

小麦类病斑突变体 *lm452* 的生理和遗传特性分析

温晓兰^{1,2}, 姚丹妤¹, 胡人月³, 张博文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作物分子育种国家工程研究中心, 中国农业科学院作物科学研究所, 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 与克旱 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, 颜色由白色渐变为黄褐色, 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}, YAO Dan-yu¹, HU Ren-yue³, ZHANG Bo-wen¹, PENG Wen-tao¹, WAN Xiao-neng¹, WANG Xiu-yuan¹, YUAN Jun-hai³, LIU Xiao-fen², SUN Guo-zhong¹

(¹National Engineering Research Center for Crop Molecular Breeding, Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 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 iso-genetic lines derived from Xinong1376 x 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

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), 中国农业科学院创新工程(CAAS-ZDRW202002)

Foundation project: 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), the Agricultural Science and Technology Innovation Program (CAAS-ZDRW202002)

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 and deciphering its molecular mechanism in future.

Keywords: 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]。不同于病原菌在感染部位出现几天甚至几周的发病过程, 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。在小麦上, 自 2001 年 Nair 和 Tomar^[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, 而且也会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。在水稻上, 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]; *wlm1* 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]。在小麦上, 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、半显性核基因等三种类型。在小麦上, 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。在小麦上, 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]。在拟南芥上, 降低湿度可加速突变体 *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 在正常水平^[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。在水稻 *noe1* 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, 我们在小麦品种西农 1376 与克旱 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奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验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 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℃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,花盆放置在培养箱中,培养条件为 22℃、光照 14 h,LED 灯光强的光合光子通量密度(Photosynthetic Photon Flux Density, PPFD)为 480 μmol · m⁻² · s⁻¹ (MK350S 光谱仪,台湾);17℃、黑暗 10 h;相对湿度 85%。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。

1.2.2 光照和温度对类病斑的影响 为比较光照强度对类病斑发生的影响。按 1.2.2 的方法种植,将播种 *lm452* 的花盆放置在培养箱中生长,统一培养条件为光照 14h、温度 22℃,黑暗 10h、温度 15℃,相对湿度 85%。光照强度设置三个梯度,PPFD 分别为 100 μmol · m⁻² · s⁻¹、350 μmol · m⁻² · s⁻¹、600 μmol · m⁻² · s⁻¹,每种光强条件处理 9 株,三个重复。在三叶期时比较第一和第二片叶的类病斑发生情况。当第三片叶生长至长度 5-8 cm 且未出现类病斑时,在上述 350 μmol · m⁻² · s⁻¹ 光照强度处理下用锡箔纸遮住第三片叶大部分,分析遮光是否影响类病斑的发生。

为比较温度高低对类病斑发生的影响。按 1.2.2 的方法种植,将播种 *lm452* 的花盆放置在培养箱中生长,统一培养条件为光强 350 μmol · m⁻² · s⁻¹、光照 14h,黑暗 10h,相对湿度 85%。温度设置三个梯度,分别为光照 12℃/黑暗 5℃,光照 22℃/黑暗 15℃,光照 32℃/黑暗 25℃,每种温度条件处理 9 株,三个重复。在三叶期时,比较第一和第二片叶的类病斑发生情况。

1.2.3 类病斑对农艺性状的影响 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,行长 1 m,行距 25 cm、株距 5 cm,2 个重复。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 标准^[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*、*g451* 和二者杂交的 F₁ 代种植在温室。将露白种子播种于直径 20 cm 的花盆,6 株/盆,自然光照加补充人工钠灯照明 14h、温度控制在 15-25℃。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 进行数据统计和方差分析。

1.2.4 组织化学染色 幼苗在培养箱中生长到三叶期时,在 *lm452* 幼苗的第二叶上剪取 3.5 cm 长度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。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℃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^[29],略有改动;将叶片在 0.25% (W/V)伊文思蓝溶液中染色 24 h,脱色方式同上。

1.2.5 生理指标测定 取样方法同 1.2.4。分别取等量的 *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),

