

植物类病变突变体的诱发与突变机制

王忠华*

(浙江万里学院生物技术研究所, 宁波 315100)

摘要 植物类病变突变体(lesion mimic mutant, LMM)是在无明显逆境或病原物侵染时, 植物自发地形成类似病斑的一类突变体。它涉及到细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD), 往往能提高植物的抗病能力。因此, 它对于揭示植物抗病反应机制, 增加植物的广谱抗性具有重要意义。现就植物类病变突变体的诱发与表型特点、突变基因的分子定位与克隆及类病变表型的形成机制研究进展作一简要综述, 以期对植物细胞程序性死亡机制和抗病分子作用机制研究提供有益的信息。

关键词 植物; 类病变突变体; 分子定位与克隆; 突变机制

植物和病原菌之间的作用机制一直是植物病理学研究的重点与热点课题之一。植物对病原物主要有以下两层防御体系: 第一层是植物利用本身固有的基质或介质来抵制外界病原物的侵袭, 这些基质主要包括细胞壁的角质、蜡质、木质素、特殊的气孔结构、小分子抗病物质(如毒性脂肪酸、酚类化合物、类萜与类黄酮类植保素以及有关的过氧化物酶、多酚氧化酶与苯丙氨酸解氨酶等)、种子固有的抗真菌蛋白和能与真菌几丁质结合的凝集素、破坏真菌细胞透性的蛋白质和核糖体失活蛋白等^[1]。而第二层防御体系是植物在受到病原物侵染后诱导产生的。人们又将该防卫体系分为局部和系统的抗病反应两种。前者主要是指过敏反应(hypersensitive reaction, HR), 即当植物受非亲和性病原菌感染后, 侵染部位细胞迅速死亡, 使病原菌不易获取养分, 同时又诱导周围细胞合成抑制病原菌生长的物质, 从而限制了病原菌的增殖^[2]。在HR过程中的细胞死亡, 过去称为坏死(necrosis), 现在被认为是程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD 或 apoptosis)^[3,4]。而后者是建立在前者基础之上的, 又称系统获得抗性(system acquired resistance, SAR)。它是指植物受病原菌侵染后局部的HR会产生一类信号分子, 这种信号分子能诱发整个植株防卫基因的表达, 从而使植物对更多的病原菌产生抵抗作用。其特点是不出现局部抗性那样的枯斑, 却能抗多种病原物引起的病害^[5]。

为了探明植物过敏性反应的作用机制, 学者们利用各种物理、化学和生物的方法诱发产生一系列

细胞程序性死亡突变体。在这些突变体中, 有一类表型像感病症状, 但无病原菌孢子, 人们称之为类病变突变体(lesion mimic mutant)^[6]。到目前为止, 人们已在模式植物拟南芥和重要粮食作物玉米、大麦和水稻中获得许多此类突变体^[3,7], 并开展了一系列研究, 包括类病变坏死表型的形成机制、突变基因的分子定位与克隆及其结构功能分析, 并已取得显著进展。

1 植物类病变坏死突变体的诱发与表型特点

与其他突变体一样, 该类突变体既可天然自发形成, 也可人工诱变而成。前者的突变频率非常低, 大多数采用人工诱变获得。近10年来, 人们利用理化和生物诱变的方法从不同植物中成功地获得了一系列类病变突变体, 表1从诱变方法和诱变位点及相应的出处3个方面列出了目前诱发获得的主要几种植物的类病变坏死突变体。根据突变体的表型, 又可将该类突变体细分为扩散型(propagation class)和起始型(initiation class)两类^[3,6]。其中前者又称蔓延型突变体, 它是指叶片某一点的细胞坏死一旦产生便很快扩散到整个叶片, 甚至茎秆或整个植株中。Simmons等^[7]利用突变子Mu标签插入法在玉米中获得的致死性叶斑(lethal leaf spot, *lls1*)突变体及

