

小麦类病斑突变体 *lm452* 的生理和遗传特性分析

温晓兰^{1,2}, 胡人月³, 张博文¹, 姚丹妤¹, 彭文涛¹, 万小能¹, 王秀媛¹, 袁军海³, 刘小粉², 孙果忠¹

(¹中国农业科学院作物科学研究所 / 作物分子育种国家工程研究中心, 北京 100081; ²河北工程大学园林与生态工程学院, 邯郸 056000;

³河北北方学院农林科技学院, 张家口 075000)

摘要: 在小麦品种西农 1376 与克早 21 构建的近等基因系中发现一个自然突变的类病斑家系 *lm452*。本研究对 *lm452* 的类病斑发生进程、生理生化特性、农艺性状、遗传分离规律等进行了研究。结果表明, 类病斑最先发生于第一叶, 颜色由白色渐变至黄褐色, 呈条纹斑块状; 类病斑数量随着植株生长发育进程逐渐增加, 可蔓延至叶鞘。类病斑的发生受温度和光照影响, 遮光可以避免或减轻类病斑的发生; 低温和强光可加重类病斑发生。生理生化分析表明类病斑的形成伴随着超氧化物产生、可溶性蛋白质含量降低和细胞活性降低; 突变体 *lm452* 的千粒重在田间和温室环境条件下均较表型正常姊妹系 g451 极显著降低。遗传分析表明 *lm452* 的类病斑性状受单个隐性核基因控制。上述结果为 *lm452* 类病斑基因的克隆和分子调控网络机制解析奠定了基础。

关键词: 小麦; 类病斑突变体; 生理生化特性; 农艺性状; 遗传分析

Physiological and Genetic Analysis of a Wheat Lesion Mimic Mutant *lm452*

WEN Xiao-lan^{1,2}, HU Ren-yue³, ZHANG Bo-wen¹, YAO Dan-yu¹, PENG Wen-tao¹, WAN Xiao-neng¹,

WANG Xiu-yuan¹, YUAN Jun-hai³, LIU Xiao-fen², SUN Guo-zhong¹

(¹Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Engineering Research Center for Crop Molecular Breeding, Beijing 100081; ²College of Landscape and Ecological Engineering, Engineering University of Hebei, Handan 056000;

³College of Agriculture and Forestry Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

Abstract: A naturally-occurring lesion mimic mutant *lm452* was identified in the progeny of the near isogenic lines derived from Xinong1376 × Kehan21. This study analyzed the development, physiological-biochemical characteristics, agronomic traits, and inheritance of lesion mimic phenotype in *lm452*. The lesions were initially visualized in the first leaf, with the color from white to tan, with striped and patchy appearance. With the development of plants, the number of lesions gradually increased from leaf to sheath. The lesions seem temperature/light sensitive, since leaves shaded can avoid or reduce their occurrences, and low temperature and strong light can enhance the occurrence. Gained from the results of physiological and chemical assays, the lesions were associated with burst of reactive oxygen species (ROS), and reduction on soluble protein content and cellular viability. The 1000-kernel weight of *lm452* was significantly lower than that of its sister line g451 under either field or greenhouse conditions. Genetic analysis showed that the lesion mimic trait of *lm452* was controlled by a single recessive nuclear gene. Collectively, these results provided the foundation for isolation of the target gene

收稿日期: 2023-01-18 修回日期: 2023-02-23 网络出版日期: 2023-03-23

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230118002>

第一作者研究方向为小麦遗传育种, E-mail: wxl992021@163.com

通信作者: 孙果忠, 研究方向为小麦遗传育种, E-mail: sunguozhong@caas.cn

刘小粉, 研究方向为作物抗逆性研究, E-mail: liuxiaofenok@126.com

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFD12006); 财政部和农业农村部现代农业技术体系专项(CARS-03); 国家作物育种重大科研联合攻关(19220063); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ZDRW202002)

Foundation projects: National Key R & D Program of China (2021YFD12006); China Agriculture Research System of MOF and MARA(CARS-03); National Major Joint Efforts for Improving Crop Varieties (19220063); Agricultural Science and Technology Innovation Program of CAAS (CAAS-ZDRW202002)

and deciphering its molecular mechanism in future.

Key words: wheat; lesion mimic mutant; physiological-biochemical characteristics; agronomic traits; genetic analysis

植物遭受病原体侵染时会诱发程序性细胞死亡(PCD, programmed cell death), 以阻止病原体进一步入侵邻近细胞。在没有任何逆境、机械损伤或病原菌侵染的情况下, 叶片呈现类似病原菌侵染的坏死斑的植株称为类病斑突变体(LMM, lesion mimic mutant)^[1]。与病原菌侵染造成的病斑不同, 类病斑由植株本身的基因控制自发产生^[2]。

目前, 在小麦^[3-4]、水稻^[5]、拟南芥^[6]、玉米^[7]和大麦^[8]等作物中均发现类病斑突变体。自2001年Nair等^[3]首次报道小麦类病斑突变体 *M66* 以来, 陆续有 *LF2010*^[9]、*C591(M8)*^[10]、*AIM9*^[11]、*HLP*^[12]、*Ning 7840*^[13]、*lm3*^[14]、*I30*^[4]等类病斑突变体被报道。由于小麦基因组庞大且六倍体小麦同源染色体间存在复杂的互作, 造成小麦基因功能研究进程缓慢且周期较长^[15], 对类病斑的研究大多停留在表型和基因定位阶段, 在类病斑基因克隆和生理生化调控机理方面缺乏深入研究。