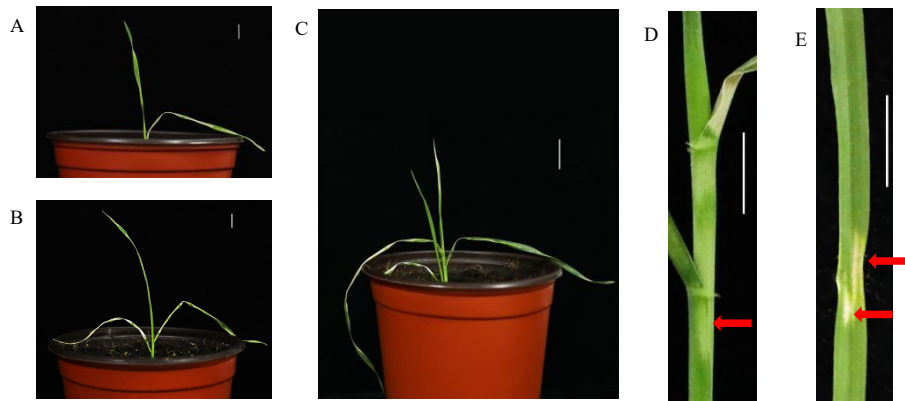
漩涡振荡 2 min; 3500 r/min 离心 10 min, 取上清待测。参照丙二醛 (MDA) 含量、过氧化氢 (H₂O₂) 含量、过氧化氢酶 (CAT) 活性和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定试剂盒 (建成生物工程研究所, 南京), 以及可溶性蛋白含量 (SP) 测定试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, 上海) 的说明书进行操作; 每个生理指标均为 3 个生物学重复。利用 Excel 2019 和 SPSS 26.0 进行数据统计和方差分析。

1.2.6 类病斑遗传分析 将 *lm452* 与 *g451* 杂交的 F₁、F₂ 和 F_{2:3} 家系种植在育苗盘中。种子处理及培养条件同 1.2.1, 在 3 叶期调查单株的类病斑表型, 统计 F₂ 和 F_{2:3} 家系正常植株与类病斑植株的分离比, 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 1-A); 同一叶片的不同位置上均可出现 (图 1-B、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 1-D)。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 1-E)。



A: 二叶期; B: 三叶期; C: 分蘖期, 比例尺=2cm; D: 叶鞘, 箭头所指为*lm452* 叶鞘上发生的类病斑表型; E: 叶片, 箭头所指为*lm452* 叶片上发生的类病斑表型。图A、B、D和E的比例尺=1cm

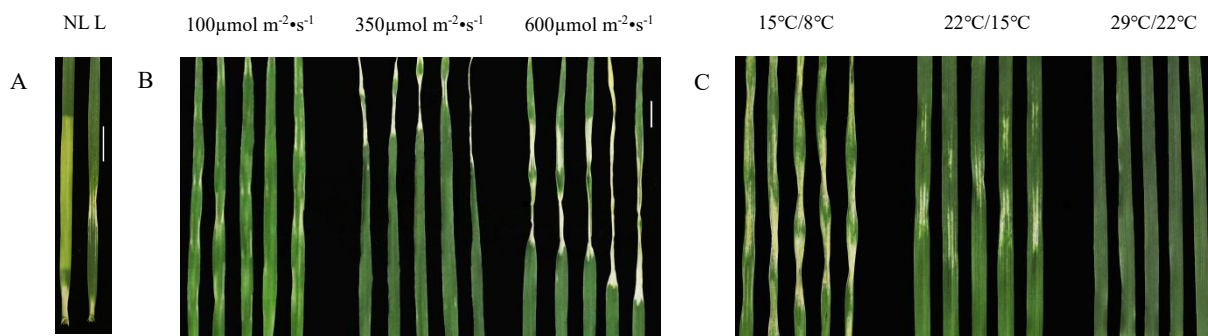
A: Two-leaf stage; B: Three-leaf stage; C: Tillering stage, scale bar=2cm; D: Leaf sheath, the arrows point to the lesion mimic phenotype that occurs on the *lm452* leaf sheath; E: Leaf, the arrows point to the lesion mimic phenotype that occurs on the *lm452* leaves. The scale bar in Fig A, B, D and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

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*

2.2 光照和温度对类病斑性状的影响

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。因而, 遮光可以避免或减弱 *lm452* 类病斑的发生 (图 2-A)。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, 特别是在 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照下发生严重 (图 2-B)。在不同温度区间生长条件下, 类病斑的发生面积和速度随着温度的增加而降低, 在 15°C/8°C 温度区间发生严重 (图 2-C)。



