中国水稻科学(*Chin J Rice Sci*), 2026, 40(1): 85－94
http://www.ricesci.cn
DOI: 10.16819/j.1001-7216.2026.240718

水稻类病变早衰突变体 *lmes7* 的鉴定与基因精细定位

刘亚萍[1,#] 董译词[1,#] 郑君妍[1] 邱绚[1] 刘鹏程[1] 叶亚峰[2] 刘斌美[2,*]
陈析丰[1,*] 马伯军[1,*]

([1] 浙江师范大学 生命科学学院, 浙江 金华 321004; [2] 中国科学院 合肥物质科学研究院, 合肥 230031; [#]共同第一作者；*通信联系人，email: liubm@ipp.ac.cn; xfchen@zjnu.cn; mbj@zjnu.cn)

Phenotypic Identification and Gene Fine Mapping of the Lesion Mimic and Early Senescence Mutant *lmes7* in Rice

LIU Yaping[1,#], DONG Yici[1,#], ZHENG Junyan[1], QIU Xuan[1], LIU Pengcheng[1], YE Yafeng[2], LIU Binmei[2,*], CHEN Xifeng[1,*] MA Bojun[1,*]

*([1]College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; [2]Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Science, Hefei 230031, China; [#]These authors contributed equally to this paper; *Corresponding author, email: liubm@ipp.ac.cn; xfchen@zjnu.cn; mbj@zjnu.cn)*

Abstract: 【Objective】 To study the molecular mechanisms of defense response and leaf premature senescence in rice, 【Method】we screened a lesion mimic and early senescence mutant, designated *lmes7* (lesion mimic and early senescence 7), from a mutant library of the *japonica* rice variety Wuyunjing 7. The main agronomic traits of the mutant and the photosynthetic pigment content in its leaves were measured. The target gene was identified through fine mapping and sequencing, and its encoded protein was analyzed and aligned.【Result】Physiological analysis showed that the photosynthetic pigment content in the mutant leaves was significantly lower than that of the WT, along with excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS). In the *lmes7* mutant, the effective tiller number, plant height, flag leaf length, flag leaf width, panicle length, grain number per panicle, seed setting rate, and grain yield per plant decreased significantly, while grain thickness increased significantly. Genetic analysis indicated that the mutant phenotype was controlled by a single recessive nuclear gene. Using map-based cloning, the target gene was fine-mapped to a 90-kb region between RM28486 and RM28489 on chromosome 12. PCR and sequencing revealed a 7-bp deletion in *OsACL-A2*, a gene encoding ATP-citrate lyase, in the *lmes7* mutant, resulting in a frameshift mutation and premature termination of translation. Phylogenetic analysis and sequence alignment indicated that the mutation site of *lmes7* lies within the succinyl-CoA synthetase domain, identifying *lmes7* as a novel allelic variant of *OsACL-A2*.
Key words: rice; lesion mimic and early senescence; *lmes7*; phenotypic identification; fine mapping

摘 要：【目的】研究水稻防御反应和叶片早衰相关基因的分子机理。【方法】从粳稻武运粳 7 号诱变库中筛选出一个类病变早衰突变体 *lmes7* (*lesion mimic and early senescence 7*)。调查统计了该突变体的主要农艺性状，对其叶片中的光合色素含量进行测定，利用图位克隆技术对目的基因进行精细定位和测序鉴定，并对其编码蛋白进行分析与序列比对。【结果】突变体叶片中的光合色素含量比 WT 极显著降低，且细胞中存在活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过量积累；突变体植株的生长发育受到严重影响，有效分蘖数、株高、剑叶长、剑叶宽、穗长、每穗粒数、结实率及单株产量等均显著下降，但粒厚显著增加；遗传分析表明，*lmes7* 的突变表型受单隐性核基因控制；利用图位克隆技术将目的基因精细定位在水稻 12 号染色体上 RM28486 和 RM28489 之间的 90 kb 区域内；PCR 测序分析表明，*lmes7* 突变体中一个编码 ATP-柠檬酸裂解酶的目标基因 *OsACL-A2* 发生了 7 个碱基缺失，导致该基因发生移码突变，蛋白翻译提前终止；对水稻 OsACL-A2 蛋白的进化分析与序列比对可知，*lmes7* 突变位点发生在琥珀酰辅酶 A 合成酶结构域，*lmes7* 是 *OsACL-A2* 新的等位变异。
关键词：水稻；类病变早衰；*lmes7* 突变体；表型鉴定；精细定位

收稿日期：2024-07-25；**修改稿收到日期：**2024-09-27。
基金项目：国家自然科学基金资助项目(32071987, 32101697)；浙江省自然科学基金资助项目(LQ22C130005, LZ23C130004, Z24C130016)。

超敏反应(hypersensitive response, HR)是植物防御反应过程中最重要的机制之一，直接导致感染病原菌的细胞快速发生程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)，从而阻止病原菌向相邻的细胞扩散[1]。植物类病变(lesion mimic)与 HR 反应症状类似[2]，指植物在没有明显的逆境、损伤或病原物侵害时，叶片、叶鞘等自发形成大小不等、颜色不同的类病斑。研究者把产生这类表型的突变体称为类病变突变体(lesion mimic mutants, *lmms*)。*lmms* 中常伴随着活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累和病程相关蛋白(pathogenesis related, *PR*)基因的表达[3]，从而拥有系统获得性抗性[4]，被认为是研究植物防御反应抗病机制的重要材料[5]。

植物类病变产生的机制多且复杂，主要由抗病基因的突变、PCD 异常调控、ROS 过量积累及外部环境变化等因素引起。现已从拟南芥[6]、水稻[7]、大麦[8]、玉米[9]等植物中分离鉴定出多种类病变突变体。水稻作为最主要的粮食作物，目前已报道克隆了 40 多个类病变突变体[10]。多数类病变突变体是叶片上逐渐出现类病斑，还有一部分是伴随着快速的叶片衰老死亡现象。例如，水稻突变体 *lms* 从分蘖期开始出现红褐色类病斑，开花后逐渐严重，且叶片发黄枯萎，植株快速衰老[11]。*spl28* 在分蘖早期出现小型类病斑，开花后类病斑蔓延至整个叶片，且叶片在开花早期出现褪绿现象，在开花后期枯萎[12]。*lms1* 的叶片在苗期出现零星的褐色类病斑，随着植株的生长发育，类病斑逐渐增多，到结实期时剑叶、倒二叶、倒三叶等都布满褐色类病斑且叶色发黄呈早衰表型[13]。*lmes3* 在分蘖早期叶片出现铁锈色的类病变表型，随着植株的生长，类病斑数目增加，孕穗期叶尖开始枯黄早衰，抽穗期枯黄从叶尖沿着叶边一直延续到叶底部，成熟期类病斑连片存在，衰老加速，整个植株呈黄褐色直至提前枯死[14]。*lmes4* 在分蘖早期叶片出现类病斑，同时整张叶片除叶脉外出现黄化症状，抽穗期下部叶片的叶尖加速枯黄，上部功能叶片的叶尖开始枯黄并伴有水渍状类病斑，成熟期叶尖完全枯黄，并从叶尖延续到叶中部，成熟后 20 d 内叶尖完全枯死，呈早衰表型[14]。以上突变体中均检测到高水平的 ROS、植物抗毒素或其他病原体防御相关成分，说明水稻类病变突变体中这些成分的过量积累会诱导植株加快衰老[15]。