在农艺性状上, 类病斑主要发生在突变体的叶片, 不仅影响植株光合作用, 也影响与产量相关的株高、穗粒数、千粒重等农艺性状。类病斑对上述性状的影响程度与类病斑发生时间和扩散面积有关, 一般病斑出现时间早和扩散面积大的突变体产量性状受影响明显。水稻斑点叶突变体 *spl24* 的株高、穗长、穗粒数和千粒重均显著低于野生型^[16]; *wlm11* 突变体的株高和粒重相比于野生型在成熟生长阶段显著降低^[17]; *lmm6* 突变体的籽粒较野生型变短、变窄^[18]。小麦类病斑突变体 *I30* 在苗期出现条状白斑且伴随整个生育期, 单株产量和千粒重较野生型显著下降^[4]; 突变体 *C591(M8)* 在孕穗期才开始出现黄色斑点, 与野生型的单穗重无显著差异^[10]; 而白斑突变体 *HLP* 的株高和产量性状与野生型无差异^[12]。

在遗传机制上, 已报道的类病斑基因包括隐性核基因、显性核基因、半显性核基因等3种类型。小麦类病斑大多为单个隐性核基因控制, 如在三叶期出现黄色斑点的突变体 *LF2010*^[9], 在抽穗期叶片发生坏死斑的突变体 *AIM9*^[11], 以及抽穗期表现黄色斑点的 *Ning7840*^[13]。小麦类病斑突变体 *lm3* 受半显性基因控制, 且发生病斑的叶片伴有活性氧(ROS, reactive oxygen species)的异常积

累^[14]; 而 *C591(M8)* 突变体由显性单基因控制^[10]。

在环境因素上, 温度、光照、湿度等环境因素均可影响类病斑的发生。小麦突变体 *LF2010* 在遮光或低温条件下斑点产生较少^[9]; 遮光处理、短日照和低光强均会抑制突变体 *lm3* 的类病斑形成^[14]; 类病斑基因 *lm1* 和 *lm2* 控制的突变体在遮光条件下叶片无类病斑, 恢复光照后类病斑出现^[19]。降低湿度可加速拟南芥突变体 *cpn1* 上的病斑发生^[20]。

在生理生化机制上, 类病斑的发生常伴随ROS的升高。正常含量的ROS被认为是细胞内信号级联的次级信使, 介导植物细胞内多种反应, 包括叶表皮细胞的气孔关闭^[21]、程序性细胞死亡^[22]、根向重性^[23]、抗坏血酸产生^[24]以及植物的抗逆性^[1]。ROS的过度积累会破坏植物细胞的脂膜^[25]。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)等负责调控细胞内的ROS处于正常水平^[26]。ROS清除系统异常时, 便会使细胞内ROS爆发, 造成局部组织坏死呈病斑状。水稻 *noel* 突变体内编码过氧化氢酶的基因发生突变, 导致过氧化氢清除系统紊乱, 植物组织内过氧化氢过度积累, 在硝酸盐还原酶催化下产生大量一氧化氮(NO), 最终导致类病斑发生^[27]。

类病斑突变体是研究植物光合作用、叶片衰老、植物抗病防卫机制、细胞程序性死亡等相关机制的理想材料^[28]。在前期研究中, 本课题组在小麦品种西农1376与克旱21构建的近等基因系中发现1个自然突变的类病斑家系 *lm452*。本研究旨在分析 *lm452* 的类病斑发生进程、农艺性状、生理生化特性和遗传分离规律, 以期为进一步克隆目的基因和解析类病斑发生的分子机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用的小麦类病斑突变体 *lm452* 来源于西农1376(轮回亲本)与克旱21(供体亲本)构建的BC₇F₃近等基因系的分离后代, 此后田间连续6年自交繁殖, 类病斑性状均能稳定遗传。正常表型材料 g451 为 *lm452* 的姊妹系, 二者系谱编号分别为 KHD-BC₇F₃-8-3-1 和 KHD-BC₇F₃-8-3-2。配制 *lm452* 与 g451 的正反杂交组合, 收获的 F₁、F₂ 和 F_{2:3}

代种子用于遗传分析。

1.2 试验方法

1.2.1 不同光温环境下的类病斑表型观察 先将 *lm452* 的种子在室温浸泡 12 h, 然后转移至含双层湿润滤纸的培养皿中, 在 4 °C 冰箱中处理 3 d 以使种子萌发均一。将露白种子播种于直径 14.5 cm 的花盆, 1 株/盆, 将花盆放置在培养箱中。为比较光照强度对类病斑发生的影响, 在光照 14 h、温度 22 °C, 黑暗 10 h、温度 15 °C, 相对湿度 85% 的统一培养条件下, 将光照强度设置 3 个梯度, LED 灯光强的光合光子通量密度 (PPFD, photosynthetic photon flux density) 分别为 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、350 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、600 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ (MK350S 光谱仪, 台湾), 每种光强条件处理 9 株, 各 3 个重复。在三叶期时比较第 1 和第 2 片叶的类病斑发生情况。由于 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照下类病斑面积小, 而 600 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照下类病斑扩散程度大, 均不易观察, 因此, 选择 350 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照强度处理下, 在出苗后观察类病斑的发生和形成过程, 包括病斑发生部位、时期、颜色和形状等; 并在第 3 片叶生长至长 5~8 cm 且未出现类病斑时, 选 5 株用锡箔纸遮住第 3 片叶大部分, 以比较遮光是否影响类病斑发生。

为比较温度高低对类病斑发生的影响, 在光强 350 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光照 14 h, 黑暗 10 h, 相对湿度 85% 的培养条件下, 设置 3 个温度梯度, 分别为光照 15 °C/黑暗 8 °C, 光照 22 °C/黑暗 15 °C, 光照 29 °C/黑暗 22 °C, 每种温度条件处理 9 株, 各 3 个重复。在三叶期时, 比较第 1 和第 2 片叶的类病斑发生情况。

