 号和 H4 的 DNA 多态性, 只有 2 个标记在 *spl32* 与双亲间存在多态性, 其余位点均与至少一个亲本的条带大小相同。证明斑点叶突变体 *spl32* 的确是来源于粤晶丝苗 2 号和 H4, 很可能是自然突变产生的新种质。

### 2.2 光照对斑点叶突变体 *spl32* 的影响

在自大田条件下, 分蘖盛期无斑点的新叶经遮光 7 d 后, 除遮光部位外, 其余部位正常产生褐色斑点; 去除锡箔纸 7 d 后, 遮光部位重新出现斑点。对于已经出现斑点的叶片部位, 经遮光处理后, 斑点没有消失 (图 2)。由此可知, *spl32* 突变体的斑点产生受自然光的诱导。

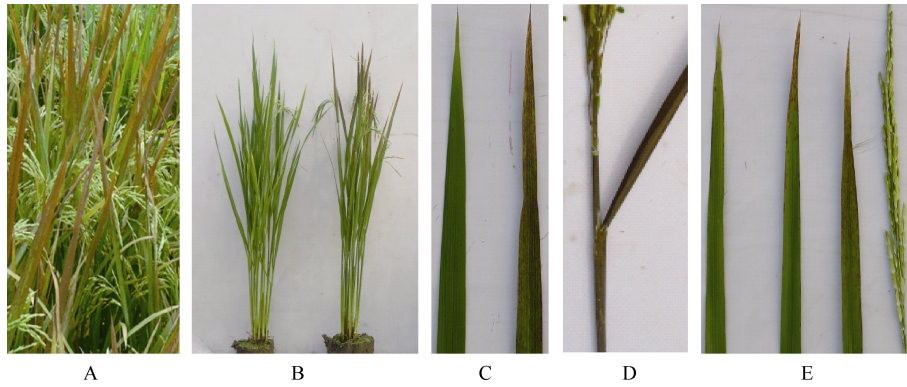


图 1 斑点叶突变体 *spl32* 的表型

Fig. 1 Phenotypes of *spl32*

A: 灌浆期 *spl32* 的田间表型; B: 对照(左)和 *spl32* (右)乳熟期的植株表型; C: 对照(左)和 *spl32* (右)灌浆期叶片; D: 成熟期 *spl32* 的叶鞘; E: 灌浆期 *spl32* 的叶片和穗部。

A: field phenotype of *spl32* during the filling stage; B: phenotypes of CK (left) and *spl32* (right) during the milky stage; C: leaves of CK (left) and *spl32* (right) during the filling stage; D: sheath of *spl32* during the mature stage; E: phenotypes of leaf and panicle during the filling stage in *spl32*.

表 1 对照(CK)和 *spl32* 的农艺性状分析  
Table 1 Agronomic traits of the control (CK) and *spl32*

材料 Material	株高 Plant height (cm)	单株穗重 Panicle weight per plant (g)	有效穗数 Number of panicles	每穗粒数 Grain number per panicle	每穗实粒数 Filled grain number per panicle	结实率 Seed setting rate (%)	千粒重 1000-grain weight (g)
CK	93.60±1.69	22.43±2.83	6.33±0.21	235.80±7.22	217.90±6.73	92.41±0.48	19.68±0.29
<i>spl32</i>	95.08±1.02	20.37±1.41	7.33±0.61	214.87±4.81*	183.20±5.54**	85.13±1.45**	19.24±0.15

\*在 0.05 水平上差异显著; \*\*在 0.01 水平上显著差异。

\* Significantly different at  $P < 0.05$ ; \*\* significantly different at  $P < 0.01$ .

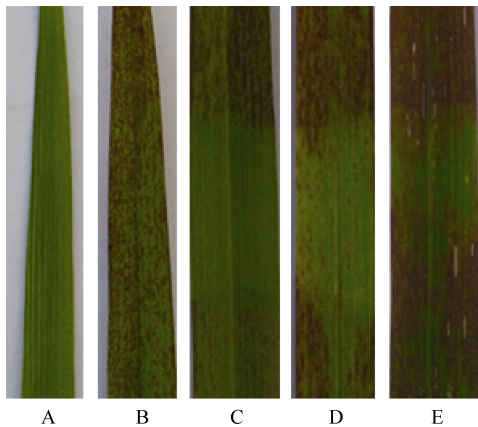


图 2 遮光对突变体 *spl32* 叶片的影响

Fig. 2 Effects of shading on *spl32* leaves

A: 对照; B: 成熟期 *spl32* 叶片; C: 未发生斑点部位遮光 7 d 后; D: 遮光部位恢复光照 7 d 后; E: 已有斑点部位遮光 7 d 后。

A: CK; B: *spl32* during the maturity stage; C: part of non-spotted leaf after shading for seven days; D: leaf shaded for seven days then under normal light for seven days; E: spotted leaf after shading for seven days.

### 2.3 突变体的组织化学分析

经台盼蓝染色后的对照叶片(图 3-B)和 *spl32* 叶片(图 3-D)斑点部位均未出现深蓝色, 表明突变体斑

点部位不存在细胞坏死。对照植株叶片和突变体 *spl32* 叶片上虽然没有深蓝色斑但有蓝色点分布, 这些点在整张叶片上分布比较均匀, 这可能是水稻植株在正常生长过程中的细胞更新。

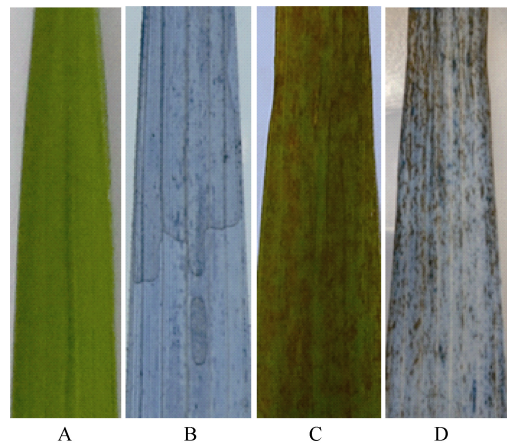


图 3 *spl32* 突变体的组织化学分析

Fig. 3 Histochemical analysis of *spl32*

A: 对照叶片; B: 对照叶片染色后; C: 突变体 *spl32* 斑点叶片; D: 突变体 *spl32* 叶片染色后。

A: control; B: control stained; C: spotted *spl32* leaf; D: stained *spl32* leaf.