水稻类病变早衰突变体既能自发形成坏死斑，又伴有叶片早衰现象，故研究该类突变体对了解叶片早衰过程中的各种生理变化及其影响因素，阐明植物 PCD 及防御反应相关分子机制具有十分重要的意义。本研究从粳稻品种武运粳 7 号的辐射诱变库中筛选到一个类病变早衰突变体，因有 5 个类似的突变体已被报道，实验室之前也发现一个类病变早衰突变体并命名为 *lmes6*，因此暂将该突变体命名为 *lmes7*。*lmes7* 从分蘖期开始出现类病斑，伴随叶片早衰，对其进行了叶绿素含量测定，叶片组织化学染色、农艺性状统计等分子生物学及生理生化实验，也通过图位克隆技术克隆了目标基因，并对该基因的功能蛋白进一步分析，以期为选育抗病抗衰的水稻新品种提供理论基础和指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用重离子束对粳稻品种武运粳 7 号进行辐射诱变，成功筛选到具有类病变表型的 *lmes7* 突变体。在多代自交后，*lmes7* 突变体后代的突变表型稳定遗传。将 *lmes7* 突变体与籼稻品种 9311 杂交，F_1 代自交后获得 F_2 分离群体，在 F_2 群体中选取具有突变表型的单株，用于基因定位。

1.2 实验方法

1.2.1 叶片组织染色

在突变体 *lmes7* 植株的叶片刚出现类病斑时，分别取 *lmes7* 与野生型对照武运粳 7 号相同时期、相同叶位的叶片，分别进行以下实验。

氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium, NBT)染色[16]：将叶片浸没在 0.2 mg/mL NBT 溶液的离心管中，抽真空处理 20 min 后，置于黑暗中染色 8 h，取出叶片放于无水乙醇中，利用沸水浴脱色至叶片变白，脱色后的叶片扫描、观察。设置 3 个重复实验。

二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)染色[17]：将叶片浸泡在含 1 mg/mL 的 DAB 溶液(pH 5.8)的离心管中，抽真空处理 30 min 后，置于黑暗处染色 8 h，取出叶片转入无水乙醇中沸水浴脱色，脱色后的叶片扫描、观察。设置 3 个重复实验。

1.2.2 农艺性状调查

在成熟期，随机选取突变体 *lmes7* 与 WT 各 10 个单株，分别统计株高、剑叶长、剑叶宽、有效分蘖数、穗长、每穗粒数、结实率、单株产量，并在脱粒晒干后测量粒长、粒宽、粒厚、千粒重等农艺性状。取平均值，计算标准差，采用 *t* 检验进行显著性检验($P < 0.05$ 表示有显著性差异，$P < 0.01$ 表示有极显著差异)。

表 1　本研究用到的 PCR 分子标记引物

Table 1. PCR molecular marker primers used in this study

引物名称 Primer name	正向引物 Former primer(5’ →3’)	反向引物 Reverse primer(5’ →3’)
Indel1	CGATTTCTCGTCGAGGTTCC	TCCTTCAAGAATCTCCATCTGC
lmes7-1	CGCTGCCTCACTAACGCCTAT	ACCTCCGAGTCCAAAACA
lmes7-2	TTAGGTCACGGAATCAAC	TCCAGAATGGGAGAAAAG
lmes7-3	GGAGAACTGGGATAAGGT	TTAGACTTACAGTATCAGCAT
lmes7-4	GGTTGGAGATTTGGGAT	TCTTTGAGTTTGGTGGAT

1.2.3　叶绿素含量测定

采用 80%丙酮浸提法[18]提取叶片中的光合色素。在水稻分蘖期，选取突变体 *lmes7* 与野生型相同叶位、长势较好的叶片，清洁干净并去掉主脉后，剩余的部分剪成小碎片，用电子天平称取 0.1 g，放入 15 mL 离心管，在管中加入 3 mL 80%丙酮，常温下避光提取 48 h 以上，每种重复取三组。待叶片褪色后，以 1 mL 80%丙酮为空白对照，在光径 1 cm 的比色皿中加入 50 μL 上清液以及 950 μL 80%丙酮混匀后作为实验组，利用紫外分光光度计测量在 664、647 和 470 nm 处的光密度值(OD 值)。计算公式如下[19]：

叶绿素 a 浓度(Chl a)= $13.71\times A_{664}-2.85\times A_{647}$；

叶绿素 b 浓度(Chl b)= $22.39\times A_{647}-5.42\times A_{664}$；

类胡萝卜素浓度(Car)=(1000×A_{470}－3.27×Chl a－104×Chl b)/229；

其中 A_{664}、A_{647}、A_{470} 分别表示在波长 664 nm、647 nm、470 nm 下的光密度值。根据以上公式求出叶绿素和类胡萝卜素的浓度之后，再通过以下公式求出叶绿素及类胡萝卜素的含量。

叶绿素或类胡萝卜素含量(mg/g)= $(c\times V\times n)/(1000\times m)$。

式中，c 为叶绿素或类胡萝卜素浓度；V 为提取液体积，单位为 mL；n 为稀释倍数；m 为质量，单位为 g。

1.2.4　遗传分析及基因定位

2022 年夏，将 *lmes7* 与籼稻 9311 杂交得到 F_1 后，鉴定 F_1 的表型，同年冬季于海南播种 F_1，收获种子。2023 年夏，把 F_1 自交种子播种在金华湖海塘实验大田中形成 F_2 群体，统计 F_2 群体中的野生型和突变型的单株数量，计算分离比，并进行χ^2检验，确定表型的显隐性以及是否受单基因控制。使用 *lmes7*/9311 构建的 F_2 群体中具有类病斑表型的单株作为基因定位的群体。

利用图位克隆技术进行基因初定位分析[20]。从 F_2 群体中随机选取 20 株具有类病变表型的单株和 20 株具有野生型表型的单株，分别取相同质量的叶片混匀构建 DNA 显隐性池，采用水稻已公布的 SSR 标记[21]，对目的基因进行染色体的连锁分析，将目的基因初步定位到某条染色体的一个区间内。随后，对 F_2 群体的 89 株突变型单株 DNA 进行连锁标记的 PCR 分析，基于日本晴和 9311 基因组的差异，筛选了多对多态性较好的差异引物进行精细定位。