1.2.2 农艺性状测量 2021 年秋季将 *g451* 和 *lm452* 种植在中国农业科学院作物科学研究所北京东圃场试验田 (39°58' 18.75"N, 116°20' 28.64"E), 行长 1 m, 行距 25 cm, 株距 5 cm, 共 2 行。为保证安全越冬, 上述材料在冬季覆膜, 并在返青后揭开。调查株高、有效分蘖数、穗长、穗粒数、千粒重等指标, 有效分蘖的标准为结实粒数不少于 5 个。各个发育时期的判断依照 Zadoks 等^[29]。为比较不同生长环境下类病斑对小麦农艺性状的影响, 2022 年秋季将 *lm452* 和 *g451* 种植在温室。将露白种子播种于直径 20 cm 的花盆, 6 株/盆, 共 10 盆, 自然光照加补充人工钠灯照明 14 h、温度控制在 15~25 °C。分别选 10 株, 调查株高、有效分蘖数、穗长、千粒重、穗粒数等指标。利用 Excel 2019 和 SPSS 26.0 进行数据统计和 *t* 检验分析。

1.2.3 组织化学染色 *g451* 和 *lm452* 分别种植 27 株,

种植方法同 1.2.1, 培养条件为 350 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照 14 h、温度 22 °C; 黑暗 10 h, 温度 15 °C, 相对湿度 85%。幼苗生长到三叶期时, 在第 2 叶上剪取长 3.5 cm 出现类病斑症状的叶片, 放入 2 mL EP 管中, 以 *g451* 叶片的相应位置为对照, 各 3 个重复。二氨基联苯胺 (DAB) 染色方法参照试剂盒说明书 (百瑞极生物科技有限公司, 北京)。首先加入 1.5 mL DAB 染色液, 在 4 °C 避光条件下染色 8 h; 吸出 DAB 染液, 加入脱色液 (乙醇和甘油按体积比 9:1 配制), 放置在摇床上混匀 2 h, 每隔 30 min 更换一次脱色液, 至反应结束。伊文思蓝染色方法参考 Baker 等^[30], 略有改动, 将叶片在 1.6 mL 的 0.25% (W/V) 伊文思蓝溶液中染色 24 h, 脱色方式同上。

1.2.4 生理指标测定 试验材料和取样方法同 1.2.3。分别取 0.1 g 的 *g451* 和 *lm452* 叶片, 将样品放入 2 mL 离心管中, 液氮冷却后, 用组织研磨机粉碎。按质量体积比 1:9 向离心管中加入 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.2), 漩涡振荡 2 min; 3500 r/min 离心 10 min, 取上清待测。参照丙二醛 (MDA) 含量、过氧化氢 (H_2O_2) 含量、过氧化氢酶 (CAT) 活性和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定试剂盒 (建成生物工程研究所, 南京), 以及可溶性蛋白含量 (SP) 测定试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, 上海) 的说明书进行操作; 每个生理指标均为 3 个生物学重复。利用 Excel 2019 和 SPSS 26.0 进行数据统计和 *t* 检验分析。

1.2.5 类病斑遗传分析 将 *lm452* 与 *g451* 杂交的 F_1 、 F_2 和 $F_{2:3}$ 家系种植在育苗盘中。种植方法同 1.2.1, 培养条件同 1.2.3。在三叶期调查单株的类病斑表型, 统计 F_2 和 $F_{2:3}$ 家系正常植株与类病斑植株的分离比, 利用 SPSS 26.0 进行卡方检验分析。

2 结果与分析

2.1 类病斑的发生过程及形态特征

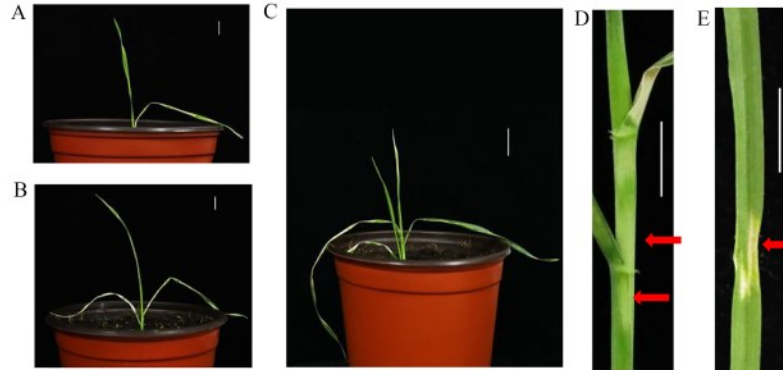
lm452 的类病斑发生受环境条件诱导。在培养箱生长条件下, 类病斑最先发生于二叶期时的第一片叶, 且位置不固定 (图 1A); 同一叶片的不同位置上均可出现 (图 1B、C)。发病部位最初呈现萎蔫水渍状, 逐渐变为白色、黄褐色, 直至干枯; 发生的数量随着植株的生长而不断增加, 由叶片逐渐蔓延至叶鞘 (图 1D)。病斑形状不规则, 沿叶脉扩展, 多呈条纹斑块状, 长度约为 0.5~3.5 cm (图 1E)。

2.2 光照和温度对类病斑形成的影响

lm452 类病斑的发生速度和严重度受光照和温度影响。对相同发育阶段的叶片进行遮光与未

遮光处理, 遮光部位的叶片呈黄绿色无类病斑发生, 而未遮光的叶片则发生类病斑。表明遮光可以避免或减弱类病斑的发生(图2A)。在不同光照强度生长条件下, 类病斑的发生面积和速度随