## 2.4 抗活性氧化酶活性比较

突变体 *sp132* 和对照在 4 个时期的 SOD 和 CAT 活力均无显著差异(图 4-A 和 C); 而 POD 活力在抽穗期和成熟期均显著高于对照, 在灌浆期达到极显著水平(图 4-B), 由此推测突变体植株体内可能积累

了大量的  $H_2O_2$ 。此外, *sp132* 的 MDA 含量在分蘖期、灌浆期和成熟期与对照无显著差异, 但在抽穗期显著高于对照(图 4-D); 说明 *sp132* 在抽穗期积累了更多的  $H_2O_2$ , 导致膜系统受损程度高于对照。推测斑点叶突变体 *sp132* 比对照有更强的抗氧化能力。

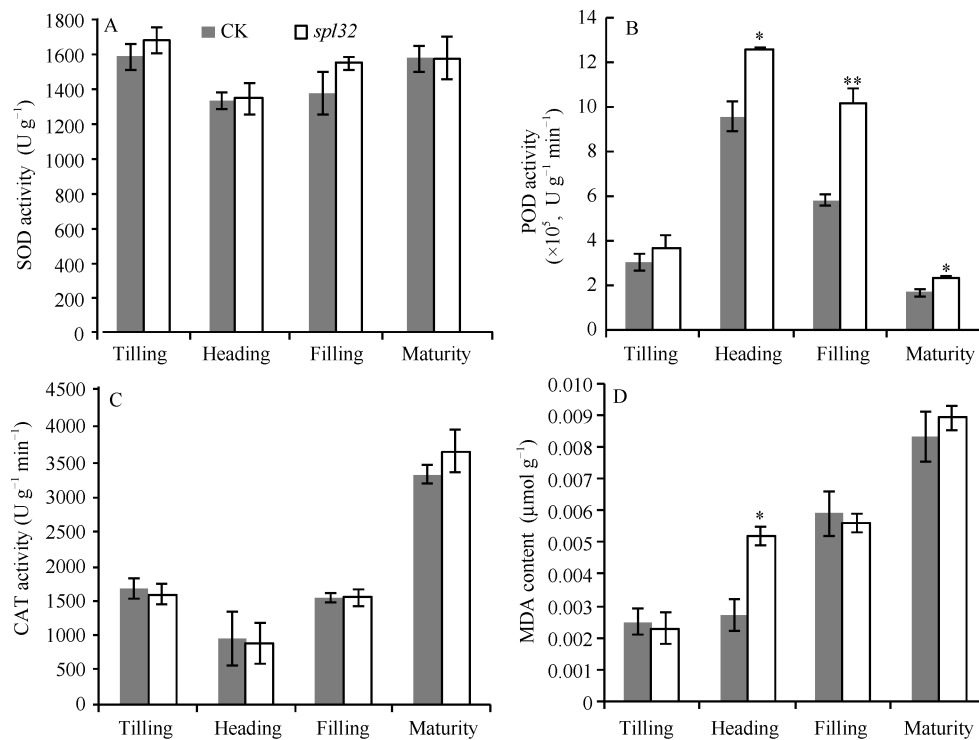


图 4 突变体 *sp132* 与对照(CK)各时期的生理学特性比较

Fig. 4 Physiological characteristics of the control (CK) and the *sp132* mutant during different growth stages

A: 超氧化物歧化酶(SOD)( $U g^{-1}$ ); B: 过氧化物酶(POD)( $U min^{-1} g^{-1}$ ); C: 过氧化氢酶(CAT)( $\mu mol g^{-1} min^{-1}$ ); D: 丙二醛(MDA) ( $\mu mol g^{-1}$ ); \*在 0.05 水平上差异显著; \*\*在 0.01 水平上差异显著。

A: superoxide dismutase (SOD) ( $U g^{-1}$ ); B: peroxidase (POD) ( $U min^{-1} g^{-1}$ ); C: catalase (CAT) ( $\mu mol g^{-1} min^{-1}$ ); D: malondialdehyde (MDA) ( $\mu mol g^{-1}$ ). \* Significantly different at  $P<0.05$ ; \*\* significantly different at  $P<0.01$ .