收稿日期: 2004-08-23 接受日期: 2005-01-12

浙江省科技厅项目和美国阿肯色州水稻基金项目共同资助

* 通讯作者。Tel: 0574-88222851, E-mail: wang1972@zwu.edu.cn

Dangl 实验小组^[8,9]和 Greenberg 实验小组^[10-13]利用化学诱变剂乙基甲磺酸(ethyl methane sulfonate, EMS)或转移 DNA(transfer DNA, T-DNA)插入法在模式植物拟南芥中诱发获得的对细胞死亡控制减弱的模仿抗病坏死(lesions simulating disease resistance response, *lsd*)突变体和加速细胞死亡(accelerated cell death, *acd*)突变体都属于蔓延型类病变突变体。除玉米与拟南芥外, 目前在水稻中也发现和诱发产生了该类突变体, 包括自发形成和人工诱变的坏死(*sekiguchi lethal*, *Sl*)突变体^[14,15]、Cheng 等^[16]和王建军等^[17]利用⁶⁰Co γ 射线诱发产生的 *lmi* 突变体和 *lrd* 突变体等。而起始型突变体是指在植物未受到病原物侵染时, 细胞坏死就能自发和随机地在叶片或植株中形成特定大小的坏死斑。目前在玉米中诱发产生的 23 个显性功能获得型类病变突变体中的绝大多数都属于起始型突变体^[7]。另外, Wolter 等^[18]利用 EMS 人工诱变法在

大麦中获得的 *mlo* 突变体也属于该类突变体。遗传分析结果表明, 前者一般以隐性方式遗传, 而后者则以显性方式遗传^[19]。这两类突变体的相互关系目前尚不清楚。

2 类病变突变基因的分子定位与克隆

为了进一步探讨植物类病变突变的分子机制, 人们对突变基因的分子定位与克隆进行了深入地研究, 目前已取得可喜进展。人们对植物类病变突变基因进行了染色体的分子定位, 分别利用微卫星标记和 CAPS 标记对水稻类病变突变体中的 *lmi* 基因进行了初步与精细的分子定位。初步定位结果表明 *lmi* 基因位于水稻第 8 染色体的短臂着丝粒附近; 遗传连锁分析表明 *lmi* 基因位于两个 SSR 标记 RM331 与 RM547 之间, 遗传距离分别为 3.2 cM 和 1.2 cM。精细定位则将 *lmi* 基因定位于离 CAPS 标记 C4135-8

表 1 植物类病变突变体的诱发与获得

植物	诱变方法	突变位点	参考文献
拟南芥	EMS	<i>acd1</i> , 6	[10,11]
	EMS 和 T-DNA 标签法	<i>acd2</i>	[12]
	基因剔除法	<i>acd11</i>	[13]
	T-DNA 标签法	<i>lsd2</i>	[8,9]
	EMS	<i>lsd1</i> , 3, 4, 5	[8,9]
	EMS	<i>lsd7</i>	[20]
	EMS	<i>cpr5</i>	[21]
	EMS	<i>mod1</i>	[22]
	T-DNA 标签法	<i>cpn1</i>	[23]
	EMS	<i>hrl1</i>	[24]
	EMS	<i>atr4</i>	[25]
	EMS	<i>rcd1</i>	[26]
	T-DNA 标签法	<i>lin2</i>	[27]
	EMS	<i>agd2</i>	[28]
	自发形成	<i>dll1</i>	[29]
玉米	突变子 Mu 标签法	<i>les22</i>	[30]
	转座诱变	<i>rp1</i>	[31]
	突变子 Mu 标签法	<i>lls1</i>	[7]
大麦	EMS	<i>mlo</i>	[18]
	自发形成	<i>sl</i>	[14]
水稻	⁶⁰ Co γ 射线	<i>sl</i>	[15]
	EMS	<i>spl</i>	[32]
	MNU	<i>cdr</i>	[33]
	⁶⁰ Co γ 射线	-	[34]
	⁶⁰ Co γ 射线	<i>lmi</i>	[16]
	⁶⁰ Co γ 射线	<i>lrd</i>	[17]
	EMS	<i>lmm</i>	Jia, 个人通讯

EMS: ethyl methane sulfonate(乙基甲磺酸); T-DNA: transfer DNA(转移 DNA); MNU: *N*-methyl-*N*-nitrosourea(甲基亚硝基脲); *acd*: accelerated cell death(加速细胞死亡); *lsd*: lesions simulating disease resistance response(模拟抗病反应坏死); *cpr*: constitutive expresser of PR genes(防卫基因组成性表达); *mod*: mosaic death(嵌合死亡); *hrl*: hypersensitive response-like lesion(类似过敏反应坏死); *atr*: altered tryptophan regulation(色氨酸调节改变); *rcd*: radical-induced cell death(自由基诱发细胞死亡); *lin*: lesion initiation(坏死起始); *agd*: aberrant growth and death(生长异常与死亡); *dll*: disease-like lesion(类病变坏死); *lls*: lethal leaf spot(致死性叶斑); *cdr*: cell death and resistance(细胞死亡与抗性); *lmi*: lesion mimic initiation(模仿坏死起始)。