1.2.5　候选基因的测序和序列分析

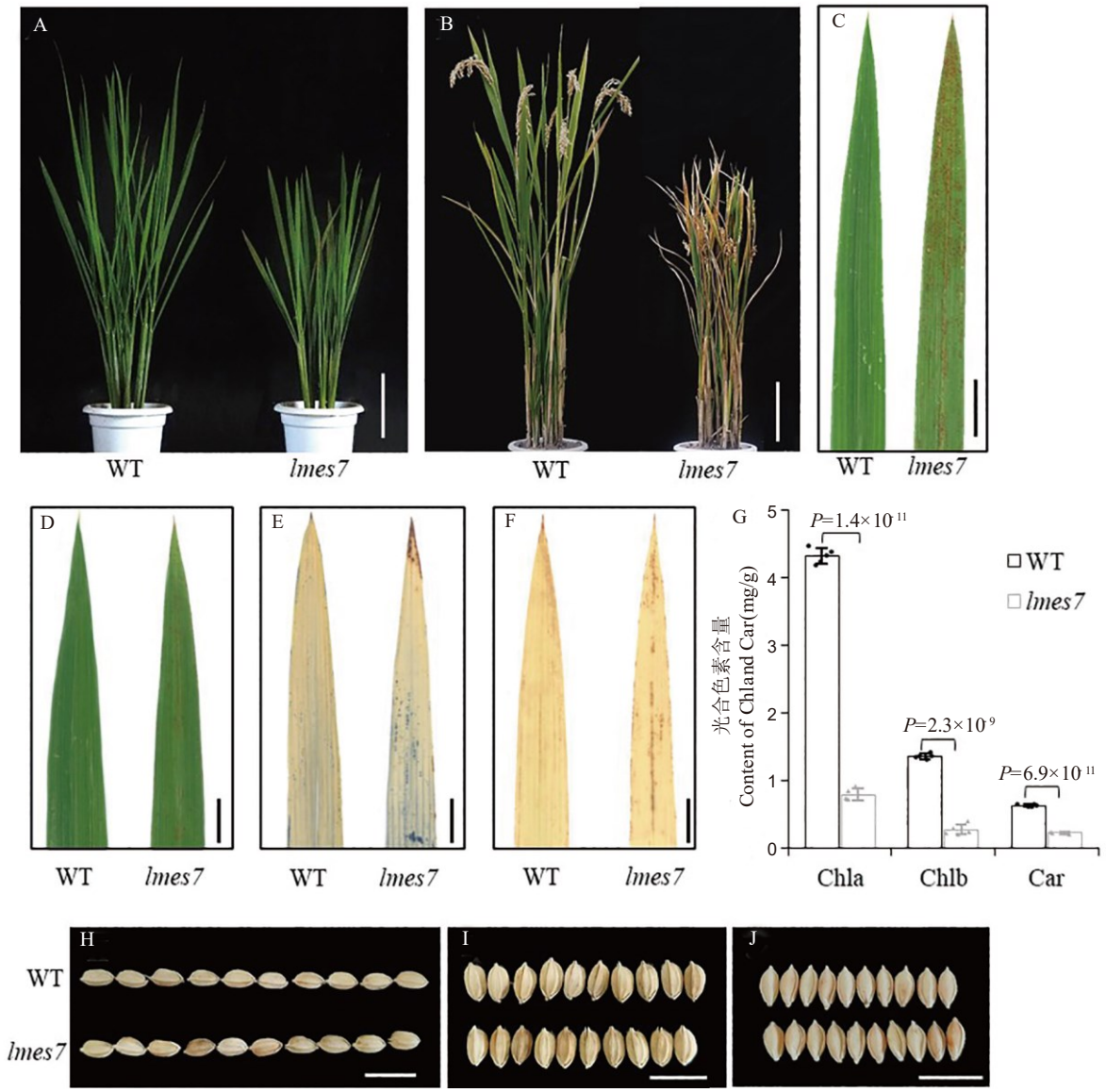
在明确该突变基因的大致范围后，在水稻基因组注释数据库中查阅开放阅读框，并分析候选基因，下载候选基因的 DNA 序列，在此基础上设计合适的引物，对野生型和突变体植株进行 PCR 扩增与测序。将 PCR 产物寄送生物技术公司，用 PCR 引物进行两端测序。本研究所用的测序引物如表 1 所示。

从植物基因组数据库 Gramene(https://www.gramene.org/)获得候选蛋白以及其在其他植物中的同源蛋白，采用 MEGA 7.0 软件对下载的蛋白序列进行 Alignment 分析，并用最大似然法(Maximum Likelihood)构建系统发育树，Bootstrap 值设定为 1000[22]。使用 GeneDoc 软件对候选蛋白和野生型序列进行保守结构域的比对分析。

2　结果与分析

2.1　水稻类病变早衰突变体 *lmes7* 的鉴定

从分蘖期开始，突变体 *lmes7* 的叶尖出现红褐色的类病斑，随着植株生长发育，类病斑逐渐增多，到成熟期时，*lmes7* 的剑叶、倒二叶、倒三叶上布满了类病斑，且叶色发黄，呈现早衰表型。同时，整个生命周期中 *lmes7* 都较野生型植株矮小(图 1-A~C)。检测突变体叶片中的光合色素含量，结果表明，不论是叶绿素 a、b，还是类胡萝卜素，都比野生型的显著降低，突变体中光合色素含量分别是野生型的 16.9%、17.0%、36.3%(图 1-G)。叶绿素



A: 植株在分蘖期的表型，标尺=10 cm；B: 植株在成熟期的表型，标尺=20 cm；C: 剑叶表型，标尺=2 cm；D: 染色前的野生型和 *lmes7* 的叶片表型；E: 叶片的 NBT 染色；F: 叶片的 DAB 染色，标尺=1 cm；G: 叶片光合色素含量；H~J: WT 和突变体 *lmes7* 籽粒的长度、宽度和厚度的照片，标尺=1 cm。