## 2.5 光合色素含量比较

在抽穗期(斑点快速扩散), 突变体和对照各色素指标差异不大; 在扬花期(斑点已大量形成), *sp132* 的叶绿素、类胡萝卜素、光合色素总量和 Chl *a*/Chl *b* 都极显著低于对照; 至成熟期, 突变体的叶绿素 *a* 和总叶绿素含量显著低于对照, Chl *a*/Chl *b* 极显著低于对照(图 5)。由此可知, *sp132* 斑点的出现可能导致突变体光合色素含量降低。

## 2.6 叶绿素荧光动力学参数分析

图 6 表明 *sp132* 和对照在 4 个时期的  $F_v/F_m$ 、 $\Delta F/F'$  差异都不显著, 说明 *sp132* 植株叶片的 PSII 反应中心的能量捕捉效率和实际光合效率与对照无差异, 光能转化正常。 *sp132* 和对照在抽穗期和灌浆期的  $q_p$  和 NPQ 均差异不显著, 说明其光合活

性和光保护能力并无显著差异。由此可知, 突变体 *sp132* 斑点症状的出现, 并不会显著影响植株的光合作用。这可能是突变体在成熟期没有出现早衰的原因之一。

## 2.7 突变体 *sp132* 对白叶枯病的抗性

如图 7-B, *sp132* 全展倒一叶、倒二叶和倒三叶的病斑长度均小于对照, 其中倒一叶和倒二叶达到极显著水平, 说明斑点症状的出现显著提高了植株对白叶枯病的抗性。抗性差异源于不同功能叶上斑点面积不同。接菌时斑点面积为倒一叶 > 倒二叶 > 倒三叶(图 7-A), 而感病程度为倒一叶 < 倒二叶 < 倒三叶, 说明植株抗病性与叶片斑点多少有关。

图 7 表明, 斑点叶个体对白叶枯病菌的抗性明显高于正常绿叶个体。其中,  $F_2(sp132/日本晴)$  中斑

点叶个体的病斑平均长度2.28 cm, 极显著低于正常绿叶的12.49 cm; 约85%的斑点叶植株的病斑小于3 cm, 而超过60%的正常绿叶植株的病斑长度大于10 cm (图7-C)。在  $F_2$  (02428/*spl32*)群体中也得出类似的结果, 斑点叶植株的病斑平均长度4.69 cm, 极

显著低于正常绿叶植株的14.63 cm (图7-D)。此外, 2个  $F_2$ 群体中斑点叶植株的病斑长度也有所不同, 这可能与两个群体的生育期差异所致。 $F_2$  (02428/*spl32*)群体的抽穗期要比  $F_2$  (*spl32*/日本晴)群体的迟, 在接种时  $F_2$  (02428/*spl32*)中斑点叶个体上的斑点面积也

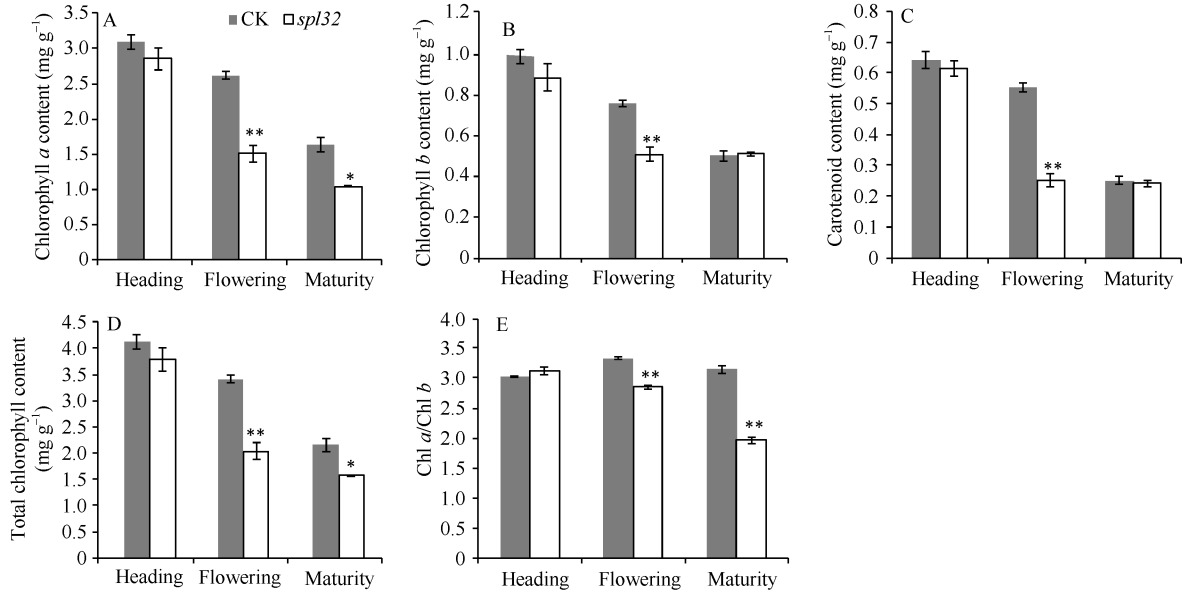


图5 突变体 *spl32* 和对照(CK)各时期叶片光合色素含量分析

Fig. 5 Pigment content in leaves of *spl32* and control (CK) during different growth stages

A: 叶绿素 a 含量( $\text{mg g}^{-1}$ ); B: 叶绿素 b 含量( $\text{mg g}^{-1}$ ); C: 类胡萝卜素含量( $\text{mg g}^{-1}$ ); D: 总叶绿素含量( $\text{mg g}^{-1}$ ); E: Chl a/Chl b; \*在 0.05 水平上差异显著; \*\*在 0.01 水平上差异显著。

A: chlorophyll a content ( $\text{mg g}^{-1}$ ); B: chlorophyll b content ( $\text{mg g}^{-1}$ ); C: carotenoid content ( $\text{mg g}^{-1}$ ); D: total chlorophyll content ( $\text{mg g}^{-1}$ ); E: Chl a/Chl b. \* Significantly different at  $P<0.05$ ; \*\* significantly different at  $P<0.01$ .