着光强的增加而增加, 在 $600 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照下发生最严重(图2B)。在不同温度区间下, 类病斑的发生面积和速度随着温度的增加而降低, 在 $15^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$ 温度区间发生最严重(图2C)。



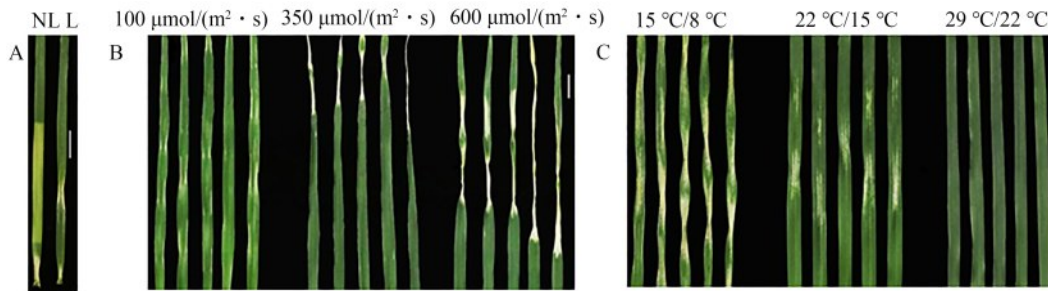
A: 二叶期; B: 三叶期; C: 分蘖期, 比例尺=2 cm; D: 叶鞘, 箭头所指为叶鞘上发生的类病斑; E: 叶片, 箭头所指为叶片上发生的类病斑。

A、B、D和E的比例尺=1 cm

A: Two-leaf stage; B: Three-leaf stage; C: Tillering stage, scale bar=2 cm; D: Leaf sheath, the arrows point to the lesion mimic phenotype that occurs on the *lm452* leaf sheath; E: Leaf, the arrows point to the lesion mimic phenotype that occurs on the *lm452* leaves. The scale bar in A, B, D and E is 1 cm

图1 *lm452* 的类病斑发展过程和形态特征

Fig.1 Development and morphological characteristics of lesion in *lm452*



A: 遮光(NL)和光照(L); B: 3种光照强度; C: 3种温度区间; 比例尺=1 cm

A: Shading (NL, no light) and light (L) treatment; B: Three light intensities; C: Three temperature regimes; Scale bar=1 cm

图2 光照和温度对 *lm452* 类病斑发展的影响

Fig.2 Effect of light and temperature on the development of lesion mimic in *lm452*

2.3 类病斑对农艺性状的影响

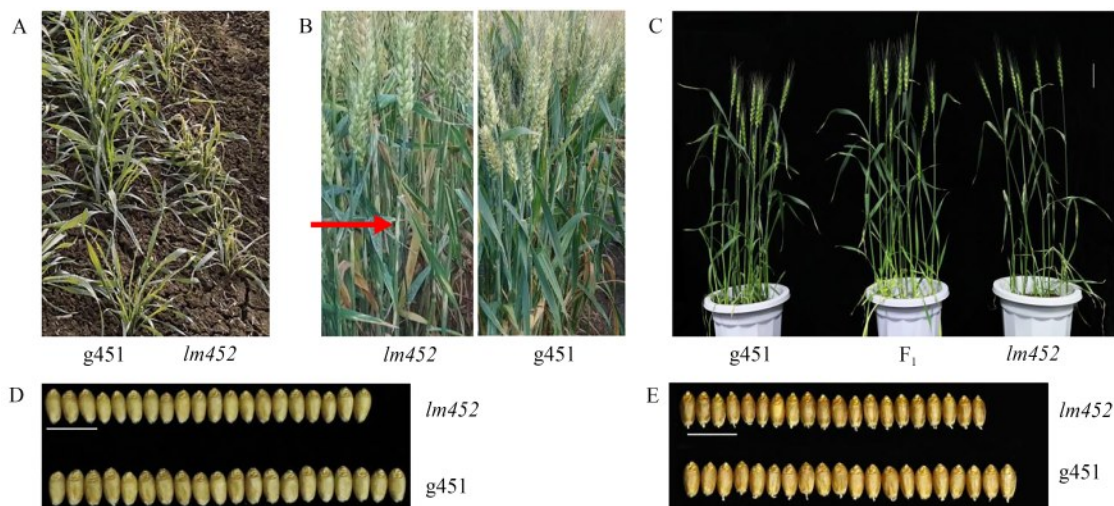
在田间条件下, *lm452* 因苗期叶片出现类病斑, 冬季抗寒性较 *g451* 差(图3A), 需要覆膜才能安全越冬, 返青后揭开。随着植株的发育, 类病斑可蔓延至叶鞘上(图3B); 类病斑损坏叶片和叶鞘组织, 间接影响叶片光合作用, 造成 *lm452* 的千粒重较 *g451* 低 12.50%, 差异达极显著水平(图3D, 表1); *lm452* 的株高、单株有效分蘖数较 *g451* 增加, 差异显著; 而穗长和穗粒数与 *g451* 相似, 差异不显著(表1)。

在温室条件下, *lm452* 单株有效分蘖数、穗长、千粒重、穗粒数分别较 *g451* 降低 50.00%、15.75%、15.59%、34.92%, 差异均达极显著水平(图3C、E,