和 C4135-9 只有 0.08 cM 的区域上, 为进一步的克隆研究打下坚实的基础^[35]。Zeng 等^[36]利用 RFLP 标记对水稻类病变突变体中 *spl11* 基因进行了精细定位, 结果发现该基因位于第 12 染色体上, 与两个 RFLP 标记 R1709 与 1F5 的遗传距离分别为 0.044 cM 和 0.088 cM。

同时, 人们还利用各种方法从不同植物中克隆到一些与细胞死亡相关的重要基因, 包括拟南芥中的 *LSD1*、*ACD2*、*ACD11*、*MOD1* 和 *CPN1* 基因、玉米中的 *Les22* 和 *Lls1* 基因、大麦中的 *Mlo* 基因和水稻中的 *Spl7* 和 *spl11* 基因等^[37-39]。表 2 列出了这些基因的结构特征与在控制细胞死亡中可能起的作用及克隆的相应方法。除拟南芥中的 *CPN1* 基因和玉米中的 *Lls1* 基因外, 它们的编码产物大多数为细胞死亡的负调控因子。这些基因的克隆无疑将为进一步阐明植物细胞程序性死亡机制和揭示植物抗病分子机制提供了强有力的分子基础, 同时也为阐明植物类病变突变的发生机制创造了有利条件。

3 类病变坏死表型的形成机制

众所周知, 任何生命现象或生理活动都不是由单单某一个因子决定的, 植物类病变坏死突变表型的产生也不例外, 它是由植物自身与外界环境中的众多因素所共同决定的。国内外许多学者对上述各种植物类病变坏死突变表型的产生机制进行了广泛

而深入的研究, 结果表明植物各种类病变坏死突变表型的起因存在以下几个方面: (1) 植物类病变坏死的产生可能源自抗病基因的改变或过量表达从而不当地启动 HR(包括早期步骤中的功能错误、信号受体和信号转导问题等) 导致难以控制的细胞死亡。Hu 等^[31]发现玉米抗锈病基因 *rpl* 发生突变可引发玉米叶片类病变坏死病斑的产生。Tang 等^[46]发现番茄抗病基因 *Pto* 的过量表达可诱导类病变坏死表型的发生; (2) 植物类病变坏死突变属于细胞程序性死亡的特殊类型, 而后者在生物界非常普遍, 它是生物自身发育与适应外界不良环境所具有的本能反应。因此任何干扰或影响正常 PCD 发生的因素都有可能引发植物类病变突变坏死表型的发生, 即植物类病变坏死突变与植物 PCD 失控有关^[13,19,40,45]。限于篇幅, 这里不展开论述; (3) 正常代谢途径发生紊乱也会引起植物的类病变坏死突变。Hu 等^[42]对玉米中的 *Les22* 基因进行序列分析, 结果表明该基因编码尿卟啉脱羧酶(UROD)——合成血红素或叶绿素过程中的卟啉代谢途径的关键酶。一旦它发生突变, 将使 UROD 活性显著下降, 从而使其反应底物——尿卟啉原 III 大大积累。该底物在光照条件下能使分子氧转变为活性氧, 由此引发玉米叶片中类病变坏死表型。随后又出现许多类似的研究报道^[27,41,47-49]。中科院遗传与发育研究所李家洋研究小组^[22]对拟南芥 *mod* 突变体进行了深入地研究, 发现 *MOD* 基因编

表 2 植物类病变突变基因的克隆与结构特征

植物	基因位点	克隆方法	结构与功能	参考文献
拟南芥	<i>LSD1</i>	图位克隆法	编码含 189 个氨基酸残基的锌指蛋白; 细胞死亡负调控因子	[40]
	<i>ACD2</i>	图位克隆法	编码与红叶绿素降解物还原酶类似的蛋白质; 细胞死亡负调控因子	[41]
	<i>ACD11</i>	转座子标签法	编码分子量为 22.7 kDa 的鞘氨醇转移蛋白; 可能是细胞死亡负调控因子	[13]
	<i>MOD1</i>	图位克隆法	编码烯酰基酰基载体蛋白还原酶; 植物生长细胞早期死亡负调控因子	[22]
	<i>CPN1</i>	转座子标签法	编码含 578 个氨基酸残基、分子量为 63.1 kDa 的 copine 蛋白; 低湿度的正调控因子	[23]
玉米	<i>Les22</i>	转座子标签法	编码含 393 个氨基酸残基的尿卟啉脱羧酶; 细胞死亡负调控因子	[42]
	<i>Lls1</i>	转座子标签法	编码芳香族环状羟基化双加氧酶的两个共有序列结合模体; 细胞死亡正调控因子	[43]
大麦	<i>Mlo</i>	图位克隆法	编码 534 个氨基酸残基分子量为 60 kDa 含 7 个跨膜域的膜锚定蛋白; 细胞死亡负调控因子	[44]
水稻	<i>Spl7</i>	图位克隆法	编码含 459 个氨基酸残基的热激转录因子蛋白; 细胞死亡负调控因子	[45]
	<i>spl11</i>	图位克隆法	编码富含 U-box 重复区域的蛋白; 细胞死亡负调控因子	[39]