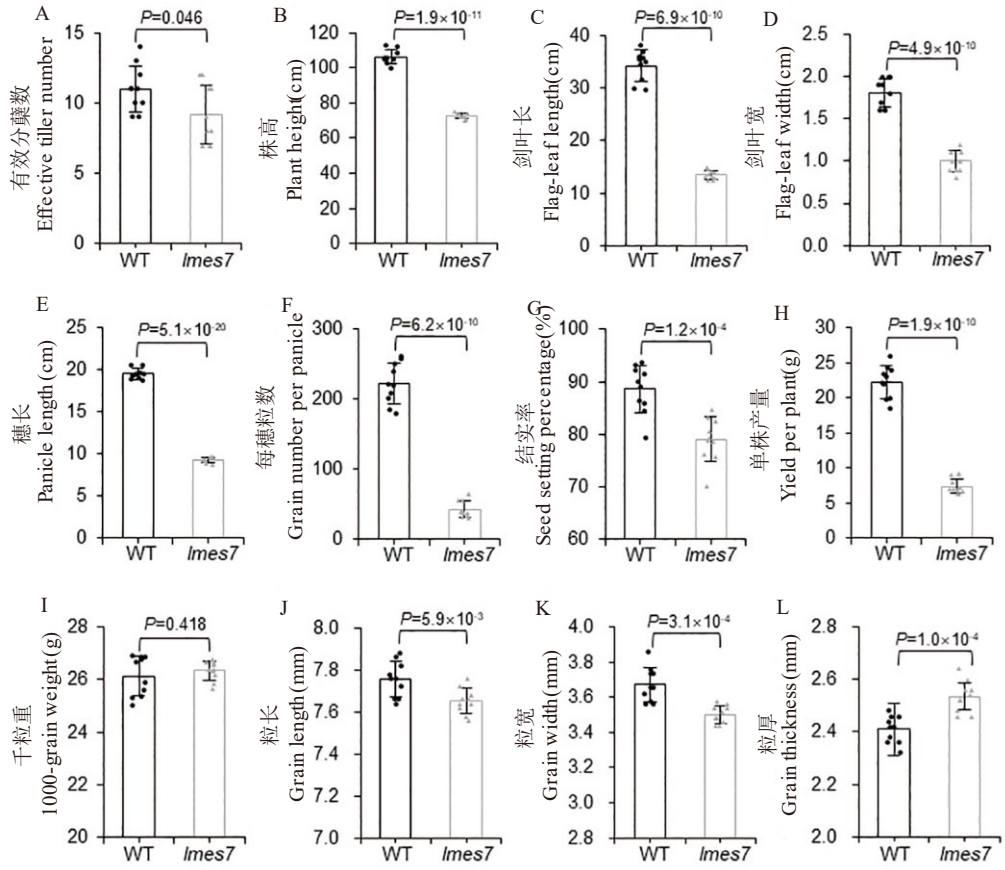
A, Phenotype of plants during the tillering stage, bar=10 cm; B, Phenotype of plants at maturity, bar=20 cm; C, Flag leaf phenotype, bar=2 cm; D, WT and *lmes7* leaf phenotype before staining; E, NBT staining of leaves; F, DAB staining of leaves, bar=1 cm; G, Content of photosynthetic pigments in leaves. H and J, Grain length, grain width and grain thickness of WT and *lmes7*, bar=1 cm.

图 1 水稻类病变早衰突变体 *lmes7* 的鉴定

Fig. 1. Phenotype of the lesion mimic and early senescence mutant *lmes7*

是植物进行光合作用的关键色素，它能够吸收光能并将其转化为化学能，为植物的生长和发育提供能量，类胡萝卜素则具有保护叶绿素免受光氧化损伤的作用。叶绿素和类胡萝卜素含量的下降，除了会降低植株对光能的利用效率，影响其光合作用，还可能导致植物对光逆境的抵抗能力减弱，进一步加剧叶片衰老。

过氧化物如超氧阴离子($O_2 \cdot^-$)的积累不仅能破坏生物大分子，还会对细胞造成毒害使其坏死，从而产生类似于病变的类病斑[23]。氮蓝四唑(NBT)能与 $O_2 \cdot^-$反应生成一种蓝色的化合物，可以检测 *lmes7* 突变体中是否有 $O_2 \cdot^-$的积累。叶片染色结果发现，与野生型相比，*lmes7* 的叶片上出现较多蓝色类病斑，说明突变体中确有 $O_2 \cdot^-$沉积(图 1-E)。而二氨基联苯胺(DAB)能够与 H_2O_2 发生反应，在极短时间内产生红褐色沉淀。突变体 *lmes7* 与 WT 的 DAB 染色结果显示，*lmes7* 叶片的类病斑区域出现红棕色物质，说明有 H_2O_2 积累(图 1-F)。综上，突



A：有效分蘖数；B：株高；C：剑叶长；D：剑叶宽；E：穗长；F：每穗粒数；G：结实率；H：单株产量；I：千粒重；J：粒长；K：粒宽；L：粒厚。*t* 检验存在显著性差异($P< 0.05$)和极显著性差异($P< 0.01$)。

A, Effective tiller number; B, Plant height; C, Flag-leaf length; D, Flag-leaf width; E, Panicle length; F, Grain number per panicle; G, Setting percentage; H, Yield per plant; I, 1000-grain weight; J, Grain length; K, Grain width; L, Grain thickness. *t*-test showed significant difference ($P< 0.05$) and extremely significant difference ($P< 0.01$).