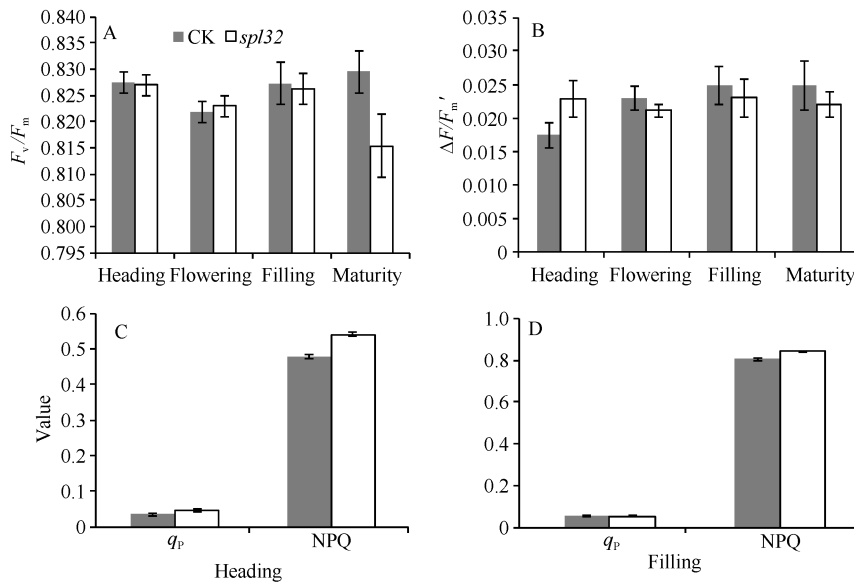


图6 突变体 *spl32* 与对照(CK)的叶绿素荧光动力学参数比较

Fig. 6 Chlorophyll fluorescence kinetic parameters of the *spl32* mutant and control (CK)

A: CK 和 *spl32* 在各时期叶片的  $F_v/F_m$  比较; B: CK 和 *spl32* 在各时期叶片的  $\Delta F/F_m'$  比较; C: 抽穗期 CK 和 *spl32* 的  $q_p$  和  $NPQ$  值比较; D: 灌浆期 CK 和 *spl32* 的  $q_p$  和  $NPQ$  值比较。

A:  $F_v/F_m$  of *spl32* and check during different growth stages; B:  $\Delta F/F_m'$  of *spl32* and check during different growth stages; C: the  $q_p$  and  $NPQ$  of *spl32* and check during heading stage; D: the  $q_p$  and  $NPQ$  of *spl32* and check during filling stage.

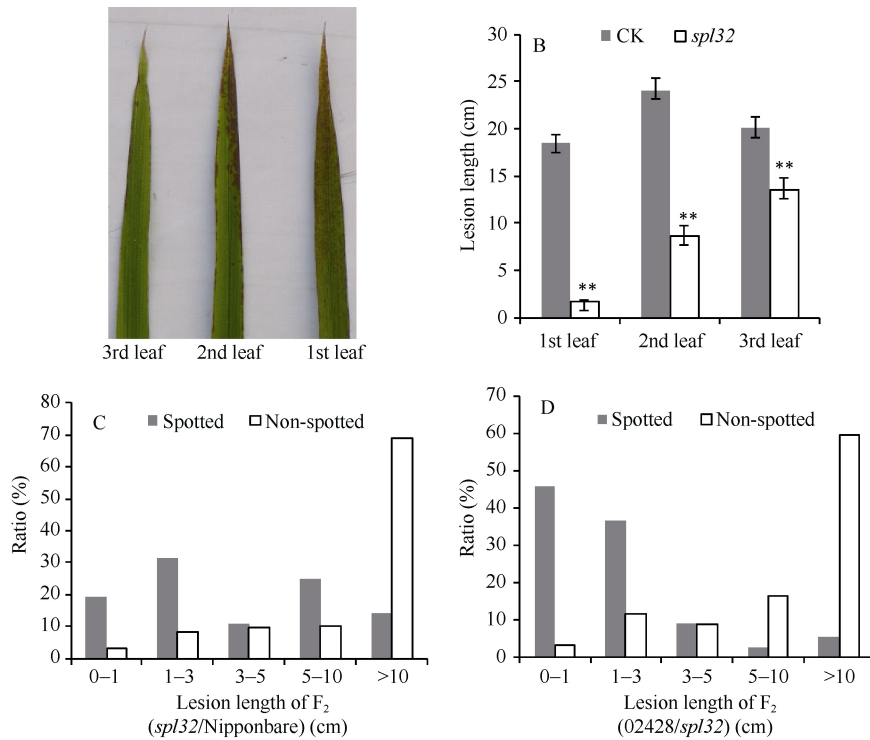


图 7 斑点叶性状与白叶枯病抗性的相关性分析

Fig. 7 Association analysis of the spotted-leaf trait and bacterial blight resistance

A: 接菌时 3 片功能叶的斑点情况; B: 3 片功能叶的病斑调查; C: F<sub>2</sub>(*spl32*/日本晴); D: F<sub>2</sub>(02428/*spl32*).

\*在 0.05 水平上差异显著; \*\*在 0.01 水平上差异显著。

A: spots on the three functional leaves when inoculated; B: lesion length of the three functional leaves in CK and *Spl32*(cm); C: F<sub>2</sub>(*spl32*/Nipponbare); D: F<sub>2</sub>(02428/*spl32*). \* Significantly different at P<0.05; \*\* Significantly different at P<0.01.