A:遮光和光照; B: 三种光照强度; C: 三种温度区间; 比例尺=1 cm

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

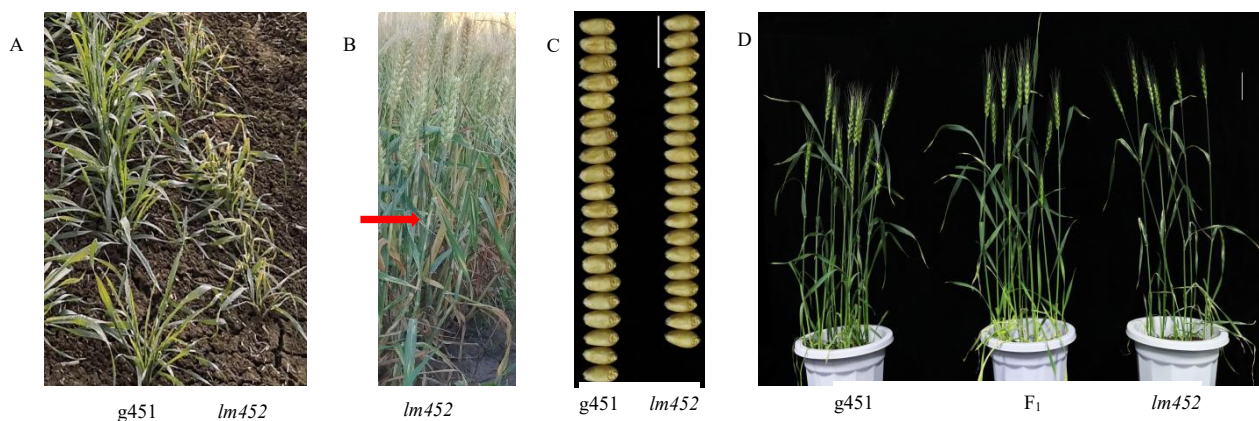
图 2 光照和温度对*lm452* 类病斑发展的影响

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 3-A), 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 3-B); 由于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 3-C, 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* 的单株有效分蘖数、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 3-D, 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。



A: 分蘖期 (2021.12.11); B: 灌浆期 (2022.5.27), 箭头所指为 *lm452* 叶片上发生的类病斑; C: 籽粒, 比例尺=1 cm; D: 温室灌浆期, 比例尺=1 cm

A:Tillering stage(2021.12.11); B:Grain filling stage (2022.5.27), the arrows point to lesion mimic that occur on *lm452* leaves; C: Grains, scale bar=1 cm; D:

Grain filling stage in 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

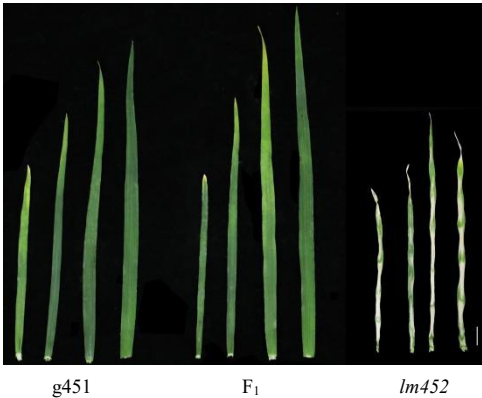
环境 Environment	材料 Materials	株高 Plant height (cm)	有效分蘖数 Spike number per plant	穗长 Spike length (cm)	千粒重 1000-kernel weight (g)	穗粒数 Kernel number per spike
田间 Fields	<i>lm452</i>	59.2±0.5*	9.0±0.2*	10.5±0.2	41.60±1.10**	33.2±7.09
	g451	57.0±0.8	8.0±0.4	10.0±0.2	47.60±0.80	32.8±2.78
温室 Green house	<i>lm452</i>	52.6±0.60**	1.0±0**	6.74±0.05**	34.64±0.61**	16.4±1.95**
	g451	49.5±1.69	2.0±0.45	8±0.39	41.04±1.80	25.2±0.84

数据为平均值±标准差； *: $P<0.05$, **: $P<0.01$

Data are means ± SD; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$

2.4 遗传分析

类病斑突变体*lm452* 和正常表型姊妹系g451 的F₁后代表现正常，未出现类病斑（图 4，表 1）。F₂代出现性状分离，在 465 个F₂代单株中，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。



五叶期拍照，从左至右依次为幼苗的第 1、第 2、第 3 和第 4 叶

Photos were taken at Fifth-leaf stage, The order from left to right is the first, second, third and fourth leaf of the seedlings

图 4 突变体*lm452*、姊妹系g451 和F₁ 的叶片

Fig.4 Leaves of mutant *lm452*, sister line g451 and F₁

表 2 突变体*lm452* 与姊妹系g451 杂交后代的表型

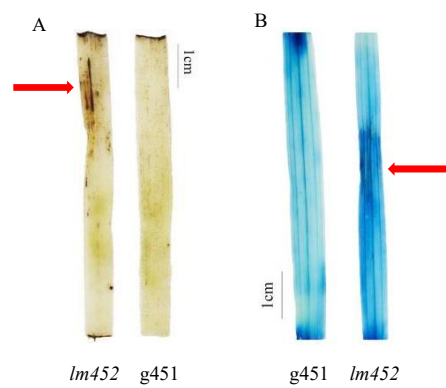
Table2 Phenotype of hybrid offspring between mutant *lm452* and sister line g451

编号 Number	总株数 Total Plants	正常 Normal Plants	分离 Separation	类病斑 Lesion mimic	分离比 Separation ratio	χ^2	P 值 P value
g451	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	0.6