码的是烯酰基酰基载体蛋白还原酶——脂肪酸生物合成的关键酶。在突变体中该基因所编码的产物发生了一个氨基酸残基的差异,使烯酰基酰基载体蛋白还原酶的活性大大降低,脂肪酸生物合成受阻,从而减少了植物内的总脂含量,进而影响拟南芥的生长发育,导致类病变坏死表型的出现。Ueno等^[50]研究发现,色氨酸脱羧酶和单胺氧化酶活性的提高能引发水稻Sekiguchi损伤的形成;(4)活性氧与自由基在坏死形成过程中可能扮演了重要角色^[51~53],如上述已提到的玉米类突变体*les22*中的叶片坏死就是由活性氧直接诱发产生的^[42]。Overmyer等^[26]在研究拟南芥*rca*突变体时发现,臭氧和过氧化物是引发类病变坏死的直接原因;(5)水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)和乙烯等激素与其他信号转导因子在植物类病变坏死表型形成过程中可能也起一定作用^[12];(6)外源转基因的过量表达也会引发植物类病变坏死表型的发生。如霍乱毒素和细菌视蛋白基因的过量表达可诱发类病变坏死病斑的产生^[54,55]。此外,外界环境,如光照、温度与湿度条件也可诱发植物类病变坏死表型的形成,如Arase等^[56]和Cheng等^[16]诱发获得的水稻类病变突变体的细胞坏死都是受光诱导的,而Jambunathan等^[23]获得的拟南芥*cpnl*突变体则受环境湿度条件诱导。

上述引发植物类病变坏死表型的众多起因不是单方面起作用的,而往往是多种因素综合作用的结果^[57]。

4 小结

综上所述,有关植物类病变坏死突变体的诱发及突变机制研究已取得长足进步,但由于该研究领域涉及范围非常广,它包括植物细胞程序性死亡、抗病生理过程、光信号和SA等相关因子转导途径及活性氧与自由基的生理生化活动等,人们需要对植物类病变坏死表型的形成机制进行更加深入与全面的研究,从而加深对植物抗病防御体系和细胞程序性死亡机制的理解,这样也将极大地丰富植物分子病理学与分子生物学的内涵。更有趣的是,人们研究发现不少植物类病变突变体比原亲本具有更强的抗病能力^[3,6,8,9,11,58,59],因此植物类病变坏死突变体可望在植物广谱抗性改良上发挥作用。由于突变体本身的农艺性状一般较差,直接应用有一定困难。目前这方面的研究基本上是个空白,因此植物类病变坏死突变体的育种应用研究有待于进一步加强。

参考文献 (References)