小于后者，因此其斑点叶个体对白叶枯病的抗性相对较低。由于粤晶丝苗 2 号、H4、日本晴和 02428 都对白叶枯病表现高感，病斑长度均大于 10 cm；推测突变体的白叶枯病抗性是由斑点变异引起的，即两者呈共分离。

### 2.8 *Spl32(t)*基因的遗传分析与分子定位

*spl32*分别与日本晴和02428配制的 F<sub>1</sub>均表现为斑点叶表型，说明突变表型由显性基因控制。分别统计 F<sub>2</sub>(02428/*spl32*)群体和 F<sub>2</sub>(*spl32*/日本晴)群体中的斑点叶和正常绿叶个体数，调查其分离比例(表2)表明，该斑点叶性状受1个显性核基因控制，暂命名为 *Spl32(t)*。

选用02428×*spl32*杂交的 F<sub>2</sub>群体为定位群体，共获得505个 F<sub>2</sub>隐性单株(即正常叶表型)。利用本实验

室均匀分布于12条染色体上的617对 SSR 标记对亲本 *spl32*和02428进行多态性分析，其中共185个标记表现出明显的多态性，多态率为30.08%。进一步利用在两亲本间表现出多态的引物，扩增正常基因池和突变基因池，发现第11染色体的标记 RM21和RM206与突变体表型有明显的连锁。在定位区间周围，进一步开发 Indel 分子标记13个，其中4个有多态性(表3)。利用 RM21、RM206以及4个 Indel 标记对505个正常绿叶的 F<sub>2</sub>单株进行分析，结果标记 RM21、Ind-c、RM206和 Ind-g 分别有51、37、35及48个交换株，RM21交换株包含 Ind-c 交换株，Ind-g 交换株包含 RM206交换株，且 RM21、Ind-c 交换株与 RM206、Ind-g 交换株互不重叠，因此将 *Spl32(t)* 基因初步定位在 Indel 标记 Ind-c 与 SSR 标记

表 2 斑点叶突变体 *spl32* 的遗传分析

Table 2 Genetic analysis of spotted leaf mutant *spl32*

组合 Cross	F <sub>1</sub> 表型 Phenotype of F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub> 表型 Phenotype of F <sub>2</sub>				$\chi^2(3:1)$	$\chi^2_{0.05}$
		斑点叶单株数 No. of spotted plants	无斑点单株数 No. of normal plants	总数 Total	比例 Ratio		
<i>spl32</i> /Nipponbare	斑点叶 Spotted plant	683	261	944	2.62 : 1.00	3.391	3.841
02428/ <i>spl32</i>	斑点叶 Spotted plant	1960	613	2573	3.20 : 1.00	1.835	

RM206之间,与2个标记间的遗传距离分别为3.4 cM和3.2 cM (图8)。该区间内没有已知可产生斑点叶表

型的基因,推测 *Spl32(t)* 是一个新的斑点叶基因。进一步的定位工作正在进行中。

表3 定位基因 *Spl32(t)* 所用的4个 Indel 引物序列  
Table 3 Four Indel primer sequences used for *Spl32(t)* mapping

标记 Marker	引物 Primer (5'-3')	扩增产物长度 Length of the amplified products (bp)	物理位置 Location (bp)	退火温度 Annealing temperature ( )
Ind-a	F: GATGGATGGAAGGTCCAATC R: CAACAGCGTACACACACAAG	<i>Japonica</i> , 197; <i>indica</i> , 211	19282003	60
Ind-b	F: GGCTATTGGCTAGGCGTTTTAG R: GTCCTTTACTCCTGAGCATGT	<i>Japonica</i> , 226; <i>indica</i> , 237	19576926	60
Ind-c	F: TTCCTACTTGCCTTTCATGTCA R: GATACGGGTCTATGTTCAA	<i>Japonica</i> , 185; <i>indica</i> , 198	19840743	60
Ind-g	F: ACCCCAGATTGTCCAGTCCT R: AACAGCGTGATGAAGGTGA	<i>Japonica</i> , 151; <i>indica</i> , 142	22645403	60

物理位置是以引物序列在日本晴基因组(IRGSP-1.0)进行 BLAST 获得。

Physical coordinates of primers were identified through BLAST searching in the Nipponbare rice genome (IRGSP-1.0).

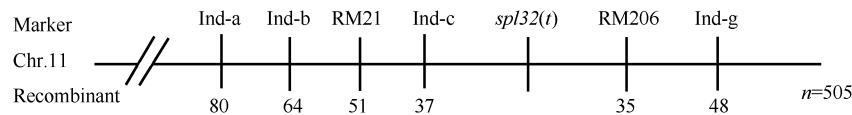


图8 突变体基因 *Spl32(t)* 的初步定位  
Fig. 8 Primary mapping of *Spl32(t)*

### 3 讨论

在植物中已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还伴随着其他农艺性状的改变。如突变体 *spl28* 和 *RLS1* 基因会引起植株早衰<sup>[7,21]</sup>。*HM47* 突变体株高、分蘖数、穗长、每穗粒数、结实率和千粒重都显著低于其野生型<sup>[41]</sup>。本研究的斑点叶突变体 *spl32* 从幼穗分化期开始出现褐色斑点,属扩散型斑点叶突变体。与对照相比,突变体 *spl32* 的每穗粒数显著降低,每穗实粒数和结实率极显著降低。梁颖等<sup>[42]</sup>研究表明,叶绿素含量是影响油菜生物产量的主导因素。本研究中突变体光合色素含量在斑点出现后极显著降低,说明斑点的出现影响了突变体色素合成,进而影响植株光合产物的积累,这可能是引起突变体每穗实粒数和结实率下降的主要原因。斑点出现后的叶绿素荧光动力学参数无明显变化,说明 *Spl32(t)* 基因突变对植株光合作用途径影响不大,这也可能是整体农艺性状下降幅度不显著的原因之一。

斑点叶形成的原因很复杂,它是由植物自身的生理原因和外界环境中的众多因素共同作用决定的<sup>[43]</sup>。大部分斑点或者类病斑的出现是由于植物本身细胞死亡引起的,如 Frye 等在番茄过量表达 *Pto* 基因导致了斑点叶的产生<sup>[44]</sup>;水稻斑点叶突变体 *spl5* 是因