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 5-A）。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 5-B）。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。



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

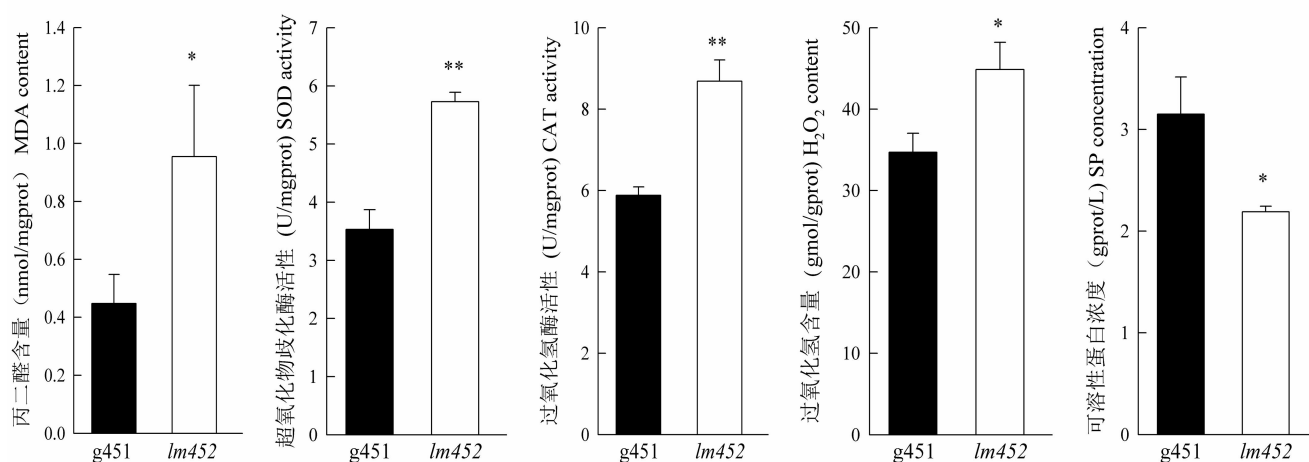
A: DAB staining; The arrows point to the site where lesion mimic occur, which are tan after staining; B: Evans blue staining; The arrows point to the site where lesion mimic occur, which are blue after staining

图 5 *lm452* 和*g451* 的组织化学染色

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

2.6 生理指标分析

在植物细胞内存在ROS清除酶系统将ROS含量稳定在正常水平。若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（H₂O₂）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活性增加达极显著水平(P=1×10⁻³；P=5.4×10⁻⁴)。*lm452* 的可溶性蛋白含量较*g451* 降低 43.77%，差异显著（图 6）。



3 个生物学重复; t 检验: *: $P<0.05$, **: $P<0.01$

Three biological replicates; t-test: *: $P<0.05$, **: $P<0.01$

图 6 突变体 *lm452* 与表型正常姊妹系 *g451* 的过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢(H₂O₂)和可溶性蛋白含量(SP)

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

3 讨论

本研究报道了一个新的小麦类病斑突变体*lm452*。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]。本研究中,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。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, 32]。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^[33]。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。

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类病斑。在作物中已发现白色^[12](*HLP*)、橙黄色(*spl1*)^[33]、红色^[34](*spl5*)、褐色^[2, 35](*OsLSD1*、*spl18*)、棕黄色^[36](*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]中,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(H_2O_2)含量都显著增加, 而可溶性蛋白含量(SP)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*^[34]、水稻类病斑突变体 *spl-I*^[33]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 PCD 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*^[37]、*Lm5*^[38]、*TaSpl*^[32]、*HLP*^[12]是显性基因控制, *lm*^[39]、*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。

4 结论

小麦突变体 *lm452* 的类病斑在二叶期时发生, 首先出现在第一片叶, 发病部位随机, 颜色由白色渐变为黄褐色, 直至干枯; 外观呈条纹斑块状, 随着植株生长发育进程类病斑数量逐渐增加, 可延伸至叶鞘。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, 低温和强光可加重发病程度。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。*lm452* 的千粒重在田间和温室条件下均较表型正常姊妹系 *g451* 的极显著降低。遗传分析表明 *lm452* 的类病斑性状受单个隐性核基因控制。上述结果为未来克隆小麦突变体 *lm452* 的类病斑基因和解析类病斑发生的分子机理奠定了基础。

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*) *NPRI* 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点叶突变体的生理和遗传分析. 作物学报, 2014, 40(6): 1020-1026
Du L L, 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. *The Crop Journal*, 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] IWGSC. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 2018, 361 (6403): 7191
- [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 leaf1*. *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] Jacyn Baker 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] 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
- [33] 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
- [34] 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
- [35] 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
- [36] 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

- [37] 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
- [38] 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
- [39] 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