表1)。*lm452* 的上述性状在温室条件下受到的影响明显高于试验田, 这可能与温室条件下光照强度较田间低, 植株发育健壮程度较弱有关。

2.4 遗传分析

类病斑突变体 *lm452* 和正常表型姊妹系 *g451* 的 F_1 后代表现正常, 未出现类病斑(图4)。 F_2 出现性状分离, 在 465 个 F_2 单株中, 355 株表型正常, 110 株出现类病斑, 正常植株与类病斑植株的分离比经卡方检验符合 3:1 ($P=0.503$); 在 100 个 $F_{2:3}$ 家系中, 28 个家系均为纯合表型正常单株, 51 个家系发生性状分离, 21 个家系均为纯合类病斑单株, 符合 1:2:1 的分离比(表2)。上述结果表明, *lm452* 的类病斑性状受单个隐性核基因控制。



A: 田间分蘖期; B: 田间灌浆期, 箭头所指为 *lm452* 叶鞘上发生的类病斑; C: 温室灌浆期, 比例尺=5 cm; D: 田间收获籽粒, 比例尺=1 cm; E: 温室收获籽粒, 比例尺=1 cm

A: Tillering stage in field; B: Grain filling stage in field, the arrows point to lesion mimic that occur on *lm452* sheath; C: Grain filling stage in greenhouse, scale bar=5 cm; D: Grains harvested from fields, scale bar=1 cm; E: Grains harvested from greenhouse, scale bar=1 cm

图3 *lm452* 和 *g451* 在田间和温室的生长情况

Fig.3 Growth of *lm452* and *g451* in fields and greenhouse

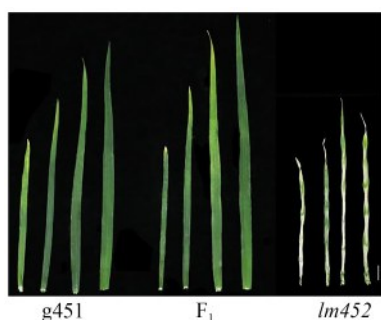
表1 *lm452* 和 *g451* 在田间和温室的农艺性状

Table 1 Agronomic traits of *lm452* and *g451* in fields and greenhouse

环境	材料	株高(cm)	有效分蘖数	穗长(cm)	千粒重(g)	穗粒数
Environment	Materials	Plant height	Spike number per plant	Spike length	1000-kernel weight	Kernel number per spike
田间	<i>lm452</i>	59.2±0.5*	9.0±0.2*	10.5±0.2	41.60±1.10**	33.2±7.09
Fields	<i>g451</i>	57.0±0.8	8.0±0.4	10.0±0.2	47.60±0.80	32.8±2.78
温室	<i>lm452</i>	52.6±0.60**	1.0±0**	6.74±0.05**	34.64±0.61**	16.4±1.95**
Green house	<i>g451</i>	49.5±1.69	2.0±0.45	8.00±0.39	41.04±1.80	25.2±0.84

数据为平均值±标准差; *表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著, **表示在 $P<0.01$ 水平上差异显著, 下同

Data are means ± SD; * indicates a significant difference at the $P<0.05$ level, and ** indicates a significant difference at the $P<0.01$ level, the same as below



从左至右依次为幼苗的第1、第2、第3和第4叶, 标尺=1 cm
The order from left to right is the first, second, third and fourth leaf of the seedlings, scale bar=1 cm

图4 五叶期突变体 *lm452*、姊妹系 *g451* 和 F_1 的叶片

Fig.4 Leaves of mutant *lm452*, sister line *g451* and F_1 at fifth-leaf stage

2.5 突变体组织化学特性

过氧化物酶可催化过氧化氢分解产生氧气, 与二氨基联苯胺(DAB)作用后形成棕黄色沉淀, 从而定位过氧化物酶的活性部位。 *lm452* 叶片经 DAB

染色后, 发生类病斑的部位呈棕褐色, 未发生类病斑的部位与 *g451* 叶片均为白色或浅黄色(图 5A)。伊文思蓝能够渗透到受损细胞内, 并与胞内蛋白结合使其染色, 常用于检测细胞的活性。 *lm452* 叶片经伊文思蓝染色后, 发生类病斑的部位被染成蓝色; 未发生类病斑的部位和 *g451* 叶片均为白色或浅蓝色(图 5B)。上述结果表明, *lm452* 的类病斑部位发生了细胞死亡且伴有过氧化物的积累。

2.6 生理指标分析

在植物细胞内存在活性氧(ROS)清除酶系统将 ROS 含量稳定在正常水平。 ROS 过度积累会损害细胞结构, 引发细胞程序性死亡, 诱导 ROS 清除酶表达上调。 *lm452* 的过氧化氢酶(CAT)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量、过氧化氢(H_2O_2)含量均较 *g451* 显著增加, 增幅分别达 47.57%、62.09%、113.17% 和 29.23%; 其中, CAT 和 SOD 活性增加均达极显著水平 ($P=1\times 10^{-3}$,

$P=5.4 \times 10^{-4}$)。 *lm452* 的可溶性蛋白含量较 *g451* 降低 43.77%, 差异显著 (图 6)。上述结果表明, *lm452*