为活性氧产生的途径被突变而加强,使得细胞内  $O_2^-$  大量积累,导致叶片上形成斑点性状<sup>[45]</sup>。部分突变体斑点的形成则推测是色素的积累。Huang 等<sup>[30]</sup>研究表明斑点叶突变体 *spl30* 的红棕色斑点为某种未知色素积累造成的。本研究鉴定的 *spl32* 经台盼蓝染色,未发现有细胞死亡的情况,说明突变体斑点的产生不是由于细胞死亡引起的,具体原因还有待进一步的研究。同时,本研究中的突变体 *spl32* 斑点表型的出现受自然光照的诱导,且其斑点形成信号不能系统传递。

许多斑点叶突变体出现也伴随抗逆性和抗病性的增强。虞锦玲等<sup>[46]</sup>研究一份经日本晴诱变的类病斑突变体发现,突变体植株的 SOD、POD、CAT 活性和 MDA 含量均明显高于野生型植株,说明类病斑的出现增强了突变体的抗逆性。一些水稻斑点叶突变体如 *spl10*、*spl11*、*spl17*、*spl28* 和 *spl26* 等对稻瘟病和白叶枯病表现出广谱抗性<sup>[7,12,28-29]</sup>。本研究发现突变体 *spl32* 的 SOD 和 POD 活力均高于对照,说明突变体较对照有更强的抗氧化能力,抗逆性更强。同时本研究中突变体 *spl32* 对白叶枯病抗性极显著增强,且白叶枯病抗性与斑点共分离。水稻中虽然发现了许多抗病基因,且其中一些基因如 *Xa21*、*xa5*、*Xa7*、*xa13*、*Pi-z<sup>1</sup>*、*Pi-k<sup>5</sup>*、*Pi-sh* 等<sup>[47-48]</sup>已经运



用到抗病育种中去, 但是这些基因存在小种专一化和抗性不持久等问题。突变体 *spl32* 斑点的出现不会引起植株的早衰, 不显著影响植株的光合作用, 且可以提高植株的白叶枯病抗性, 激活植株的整体抗性, 是水稻抗病育种潜在的种质资源, 对植物抗病机理及植物抗病育种等相关研究具有重要意义。

迄今, 通过分子标记定位的几十个水稻类病变基因分布于除第 9 染色体以外的其他 11 条染色体。其中在第 11 染色体上鉴定了 2 个斑点叶相关的基因。一个是叶鞘坏死基因 *nls1*, 被定位于第 11 染色体短臂, 已经被克隆, *nls1* 突变体在叶鞘出现自发坏死斑。*nls1* 编码一个典型的 CC-NB-LRR 类 R 蛋白, 其功能获得性突变导致了突变体特定组织细胞的自主性死亡<sup>[22]</sup>。另一个是类病斑及早衰基因 *lms1*<sup>[49]</sup>, 被定位于第 11 染色体长臂末端, 其突变体植株在叶片和茎部出现黄褐色小斑点, 抽穗期后呈现穗、茎、叶明显干枯, 并快速衰亡。其性状受单隐性核基因控制。本研究的突变体其斑点性状首先出现在叶片上, 受单显性核基因 *Spl32(t)* 控制, 初步定位于第 11 染色体长臂标记 Ind-c 和 RM206 之间, 该区间内没有已知可造成类似表型的基因, 因此 *Spl32(t)* 是一个新的斑点叶基因。

突变体 *spl32* 的褐色斑点可能是由于未知色素积累而形成, 对此类非细胞死亡引起的斑点叶突变体的相关研究还很少。本研究从形态学、生理生化、分子遗传学等方面对 *spl32* 开展研究, 为 *Spl32(t)* 的克隆和功能验证奠定了基础, 对研究植物斑点叶的发生机制具有重要意义, 也为水稻抗病种质资源的创制提供了新的思路。

#### 4 结论

水稻斑点叶突变体 *spl32* 在幼穗分化期开始在叶尖出现褐色斑点, 此后斑点由叶边缘向叶片内部扩散, 直至遍布整个叶片; 其斑点的出现受自然光诱导, 但并非由细胞死亡引起。斑点的出现会降低其光合色素含量, 但对荧光动力学参数并无明显影响, 不影响植株的 PSII。与对照相比, 穗粒数和结实率等部分农艺性状显著下降, 抗氧化能力增强; 对白叶枯病的抗性增强, 且白叶枯病抗性与斑点共分离。该性状受 1 个显性基因 *Spl32(t)* 控制, 位于第 11 染色体 Ind-c 和 RM206 之间。本研究结果为 *Spl32(t)* 基因的进一步克隆和功能分析奠定了基础。