图 2　水稻突变体 *lmes7* 与 WT 的大田农艺性状比较

Fig. 2. Comparison of agronomic traits between WT and rice mutant *lmes7*

变体 *lmes7* 叶片中存在活性氧的过量积累，导致植株产生类病变表型。

2.2　大田农艺性状统计分析

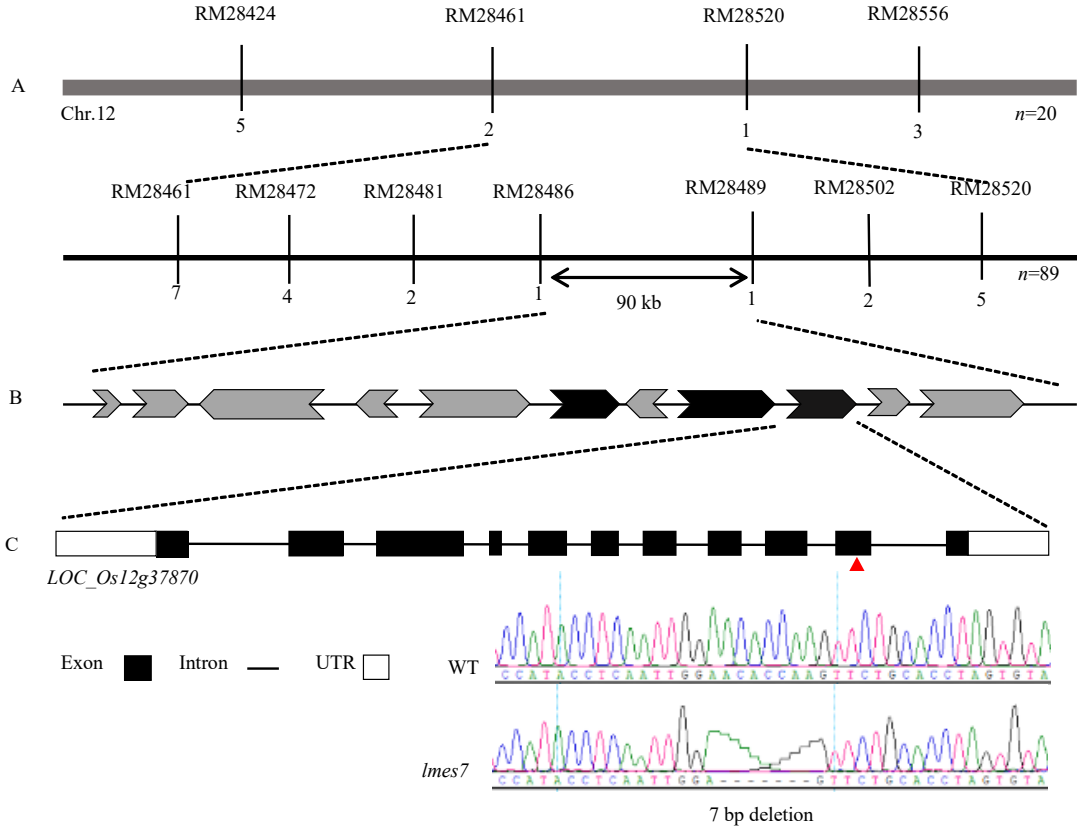
在成熟期调查 *lmes7* 突变体与 WT 的农艺性状，结果显示，*lmes7* 的生长和发育确实受到明显抑制，其有效分蘖数、株高、剑叶长、剑叶宽、穗长、每穗粒数、结实率、单株产量等主要性状均显著低于 WT，数值分别是野生型的 83.6%、68.3%、39.3%、55.8%、48.0%、17.6%、88.3%、29.2%(图 2-A~H)。突变体的粒长和粒宽也与 WT 显著减小，但粒厚却显著增加，导致突变体的千粒重较野生型并无明显变化，说明粒厚的增加补偿了粒长和粒宽的减少(图 2-I~L)。

2.3　突变体 *lmes7* 的遗传分析

分别将突变体 *lmes7*、籼稻 9311 作为母本、父本进行杂交，完成遗传分析群体的构建。F_1 表型和 WT 相同，其自交得到的 F_2 群体中有 89 株为类病变表型，254 株为野生表型。χ^2 检验的结果显示，突变体 *lmes7* 的 F_2 群体中类病变表型植株与野生型表型植株的数量符合 3∶1 分离比 (χ^2=0.68，$P>0.05$)，由此可见，*lmes7* 的类病变性状为单隐性核基因控制。

2.4　*lmes7* 基因的精细定位与测序分析

利用已公布的水稻 SSR 标记对 *lmes7* 突变体与籼稻 9311 这两个杂交亲本进行 PCR 扩增，选取 F_2 群体中有类病斑和无类病斑的植株，构建显隐性池，筛选出在 12 条染色体上分布的多态性分子标记 85 对，通过这些多态性标记对 *lmes7* 突变基因进行连锁分析，结果显示在水稻 12 号染色体上有连锁现象。利用 20 个 F_2 群体的突变型单株将目的基因进一步定位，初步定位在 12 号染色体 RM28461 和 RM28520 之间的 550 kb 区域内。接着扩大群体



A: *lmes7* 基因精细定位的遗传图谱，“*n*”为定位分析所用到 F_2 突变单株数，标记下的数字为该标记检测到的重组数； B: 定位区间内注释基因；C: 候选基因 *LOC_Os12g37870* 突变位点的测序结果。

A, Genetic map of the *lmes7* gene by fine mapping, '*n*' refers to the number of F_2 mutants used for mapping, the number under each marker represents the number of recombination detected by the corresponding marker; B, Annotation genes in the localization interval; C, Sequencing results of candidate gene *LOC_Os12g37870* in the mutation sites.

图 3 水稻 *lmes7* 基因的精细定位与候选基因测序分析

Fig. 3. Fine mapping and candidate gene sequencing of rice *lmes7*

数量继续精细定位，利用 89 个 F_2 代群体的突变型单株，最终将基因定位在分子标记 RM28486 和 RM28489 之间，物理距离为 90 kb(图 3-A)。

根据水稻基因组注释数据库，在该范围内存在 2 个与 *lmes7* 突变体具有相似表型的注释类病变基因(图 3-B)。对候选基因进行 PCR 扩增和测序分析，对比 WT 和突变体 *lmes7* 的序列，发现突变体中 *LOC_Os12g37870* 基因的第 10 个外显子(exon)中缺失了 7 个碱基(图 3-C)。通过查阅文献得知，*LOC_Os12g37870* 是类病变基因 *OsACL-A2*，其编码一种 ATP-柠檬酸裂解酶[25]，而 *lmes7* 是类病变基因 *OsACL-A2* 的一个新的等位突变。

2.5 水稻 OsACL-A2 蛋白的进化分析与序列比对

利用水稻 OsACL-A2 蛋白序列，在植物基因组数据库 (https://www.gramene.org/) 中搜索小麦 (*Triticum aestivum*)、玉米 (*Zea mays*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和小立碗藓 (*Physcomitrium patens*)等 26 个物种的 52 个同源蛋白，并构建了 OsACL-A2 的系统发育树(图 4)。结果表明，水稻 OsACL-A2 蛋白与狗尾草、霍尔穗草、高粱、玉米等单子叶植物的同源性较高，其中与狗尾草和霍尔穗草的亲缘关系最近。

OsACL-A2 蛋白由一个谷胱甘肽合成酶 ATP 结合结构域 (glutathione synthetase ATP-binding domain) 和一个琥珀酰辅酶 A 合成酶结构域 (Succinyl-CoA synthetase domains)组成。与野生型 WT 的基因序列相比，*lmes7* 突变体中缺失了 7 个碱基，导致 OsACL-A2 蛋白第 394 位后氨基酸出现错位匹配，翻译提前终止。而已报道等位变异突变体 *spl30* 中该蛋白的第 343 位天冬酰胺(N)被替换成酪氨酸(Y)(图 5)。*lmes7* 和 *spl30* 都是在琥珀酰辅酶 A 合成酶结构域上发生了突变，从而导致类病变表型出现，由此说明该结构域在水稻防御反应中发挥着重要作用。