发生类病斑的部位存在活性氧增加, 活性氧清除酶活性增强和可溶性蛋白质含量降低的现象。

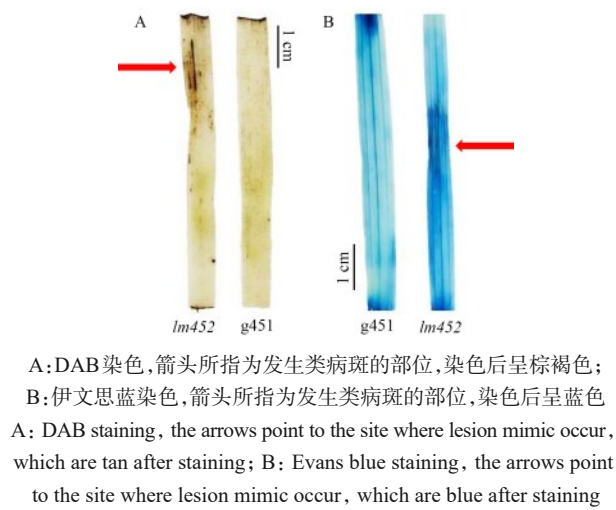
表 2 *lm452* 与 *g451* 杂交后代的性状分离情况

Table 2 Segregation of hybrid offspring between *lm452* and *g451*

编号 Number	总株数 Total plants	正常株数 Normal plants	分离株数 Separation plants	类病斑株数 Lesion mimic plants	分离比 Separation ratio	χ^2	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
<i>g451</i>	49	49					
<i>lm452</i>	51	0		51			
<i>g451/lm452</i> F ₁	10	10					
<i>lm452/g451</i> F ₁	10	10					
F ₂	465	355		110	3.2:1	0.448(3:1)	0.503
F _{2,3}	100	28	51	21	1.1:2:0.82	1(1:2:1)	0.6

χ^2 列的值为期望分离比的 χ^2 值, 括号内数据为期望分离比

The value of χ^2 columns is the χ^2 of expected separation ratio, the data in parentheses is expected separation ratio



A: DAB染色, 箭头所指为发生类病斑的部位, 染色后呈棕褐色;
B: 伊文思蓝染色, 箭头所指为发生类病斑的部位, 染色后呈蓝色

A: DAB staining, the arrows point to the site where lesion mimic occur, which are tan after staining; B: Evans blue staining, the arrows point to the site where lesion mimic occur, which are blue after staining

图 5 *lm452* 和 *g451* 的组织化学染色

Fig.5 Histochemical stainings of *lm452* and *g451*

3 讨论

根据类病斑突变体的表型特征及其与细胞程序性死亡的关系, 可将突变体分为细胞程序

性死亡的抑制途径和激发途径两种类型。抑制途径所产生的突变体表现为类病斑突变体植株上的某一细胞一旦产生坏死, 便迅速扩散到整个植株^[30]。激发途径所产生的突变体的特点为细胞坏死随机自发地产生在植株的叶片、茎和叶鞘等部位^[31]。本研究类病斑突变体 *lm452* 的类病斑随机地出现在叶片和叶鞘上, 呈现激发途径的特征, 与李倩倩等^[4]报道的白斑突变体 *I30* 相似。

植物的生长发育受光照和温度等环境因素调控^[32]。本研究的 *lm452* 类病斑发生受光照诱导, 强光和低温可加重发病程度。目前在小麦、水稻、拟南芥等植物中鉴定到的类病斑均受环境的影响^[14, 28, 33]。小麦突变体 *lm3* 类病斑的产生受光照的诱导, 光照强度对类病斑的形成具有调节作用^[14]; 而在较低的光强条件下, 温度的改变不会影响水稻 *spl1* 突变体斑点或坏死的产生^[34]。因此, 类病斑的发生受光照、温度等单个环境因子或多个环境因素的互作影响。

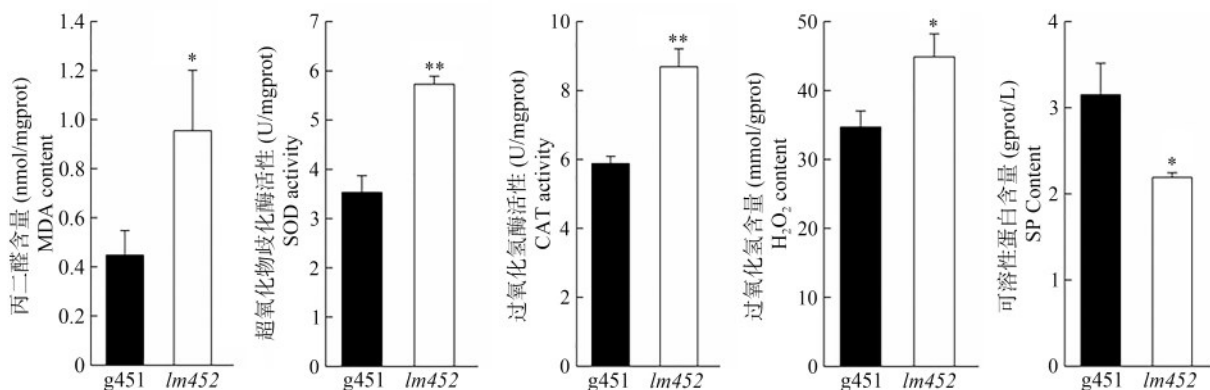


图 6 突变体 *lm452* 与姊妹系 *g451* 的过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、丙二醛、过氧化氢和可溶性蛋白含量

Fig.6 Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H₂O₂) and soluble protein (SP) between mutant *lm452* and sister line *g451*

与叶绿素生物合成相关的关键酶活性改变可能会产生颜色变异的突变^[35]。在作物中已发现白色^[12](*HLP*)、橙黄色(*spl1*)^[34]、红色^[36](*spl5*)、褐色^[2,37](*OsLSD1*、*spl18*)、棕黄色^[38](*spl32*)等颜色的类病斑。本研究中的 *lm452* 类病斑最初呈现白色,随着坏死程度的加深而逐渐变为黄褐色,最终干枯。*lm452* 的叶绿素合成相关酶是否受到破坏,有待进一步研究。叶绿体是植物的“能量工厂”,叶片类病斑的发生造成叶绿体光合色素含量下降,影响正常的光合作用。在影响产量的“源、库、流”三要素中,类病斑会造成“源”不足,使得流到“库”里的能量和物质减少,可能是造成千粒重降低的原因。*lm452* 的千粒重显著低于姊妹系 *g451*,已报道的类病斑突变体也普遍存在千粒重降低的现象。在类病斑发生严重的突变体 *LF2010*^[9]中,会显著影响株高、穗长、穗粒数、有效分蘖数、结实率、千粒重等大部分农艺性状;而发生程度较轻的类病斑突变体 *I30*^[4],其株高、穗长、穗粒数、有效分蘖数、结实率等农艺性状几乎不受影响或影响轻微,但是千粒重降低显著。