#### References

- [1] Hu G, Richter T E, Hulbert S H, Pryor T. Disease lesion mimicry caused by mutations in the rust resistance gene *rp1*. *Plant Cell*, 1996, 8: 1367-1376
- [2] Huang Q N, Yang Y, Shi Y F, Chen J, Wu J L. Recent advances in research on spotted leaf mutants of rice (*Oryza sativa*). *Rice Sci*, 2010, 24: 108-115
- [3] Dietrich R A, Delaney T P, Uknes S J, Ward E R, Ryals J A, Dangl J L. Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. *Cell*, 1994, 77: 565-577
- [4] 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: 1793-1807
- [5] 王建军, 朱旭东, 王林友, 张利华, 薛庆中, 何祖华. 水稻类病变突变体 *lrd40* 的抗病性与细胞学分析. *中国水稻科学*, 2005, 19: 111-116  
Wang J J, Zhu X D, Wang L Y, Zhang L H, Xue Q Z, He Z H. 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)
- [6] 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: 1-9  
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)
- [7] Qiao Y L, Jiang W Z, Lee J H, Park B S, Choi M S, Piao R H, Woo M O, Roh J H, Han L Z, Paek N C, Seo H S, Koh H J. *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
- [8] Wu C J, Bordeos A, Madamba M R S, Baraoidan M, Ramos M, Wang G L, Leach J E, Leung H. Rice lesion mimic mutants with enhanced resistance to diseases. *Mol Genet Genomics*, 2008, 279: 605-619
- [9] Zhong C Y, Jun C, Li R Z, Mei L G, Hei L, Gurdev S K, Wang G L. 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
- [10] Chen X F, Hao L, Pan J W, Zheng X X, Jiang G H, Jin Y, Gu Z M, Qian Q, Zhai W X, Ma B J. *SPL5*, a cell death and defense-related gene, encodes a putative splicing factor 3b subunit 3 (SF3b3) in rice. *Mol Breed*, 2012, 30: 939-949
- [11] Yamanouchi U, Yano M, Lin H X, Ashikari M, Yamada K. A rice spotted leaf gene, *Spl7*, encodes a heat stress transcription factor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 7530-7535
- [12] Zeng L R. Spotted leaf 11, 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
- [13] Mori M, Tomita C, Sugimoto K, Hasegawa, Hayashi N, Dubouzet J, Ochiai H, Sekimoto H, Hirochika H, Kikuchi S. Isolation and molecular characterization of a Spotted leaf 18 mutant by modified activation-tagging in rice. *Plant Mol Biol*, 2007, 63: 847-860

- [14] Wang L, Pei Z, Tian Y, He C. OsLSD1, a rice zinc finger protein, regulates programmed cell death and callus differentiation. *Mol Plant Microbe Interact*, 2005, 18: 375–384
- [15] Chern M, Fitzgerald H A, Canlas P E, Navarre D A, Ronald P C. Over expression of a rice *NPR1* homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2005, 18: 511–520
- [16] Takahashi A, Agrawal G K, Yamazaki M, Onosato K, Miyao A, Kawasaki T, Shimamoto K, Hirochika H. Rice Pti1a negatively regulates RAR1-dependent defense responses. *Plant Cell*, 2007, 19: 2940–2951
- [17] Kim J A, Cho K, Singh R, Jung Y H, Jeong S H, Kim S H, Lee J, Cho Y S, Agrawal G K, Rakwal R, Tamogami S, Kersten B, Jeon J S, An G, Jwa N S. Rice *OsACDR1* (*Oryza sativa* accelerated cell death and resistance 1) is a potential positive regulator of fungal disease resistance. *Mol Cells*, 2009, 28: 431–439
- [18] Jiang C J, Shimonon M, Maeda S, Inoue H, Mori M, Hasegawa M, Sugano S, Takatsuji H. 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
- [19] Fujiwara T, Maisonneuve S, Isshiki M, Mizutani M, Chen L, Wong H L, Kawasaki T, Shimamoto K. Sekiguchi lesion gene encodes a cytochrome P<sub>450</sub> monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. *J Biol Chem*, 2010, 285: 11308–11313
- [20] Sun C H, Liu L H, Tang J Y, Lin A H, Zhang F T, Fang J, Zhang G F, Chu C C. *RLIN1*, encoding a putative coproporphyrinogen III oxidase, is involved in lesion initiation in rice. *Genet Genomics*, 2011, 38: 29–37
- [21] Jiao B B, Wang J J, Zhu X D, Zeng L J, Li Q, He Z H. A novel protein RLS1 with NB-ARM domains is involved in chloroplast degradation during leaf senescence in rice. *Mol Plant*, 2012, 5: 205–217
- [22] Tang J Y, Zhu X D, Wang Y Q, Liu L C, Xu B, Li F, Fang J, Chu C C. Semi-dominant mutations in the CC-NB-LRR-type *R* gene, *NLS1*, lead to constitutive activation of defense responses in rice. *Plant J*, 2011, 66: 996–1007
- [23] 王丹. 水稻分蘖调控基因 *TE* 的功能分析和类病突变体 *lms1* 的图位克隆. 中国农业科学院博士学位论文, 北京, 2012  
Wang D. Functional Analysis of a Key Tillering Regulator *TE* and Map-based Cloning of Gene *lms1* in Rice (*Oryza sativa* L.). PhD Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China, 2012 (in Chinese with English abstract)
- [24] 曹建. 水稻类病斑突变体的生理分析与 *LM* 基因的图位克隆. 中国农业科学院硕士学位论文, 北京, 2014  
Cao J. Physiological Analysis of a Lesion Mimic Mutant and Map-based Cloning of Gene *LM* in Rice (*Oryza sativa* L.). MS Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China, 2014 (in Chinese with English abstract)
- [25] 成晓越. 水稻类病斑新基因 *CHLI* (chloroplastic-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Lesion 1) 的鉴定与克隆. 浙江师范大学硕士学位论文, 浙江杭州, 2013  
Cheng X Y. Identification and Cloning of a Novel Rice Lesion Mimic Gene *CHLI* (Chloroplastic-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Lesion 1). MS Thesis of Zhejiang Normal University, Zhejiang, China, 2013 (in Chinese with English abstract)
- [26] Buschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, Van D R, Vander L T, Diergaarde P, Groenendijk J, Topsch S, Vos P, Salamini F, Schulze L P. The barley *MLO* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, 1997, 88: 695–705
- [27] Joergensen J H. Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*, 1992, 63: 141–152
- [28] Mizobuchi R, Hirabayashi H, Kaji R, Nishizawa Y, Yoshimura A, Satoh H. Isolation and characterization of rice lesion-mimic mutants with enhanced resistance to rice blast and bacterial blight. *Plant Sci*, 2002, 163: 345–353
- [29] Wu C J, Bordeos A, Madamba M R S, Baraoidan M, Ramos M, Wang G L, Leach J E, Leung H. Rice lesion mimic mutants with enhanced resistance to diseases. *Mol Genet Genomics*, 2008, 279: 605–619
- [30] Huang Q N, Shi Y F, Yang Y, Feng B H, Wei Y L, Chen J, Baraoidan M, Leung H, Wu J L. Characterization and genetic analysis of a light- and temperature-sensitive spotted-leaf mutant in rice. *J Integr Plant Biol*, 2011, 53: 671–681
- [31] 代高猛, 朱小燕, 李云峰, 凌英华, 赵芳明, 杨正林, 何光华. 水稻类病斑突变体 *spl31* 的遗传分析与基因定位. 作物学报, 2013, 39: 1223–1230  
Dai G M, Zhu X Y, Li Y F, Ling Y H, Zhao F M, Yang Z L, He G H. Genetic analysis and fine mapping of a lesion mimic mutant *spl31* in rice. *Acta Agron Sin*, 2013, 39: 1223–1230 (in Chinese with English abstract)
- [32] 王建军, 朱旭东, 王友林, 张利华, 薛庆中, 何祖华. 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  
Wang J J, Zhu X D, Wang Y L, Zhang L H, Xue Q Z, He Z H. Physiological and genetic analysis of lesion mimic mutants in rice. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2004, 30: 331–338 (in Chinese with English abstract)
- [33] Yin Z, Chen J, Zeng L, Goh M, Leung H, Khush G S, Wang G L. 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
- [34] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导(第3版). 北京: 高等教育出版社, 2003. pp 123–124  
Zhang Z L, Qu W J. Plant Physiology Experimental Guidance, 3rd edn. Beijing: Higher Education Press, 2003. pp 123–124 (in Chinese)
- [35] 赵亚华. 生物化学实验技术教程. 广州: 华南理工大学出版社, 2000. pp 153–154  
Zhao Y H. Biochemical Experimental Techniques Tutorial. Guangzhou: South China Science and Technology University Press, 2000. pp 153–154 (in Chinese)
- [36] 中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. pp 305–306  
Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences. Modern Laboratory Manual of Plant Physiology. Beijing: Science Press, 1999. pp 305–306 (in Chinese)
- [37] 杨敏文. 快速测定植物叶片叶绿素含量方法的探讨. 光谱实验室, 2002, 19: 478–481