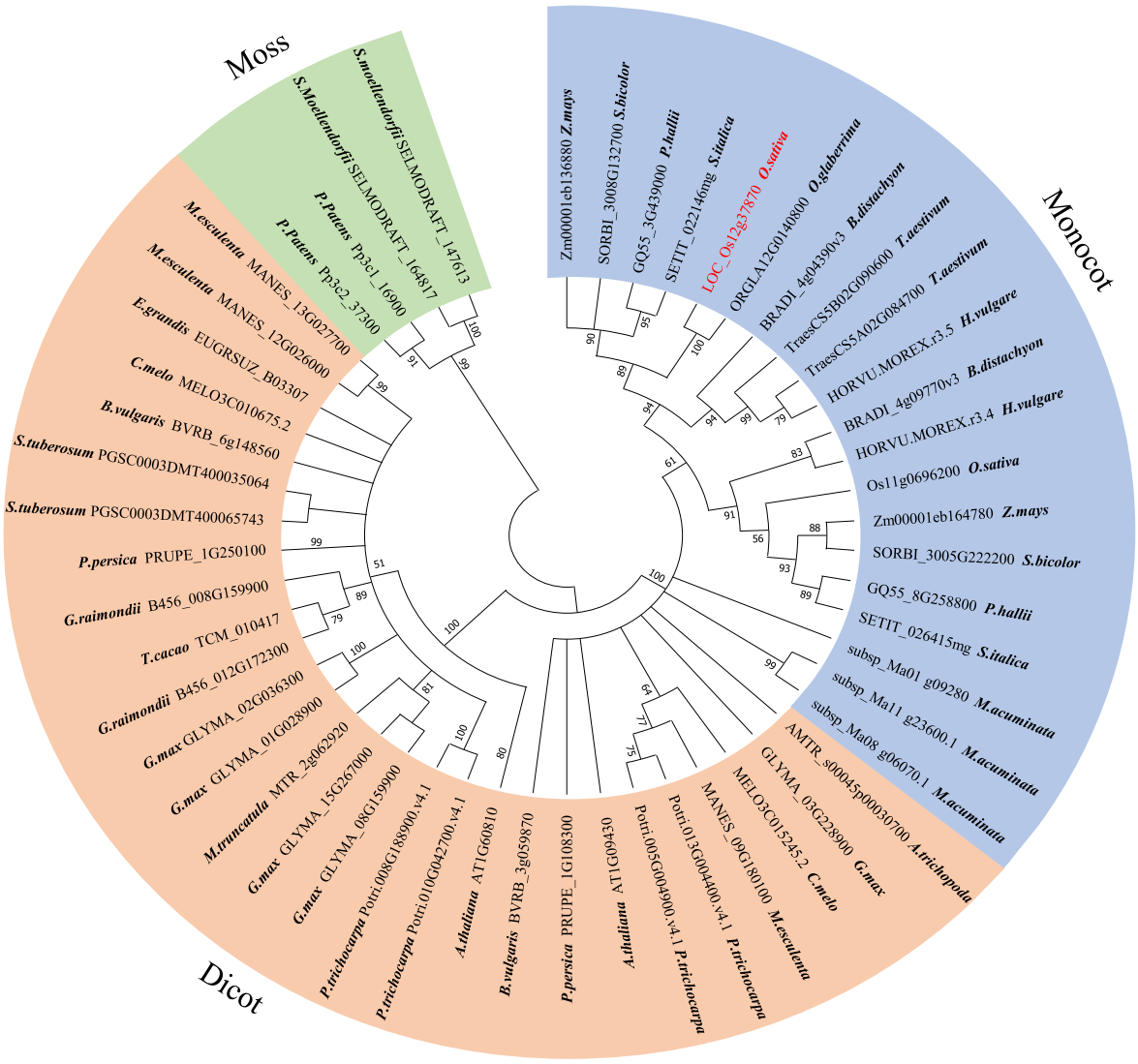


图 4　OsACL-A2 蛋白的系统发育树

Fig. 4. Phylogenetic tree analysis of OsACL-A2 protein

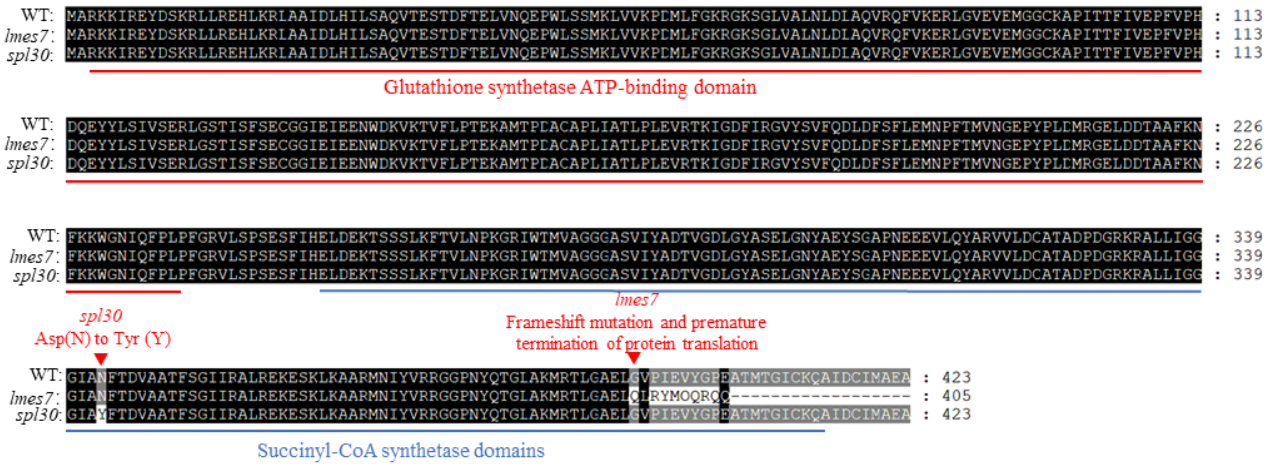


图 5　突变体 *lmes7*、*spl30* 与 WT 的 OsACL-A2 蛋白序列比对

Fig. 5. Sequence alignment of OsACL-A2 protein between mutant *lmes7*, *spl30* and WT

3 讨论

目前，植物中关于 ATP-柠檬酸裂解酶(ACL)基因突变的报道较少。ACL 主要是一种胞质酶，可催化柠檬酸盐生成乙酰辅酶 A，乙酰辅酶 A 参与多种物质的合成，对于植物生长发育和适应胁迫具有重要作用[24]。植物中 ACL 有两种亚基，亚基 A 和亚基 B，如编码拟南芥 ACL 蛋白的两个亚基基因 *ACL-A*、*ACL-B*[26]，编码甘蔗 ACL 蛋白的两个亚基基因 *SoACL-A1*、*SoACL-B1*[27]。ACL-A 和 ACL-B 的结构域不同，如拟南芥 AtACL-A 由 *AtACL-A1*、*AtACL-A2* 和 *AtACL-A3* 基因编码，且都位于 1 号染色体上；AtACL-B 则由 *AtACL-B1* 和 *AtACL-B2* 基因编码，前者位于 3 号染色体而后者位于 5 号染色体上[28]。有研究表明，拟南芥中 AtACL-A1 活性降低可导致突变体组织弱小、细胞变小、表皮蜡沉积减少、质体形态异常等表型，表明 ACL 对植物正常生长发育必不可少, 在应对逆境胁迫反应中发挥重要作用[27]；拟南芥 *AtACL-B2* 的 T-DNA 插入突变体能单独增强对大丽轮枝菌(*V. dahliae*)感染的抗性，而不引起强烈的细胞死亡，没有产生类似病变的表型，说明降低 *AtACL-B2* 的表达可以释放抑制的免疫应答[29]；此外，转基因番茄中 *SlACL-A2* 基因高表达导致柠檬酸含量下降，影响与柠檬酸代谢紧密联系的糖代谢，从而导致番茄果实风味品质相关物质如苹果酸、果糖、葡萄糖及蔗糖等含量都显著性低于野生型[30]；陆地棉和海岛棉 *ACL-B2* 基因沉默后，发现棉花顶端叶片会产生大量的 H_2O_2，说明 *ACL-B2* 基因负调控 ROS 的暴发，诱导植物发生 PCD 过程，致使棉花顶端叶片枯萎死亡，在棉花中充当 PCD 的负调节因子[31]。