本研究中,*lm452* 较 *g451* 的过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)、过氧化氢(H₂O₂)含量都显著增加,而可溶性蛋白(SP)含量降低,表明类病斑的发生伴随着超氧化物产生和细胞活性降低。上述生理生化现象在植物类病斑的发生过程中十分普遍。在小麦类病斑突变体 *I30*^[36]、水稻类病斑突变体 *spl-1*^[34]等作物中均存在 SOD 活性、CAT 活性、MDA 含量升高,SP 减少的现象。类病斑通常伴随植物体内发生细胞程序性死亡反应,免疫系统被激活,植株的抗病性增强^[28];但本研究中的突变体 *lm452* 与 *g451* 在温室条件下对白粉病均表现高感。

本研究中的 *lm452* 类病斑性状受单个隐性核基因控制。目前已经报道的小麦类病斑突变体均由核基因控制。其中,*Lm3*^[14]、*Lm4*^[39]、*Lm5*^[40]、*TaSpl1*^[33]、*HLP*^[12]是显性基因控制,*lm*^[41]、*lm1*^[19]、*lm2*^[19]是隐性基因控制。上述基因控制的类病斑性状均与光照密切相关,由于小麦的类病斑基因尚未克隆,这些基因的功能和调控通路还不清楚。因而,克隆 *lm452* 的类病斑基因对解析类病斑形成的分子机制具有重要意义。

参考文献

[1] Kang S G, Lee K E, Singh M, Kumar P, Matin M N. Rice

lesion mimic mutants (LMM): The current understanding of genetic mutations in the failure of ROS scavenging during lesion formation. *Plants*, 2021, 10 (8): 1598

- [2] Wang L J, Pei Z Y, Tian Y C, He C Z. OsLSD1, a rice zinc finger protein, regulates programmed cell death and callus differentiation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18 (5): 375-384
- [3] Nair S K, Tomar S M S. Genetical and anatomical analyses of a leaf flecking mutant in *Triticum aestivum* L. *Euphytica*, 2001, 121 (1): 53-58
- [4] 李倩倩,赵秋实,蒋宏宝,耿皆飞,刘录祥,张晓燕,谢彦周,王成社. 小麦白斑突变体 *I30* 的特征特性及遗传分析. *麦类作物学报*, 2017, 37 (7): 871-879
- Li Q Q, Zhao Q S, Jiang H B, Geng J F, Liu L X, Zhang X Y, Xie Y Z, Wang C S. Characteristics and genetic analysis of wheat white spot mutant *I30*. *Journal of Triticeae Crops*, 2017, 37 (7): 871-879
- [5] Fitzgerald H A, Chern M S, Navarre R, Ronald P C. Overexpression of (At) NPR1 in rice leads to a BTH-and environment-induced lesion-mimic/cell death phenotype. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 2004, 17 (2): 140-151
- [6] Michela L, Alessandra D F, Silvia B, Massimo D, Alberto F, Luca V, Roberto P, Monica B, Chiara T. A mutation in the FZL gene of Arabidopsis causing alteration in chloroplast morphology results in a lesion mimic phenotype. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64 (14): 4313-4328
- [7] Hornbrook A R, Gardner C O. Genetic study of 'Necrotic Leaf Spot' mutation induced in an inbred line of maize (*Zea mays* L.) by thermal neutron irradiation of seed. *Radiation Botany*, 1970, 10 (2): 113-117
- [8] Wolter M, Hollricher K, Salamini F, Schulze L P. The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype. *Molecular and General Genetics*, 1993, 239 (1): 122-128
- [9] 杜丽芬,李明飞,刘录祥,王超杰,刘洋,许喜堂,邹淑芳,谢彦周,王成社. 一个化学诱变的小麦斑叶突变体的生理和遗传分析. *作物学报*, 2014, 40(6): 1020-1026
- Du L F, Li M F, Liu L X, Wang C J, Liu Y, Xu X T, Zou S F, Xie Y Z, Wang C S. Physiological characteristics and genetic analysis on a spotted-leaf wheat derived from chemical mutation. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40 (6): 1020-1026
- [10] Nair S K, Singh B, Tomar S M S. Inheritance and chromosomal location of flecking in a mutant *C591* (*M8*) of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2008, 68 (2): 108-112
- [11] Luo P G, Ren Z L. Wheat leaf chlorosis controlled by a single recessive gene. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2006, 32 (3): 330-338
- [12] Kamlofski C A, Antonelli E, Bender C, Jaskelioff M, Danna C H, Ugalde R, Acevedo A. A lesion-mimic mutant of wheat with enhanced resistance to leaf rust. *Plant Pathology*, 2007, 56 (1): 46-54