- Yang M W. Study on rapid determination of chlorophyll content of leaves. *Spectrographic Lab*, 2002, 19: 478–481 (in Chinese with English abstract)
- [38] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol*, 1987, 148: 350–382
- [39] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9828–9832
- [40] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol*, 1985, 5: 69–76
- [41] Shen H C, Wang H M, Huang Q N, Xu X, Lu X G, Wu J L. Characterization and genetic analysis of a novel rice spotted-leaf mutant *HM47* with broad-spectrum resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Integr Plant Biol*, 2013, 55: 473–483
- [42] 梁颖, 李加纳, 唐章林, 谌利, 张学昆. 油菜光合生理指标与产量的关联分析. *西南农业大学学报*, 1999, 21: 38–41  
Liang Y, Li J N, Tang Z L, Chen L, Zhang X K. Correlative analysis of photosynthesis physiological targets and yield of rape. *J Southwest Agric Univ*, 1999, 21: 38–41 (in Chinese with English abstract)
- [43] 王忠华. 植物类病变突变体的诱发与突变机制. *细胞生物学杂志*, 2005, 27: 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)
- [44] Frye C A, Tang D, Innes R W. Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 373–378
- [45] 金杨, 周丽芬, 陈析丰, 刘峰, 马伯军. 水稻类病变突变体 *sp15* 细胞坏死机制的分析. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2009, 32: 329–330  
Jin Y, Zhou L F, Chen X F, Liu F, Ma B J. Mechanisms of cell death in rice lesion mimic mutant *sp15*. *J Zhejiang Norm Univ (Nat Sci)*, 2009, 32: 326–331 (in Chinese with English abstract)
- [46] 虞玲锦. 一种水稻类病变突变体生理分析与基因初定位, 南京林业大学硕士学位论文, 江苏南京, 2012  
Yu L J. Physiological Analysis and Mapping of a Lesion Mimic Mutant in Rice (*Oryza sativa* L.). MS Thesis of Nanjing Forestry University, Nanjing, China, 2012 (in Chinese with English abstract)
- [47] 章琦. 水稻白叶枯病抗性基因鉴定进展及其利用. *中国水稻科学*, 2005, 19: 453–459  
Zhang Q. Highlights in identification and application of resistance genes to bacterial blight. *Chin J Rice Sci*, 2005, 19: 453–459 (in Chinese with English abstract)
- [48] 鄂志国, 张丽靖, 焦桂爱, 程本义, 王磊. 稻瘟病抗性基因的鉴定及利用进展. *中国水稻科学*, 2008, 22: 533–540  
E Z G, Zhang L J, Jiao G A, Cheng B Y, Wang L. Highlights in identification and application of resistance genes to rice blast. *Chin J Rice Sci*, 2008, 22: 533–540 (in Chinese with English abstract)
- [49] 林艳, 陈在杰, 田大刚, 杨广阔, 杨绍华, 刘华清, 陈松彪, 王锋. 水稻类病斑及早衰突变体 *lms1* 的鉴定及基因初步定位. *福建农业学报*, 2014, 29(1): 29–34  
Lin Y, Chen Z J, Tian D G, Yang G K, Yang S H, Liu H Q, Chen S B, Wang F. Identification and gene mapping of a lesion mimic and senescence mutant *lms1* in rice. *Fujian J Agric Sci*, 2014, 29(1): 29–34 (in Chinese with English abstract)