有研究表明，水稻 ACL-A 亚基也由三个基因编码，即 *OsACL-A1(LOC_Os11g47330)*、*OsACL-A2(LOC_Os12g37870)*和 *OsACL-A3(LOC_Os11g47120)*，尽管氨基酸序列比对显示 OsACL-A1、OsACL-A2 和 OsACL-A3 之间的同源性超过 90%，但系统发育分析表明 OsACL-A2 与 OsACL-A1 和 OsACL-A3 属不同的分支，存在亚功能化[25]。*LMES7* 基因编码 OsACL-A2，与已报道的水稻类病变调控基因 *SPL30* 是同一个基因。水稻 *spl30* 突变体中 ATP-柠檬酸裂解酶的活性显著下降，引起柠檬酸底物大量积累，从而刺激 *OsSL* 的表达，激活 5-羟色胺代谢途径介导的防御反应，导致类病变表型出现，增强了水稻对病害的抗性[25]。水稻 *lmes7* 突变体与水稻 *spl30* 突变体表现出相似的类病变表型，都是分蘖期开始叶片上出现类病斑，成熟期叶片上布满类病斑且黄化早衰，植株矮化，产量降低，同时还可能增强了对某些水稻病害的抗性。

但水稻 *lmes7* 突变体在株高、穗长和有效穗粒数方面均比 *spl30* 突变体受到更严重的抑制，其株高、穗长和有效穗粒数分别比 WT 降低 32.10%、52.10%和 80.49%，而 *spl30* 突变体在这三个方面仅仅较野生型下降 15%左右。造成两者表型和产量差异较大的原因可能是：1)水稻 *lmes7* 与 *spl30* 是 *OsACL-A2* 基因的不同等位突变，尽管两者的突变都发生在 OsACL-A2 的琥珀酰辅酶 A 合成酶结构域上，但 *lmes7* 突变导致了该基因移码突变，氨基酸错位匹配使翻译提前终止，琥珀酰辅酶 A 合成酶结构域的功能严重受损，而 *spl30* 只是一个碱基发生错义突变，可能该结构域的功能受影响较小。同时，也说明了琥珀酰辅酶 A 合成酶结构域对 OsACL-A2 的功能发挥具有重要作用；2)水稻突变体 *lmes7* 与 *spl30* 的遗传背景不同，可能导致两者的农艺性状差异。值得注意的是，水稻 *lmes7* 突变体的粒长、粒宽虽然显著降低，但是粒厚却显著增加，结果其千粒重与野生型相比无显著差异。水稻粒厚与产量和稻米品质密切相关，粒厚性状的遗传机制较为复杂[32]。进一步解析 *LMES7* 基因调控粒厚的分子机制，将有助于完善水稻粒型调控机理研究和提升高产优质水稻种质资源的开发与利用。

4 结论

水稻 *lmes7* 突变体从分蘖期开始出现类病斑，到成熟期时叶片上布满铁锈样类病斑，且叶色发黄，兼具类病变与早衰表型。叶片组织的染色结果表明，*lmes7* 突变体中细胞死亡现象与活性氧的积累有关。与野生型相比， *lmes7* 突变体的农艺性状统计结果中除了粒厚显著增加、千粒重不变，其他都显著下降。利用图位克隆技术将 *LMES7* 基因定位在水稻 12 号染色体上，发现其编码一种 ATP-柠檬酸裂解酶 OsACL-A2。在 *lmes7* 突变体中 *LMES7* 基因发生了 7 个碱基缺失的移码突变，是 *OsACL-A2* 基因的等位变异。

参考文献:

[1] Hammond-Kosack K E, Jones J D. Resistance gene-dependent plant defense responses[J]. *The Plant Cell*, 1996, 8(10): 1773-1791.

[2] 刘宝玉, 刘军化, 杜丹, 闫萌, 郑丽媛, 吴雪, 桑贤春, 张长伟. 水稻类病斑突变体 *spl34* 的鉴定与基因精细定位[J]. 作物学报, 2018, 44(3): 332-342.
Liu B Y, Liu J H, Du D, Yan M, Zheng L Y, Wu X, Sang X C, Zhang C W. Identification and gene mapping of a lesion mimic mutant *spl34* in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44(3): 332-342. (in Chinese with English abstract)

[3] 王建军, 朱旭东, 王林友, 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[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(3): 331-338.
Wang J J, Zhu X D, Wang L Y, Zhang L H, Xue Q Z, He Z H. Physiological and genetic analysis of lesion resembling disease mutants (*lrd*) of *Oryza sativa* L.[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, 30(3): 331-338. (in Chinese with English abstract)

[4] Zou T, Li G W, Liu M M, Liu R, Yang S Y, Wang K, Lu L H, Ye Q Y, Liu J X, Liang J, Deng Q M, Wang S Q, Zhu J, Liang Y Y, Liu H N, Yu X M, Sun C H, Li P, Li S C. A ubiquitin-specific protease functions in regulating cell death and immune responses in rice[J]. *Plant Cell Environment*, 2023, 46(4): 1312-1326.

[5] 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[J]. *Molecular Breeding*, 2012, 30(2): 939-949.

[6] Lorrain S, Lin B Q, Auriac M C, Kroj T, Saindrenan P, Nicole M, Balagué C, Roby D. Vascular associated death1, a novel GRAM domain containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(8): 2217-2232.

[7] Yamanouchi U, Yano M, Lin H X, Ashikari M, Yamada K. A rice spotted leaf gene, *Spl7*, encodes a heat stress transcription factor protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(11): 7530-7535.

[8] Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Töpsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P. The barley *Mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance[J]. *Cell*, 1997, 88(5): 695-705.

[9] Gray J, Close P S, Briggs S P, Johal G S. A novel suppressor of cell death in plants encoded by the *Lls1* gene of maize[J]. *Cell*, 1997, 89(1): 25-31.