- [13] Li T, Bai G H. Lesion mimic associates with adult plant resistance to leaf rust infection in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 119 (1): 13-21
- [14] Wang F, Wu W Y, Wang D Z, Yang W L, Sun J Z, Liu D C, Zhang A M. 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 (5): 155358
- [15] Arumuganathan K, Earle E D. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Report*, 1991, 9: 208-218
- [16] Chen Z, Chen T, Sathe A P, He Y, Zhang X B, Wu J L. Identification of a novel semi-dominant spotted-leaf mutant with enhanced resistance to *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19 (12): 3766
- [17] Chen P, Hu H T, Zhang Y, Wang Z W, Dong G J, Cui Y T, Qian Q, Ren D Y, Guo L B. Genetic analysis and fine-mapping of a new rice mutant, white and lesion mimic leaf. *Plant Growth Regulation*, 2018, 85 (3): 425-435
- [18] Xiao G Q, Zhang H W, Lu X Y, Huang R F. Characterization and mapping of a novel light-dependent lesion mimic mutant *lmm6* in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Integrative Agriculture*, 2015, 14 (9): 1687-1696
- [19] Yao Q, Zhou R H, Fu T H, Wu W R, Zhu Z D, Li A L, Jia J Z. Characterization and mapping of complementary lesion-mimic genes *lm1* and *lm2* in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 119 (6): 1005-1012
- [20] Jambunathan N, Siani J M, McNellis T W. A humidity-sensitive arabidopsis copine mutant exhibits precocious cell death and increased disease resistance. *The Plant Cell*, 2001, 13 (10): 2225-2240
- [21] Kwak J M, Mori I C, Pei Z M, Leonhardt N, Torres M A, Dangel J L, Bloom R E, Bodde S, Jones J D, Schroeder J I. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, 2003, 22 (11): 2623-2633
- [22] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002, 7 (9): 405-410
- [23] Joo J H, Bae Y S, Lee J S. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology*, 2001, 126 (3): 1055-1060
- [24] Torres M A, Dangel J L, Jones J D G. *Arabidopsis* gp91^{phox} homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99 (1): 517-522
- [25] Asada K. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. Boca Raton: CRC Press, 2019: 77-104
- [26] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van B F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 2004, 9 (10): 490-498
- [27] Lin A H, Wang Y Q, Tang J Y, Xue P, Li C L, Liu L C, Hu B, Yang F Q, Loake G J, Chu C C. Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice. *Plant Physiology*, 2012, 158 (1): 451-464
- [28] 马建, 李聪, 田荣, 唐华苹, 兰秀锦, 姚琦馥. 主要植物类病斑突变体研究进展及其对小麦相关研究的启示. *四川农业大学学报*, 2022, 40 (5): 633-644
- Ma J, Li C, Tian R, Tang H P, Lan X J, Yao Q F. Research progress of lesion mimic mutants in main plants and its implication for wheat related studies. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2022, 40 (5): 633-644
- [29] Zadoks J C, Chang T T, Konzak C F. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 1974, 14 (6): 415-421
- [30] Baker J C, Mock N M. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1994, 39 (1): 7-12
- [31] Mittler R, Rizhsky L. Transgene-induced lesion mimic. *Plant Molecular Biology*, 2000, 44 (3): 335-344
- [32] 张自刚, 马小飞, 张红霞, 王震, 张思妮, 郭冬, 张永鹏, 马翎健. 小麦光温敏雄性不育系 BNS 育性转换与内源激素的关系研究. *植物遗传资源学报*, 2016, 17 (5): 913-919
- Zhang Z G, Ma X F, Zhang H X, Wang Z, Zhang S N, Guo D, Zhang Y P, Ma L J. Relationship between fertility transition of thermo-photo-sensitive wheat male sterile line BNS and endogenous hormone contents in its developing ear. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17 (5): 913-919
- [33] Greenberg J T, Silverman F P, Liang H. Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the arabidopsis mutant *acd5*. *Genetics*, 2000, 156 (1): 341-350
- [34] Liu G, Wang L, Zhou Z, Leung H, Wang G L, He C. Physical mapping of a rice lesion mimic gene, *Spl1*, to a 70-kb segment of rice chromosome 12. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, 272 (1): 108-115
- [35] 杨颜榕, 黄纤纤, 赵亚男, 汤佳玉, 刘喜. 水稻叶色基因克隆与分子机制研究进展. *植物遗传资源学报*, 2020, 21 (4): 794-803
- Yang Y R, Huang X X, Zhao Y N, Tang J Y, Liu X. Advances on gene isolation and molecular mechanism of rice leaf color genes. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21 (4): 794-803
- [36] 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. *Molecular Breeding*, 2012, 30 (2): 939-949
- [37] Mori M, Tomita C, Sugimoto K, Hasegawa M, Hayashi N, Dubouzet J G, 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 Molecular Biology*, 2007, 63 (6): 847-860
- [38] Sun L T, Wang Y H, Liu L L, Wang C M, Gan T, Zhang Z

- Y, Wang Y L, Wang D, Niu M, Long W H, Li X H, Zheng M, Jiang L, Wan J M. Isolation and characterization of a spotted leaf 32 mutant with early leaf senescence and enhanced defense response in rice. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 1-13
- [39] Liu R, Lu J, Zheng S G, Du M, Zhang C H, Wang M X, Li Y F, Xing J Y, Wu Y, Zhang L. Molecular mapping of a novel lesion mimic gene (*lm4*) associated with enhanced resistance to stripe rust in bread wheat. *BMC Genomic Data*, 2021, 22 (1): 1-9
- [40] Li C, Liu H, Wang J, Pan Q, Wang Y, Wu K Y, Jia P Y, Mu Y, Tang H P, Xu Q, Jiang Q T, Liu Y X, Qi P F, Zhang X J, Huang L, Chen G Y, Wang J R, Wei Y M, Zheng Y L, Gou L L, Yao Q F, Lan X J, Ma J. Characterization and fine mapping of a lesion mimic mutant (*Lm5*) with enhanced stripe rust and powdery mildew resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2022, 135 (2): 421-438
- [41] Li T, Bai G H. Lesion mimic associates with adult plant resistance to leaf rust infection in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 119 (1): 13-21