[10] Ma H G, Li J, Ma L, Wang P L, Xue Y, Yin P, Xiao J H, Wang S P. Pathogen inducible OsMPKK10.2-OsMPK6 cascade phosphorylates the Raf like kinase OsEDR1 and inhibits its scaffold function to promote rice disease resistance[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(4): 620-632.

[11] Undan J R, Tamiru M, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Takagi H, Yoshida K, Kanzaki H, Saitoh H, Fekih R, Sharma S, Undan J, Yano M, Terauchi R. Mutation in *OsLMS*, a gene encoding a protein with two double-stranded RNA binding motifs, causes lesion mimic phenotype and early senescence in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Genes & Genetic Systems*, 2012, 87(3): 169-179.

[12] Qiao Y L, Jiang W Z, Lee J, Park B, Choi M, Piao R, Woo M, Roh J, Han L, Paek N, Seo H S, Koh H. *SPL28* encodes a clathrin-associated adaptor protein complex 1, medium subunit micro 1 (AP1M1) and is responsible for spotted leaf and early senescence in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *The New Phytologist*, 2010, 185(1): 258-274.

[13] 余瑶, 王紫瑶, 周思睿, 刘鹏程, 叶亚峰, 马伯军, 刘斌美, 陈析丰. 水稻类病变突变体 *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.
Yu Y, Wang Z Y, Zhou S R, Liu P C, Ye Y F, Ma B J, Liu B M, Chen X F. Phenotypic identification and disease resistance mechanism analysis of rice lesion mutant *lms1*[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2024, 50(4): 857-870. (in Chinese with English abstract)

[14] 王小虎. 水稻类病变早衰基因 *LMES3* 和 L*MES4* 的克隆与功能研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
Wang X H. Map-based cloning and function analysis of two lesion mimic and early senescence gene *LMES3* and *LMES4* in rice[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2018. (in Chinese with English abstract)

[15] Quirino B F, Reiter W D, Amasino R D. One of two tandem *Arabidopsis* genes homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated[J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 46(4): 447-457.

[16] Kumar D, Yusuf M A, Singh P, Sardar M, Sarin N B. Histochemical detection of superoxide and H_2O_2 accumulation in *Brassica juncea* seedlings[J]. *Bio-protocol*, 2014, 4(8): 1108-1111.

[17] Thordal-Christensen H, Zhang Z G, Wei Y D, Collinge D B. Subcellular localization of H_2O_2 in plants: H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction[J]. *Plant Journal*, 1997, 11: 1187-1194.

[18] 甘婷. 水稻类病斑突变体 *spl30* 的表型鉴定与基因功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
Gan T. Phenotypic characterization and gene function analysis of a lesion mimic mutant *spl30* in rice[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014. (in Chinese with English abstract)

[19] 赵晨晨, 黄福灯, 龚盼, 杨茜, 程方民, 潘刚. 水稻叶片早衰突变体 *osled* 的生理特征与基因定位[J]. 作物学报, 2014, 40(11): 1946-1955.
Zhao C C, Huang F D, Gong P, Yang X, Cheng F M, Pan G. Physiological characteristics and gene mapping of a leaf early senescence mutant *osled* in rice[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40(11): 1946-1955. (in Chinese with English abstract)

[20] 陈析丰, 刘亚萍, 马伯军. 图位克隆技术新型遗传学实验教学项目的设计与实践[J]. 植物学报, 2019, 54(6): 797-803.
Chen X F, Liu Y P, Ma B J. Design and practice of a new teaching project of the map-based cloning experiment in genetics[J]. *Bulletin of Botany*, 2019, 54(6): 797-803. (in Chinese with English abstract)

[21] Sasaki T. The map-based sequence of the rice genome[J]. *Nature*, 2005, 436(7052): 793-800.

[22] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA 7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.

[23] Danon A, Miersch O, Felix G, Camp R G L, Apel K. Concurrent activation of cell death-regulating signaling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Journal*, 2005, 41(1): 68-80.

[24] 凌凤珠. 柠檬酸转运蛋白和柠檬酸裂解酶对高山被孢霉脂质积累的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
Ling F Z. Role of citrate carrier and ATP citrate lyase on lipid accumulation in *Mortierella alpina*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021. (in Chinese with English abstract)

[25] Ruan B, Hua Z H, Zhao J,Zhang B, Ren D Y, Liu C L, Yang S L, Zhang A P, Jiang H Z, Yu H P, Hu J, Zhu L, Chen G, Shen L, Dong G J, Zhang G H, Zeng D L, Guo L B, Qian Q, Gao Z Y. OsACL-A2 negatively regulates cell death and disease resistance in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(7): 1344-1356.

[26] Desikan R, Neill S J, Hancock J T. Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 28(5): 773-778.

[27] 李长宁, 农倩, 谭秦亮, Srivastava M K, 杨丽涛, 李杨瑞. 甘蔗 ATP 柠檬酸裂解酶基因的克隆与表达分析[J]. 作物学报, 2012, 38(11): 2024-2033.
Li C N, Nong Q, Tan Q L, Srivastava M K, Yang L T, Li Y R. Cloning and expression analysis of ATP-citrate lyase genes from sugarcane[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2012, 38(11): 2024-2033. (in Chinese with English abstract)

[28] Fatland B L, Ke J, Anderson M D, Mentzen W I, Cui L W, Allred C C, Johnston J L, Nikolau B J, Wurtele E S. Molecular characterization of a heteromeric ATP-citrate lyase that generates cytosolic acetyl-coenzyme a in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130: 740-756.

[29] Liu F J, Ma Z F, Cai S, Dai L J, Gao J B, Zhou B L. ATP-citrate lyase B (ACLB) negatively affects cell death and resistance to Verticillium wilt[J]. *BMC Plant Biology,* 2022*,* 22: 443.

[30] 郭玲霞. 柑橘 ATP 柠檬酸裂解酶(ACL)在柠檬酸和相关物质积累中的作用及其机制和影响因素研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
Guo L X. Studying the role of citrus ATP-citrate lyase (ACL) in the accumulation of citrate and its relative metabolites, as well as ACL action mechanism and ACL-affecting factors[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020. (in Chinese with English abstract)

[31] 马芝凤. 沉默 ATP-柠檬酸裂解酶基因(*ACLB-2*)引起棉花细胞程序性死亡的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2021.
Ma Z F. Silencing of ATP-citrate lyase gene (*ACLB-2*) leads to programmed cell death in cotton[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021. (in Chinese with English abstract)

[32] 熊振民, 孔繁林. 大粒型水稻品种的遗传动态及其选育[J]. 浙江农业科学, 1976(2): 26-29.
Xiong Z M, Kong F L. Genetic dynamics and breeding of large-grain rice varieties[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 1976(2): 26-29. (in Chinese with English abstract)