- [1] 王忠华. 浙江大学博士学位论文, 2003, 25
- [2] Hammond-Kosack KE et al. *Plant Cell*, 1996, **8**: 1773
- [3] Dangl JL et al. *Plant Cell*, 1996, **8**: 1793
- [4] Lam E et al. *Nature*, 2001, **411**: 848
- [5] Ryals J et al. *Plant Cell*, 1996, **8**: 1809
- [6] Shirasu K et al. *Plant Mol Biol*, 2000, **44**: 371
- [7] Simmons C et al. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1998, **11**: 1110
- [8] Dietrich RA et al. *Cell*, 1994, **77**: 565
- [9] Jabs T et al. *Science*, 1996, **273**: 1853
- [10] Greenberg JT et al. *Plant J*, 1993, **4**: 327
- [11] Greenberg JT et al. *Cell*, 1994, **77**: 551
- [12] Rate DN et al. *Plant Cell*, 1999, **11**: 1695
- [13] Brodersen P et al. *Genes Dev*, 2002, **16**: 490
- [14] Marchetti MA et al. *Phytopathology*, 1983, **73**: 603
- [15] Arase S et al. *J Gen Plant Pathol*, 2000, **66**: 109
- [16] Cheng ZK et al. *Chinese Rice Research Newl*, 1998, **6**: 2
- [17] 王建军等. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, **30**: 331
- [18] Wolter M et al. *Mol Gen Genet*, 1993, **239**: 122
- [19] 刘国振等. *科学通报*, 1997, **42**: 1129
- [20] Weymann K et al. *Plant Cell*, 1995, **7**: 2013
- [21] Bowling SA et al. *Plant Cell*, 1997, **9**: 1573
- [22] Mou Z et al. *Plant Cell*, 2000, **12**: 405
- [23] Jambunathan N et al. *Plant Cell*, 2001, **13**: 2225
- [24] Devadas SK et al. *Plant J*, 2002, **30**: 467
- [25] Smolen G et al. *Genetics*, 2002, **160**: 323
- [26] Overmyer K et al. *Plant Cell*, 2000, **12**: 1849
- [27] Ishikawa A et al. *Plant J*, 2001, **27**: 89
- [28] Rate DN et al. *Plant J*, 2001, **27**: 203
- [29] Pilloff RK et al. *Plant J*, 2002, **30**: 61
- [30] Johal GS et al. *Maydica*, 1994, **39**: 69
- [31] Hu G et al. *Plant Cell*, 1996, **8**: 1367
- [32] Singh K et al. *Rice Genet Newsl*, 1995, **12**: 192
- [33] Takahashi A et al. *Plant J*, 1999, **17**: 535
- [34] Jambhulkar SJ et al. *Rice Genet Newsl*, 2000, **17**: 80
- [35] 刘道峰等. *科学通报*, 2003, **48**: 831
- [36] Zeng L et al. *Mol Genet Genomics*, 2002, **268**: 253
- [37] 姜丽等. *中国生物工程杂志*, 2003, **23**: 34
- [38] 王忠华等. *植物学通报*, 2004, **21**: 521
- [39] Zeng LR et al. *Plant Cell*, 2004, **16**: 2795
- [40] Dietrich RA et al. *Cell*, 1997, **88**: 685
- [41] Mach JM et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 771
- [42] Hu G et al. *Plant Cell*, 1998, **10**: 1095
- [43] Gray J et al. *Cell*, 1997, **89**: 25
- [44] Büschges R et al. *Cell*, 1997, **88**: 695
- [45] Yamanouchi U et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 7530
- [46] Tang X et al. *Plant Cell*, 1999, **11**: 15
- [47] Molina A et al. *Plant J*, 1999, **17**: 667
- [48] Gray J et al. *Plant Physiol*, 2002, **130**: 1894
- [49] Pružinská A et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 15259
- [50] Ueno M et al. *Plant J*, 2003, **36**: 215
- [51] 郭泽建等. *植物学报*, 2000, **42**: 881
- [52] Lamb C et al. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, **48**: 251
- [53] Epple P et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 6831
- [54] Beffa R et al. *EMBO J*, 1995, **14**: 5753
- [55] Mittler R et al. *Plant Cell*, 1995, **7**: 29

- [56] Arase S *et al.* *J Phytopathol*, 2001, **149**: 409
 [57] Xiao S *et al.* *Plant Cell*, 2003, **15**: 33

- [58] Yin Z *et al.* *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, **13**: 869
 [59] Arase S *et al.* *J Phytopathol*, 2000, **148**: 197

Induction and Mutation Mechanism of Plant Lesion Mimic Mutants

Zhong-Hua Wang*

(*Institute of Biotechnology, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China*)

Abstract Plant lesion mimic mutants develop spontaneous lesions that resemble disease symptoms in the absence of pathogen and stress attack. The mutated genes of the lesion mimic mutation have been shown to involve in programmed cell death, which leads to enhanced disease resistance to multiple pathogens. Therefore, the research on plant lesion mimic mutants plays an important role in revealing the mechanisms of disease resistance response and enhancing the resistance spectrum of plant. The paper briefly reviewed the induction of lesion mimic mutants in plants, molecular mapping and cloning of mutated genes and the mechanism of lesion phenotype formation, which can provide the interest information for the research on the mechanisms of programmed cell death and plant disease resistance.

Key words plant; lesion mimic mutants; molecular mapping and cloning; mutation mechanism

Received: August 23, 2004 Accepted: January 12, 2005

This work was supported by the Science & Technology Department of Zhejiang Province, China and the Arkansas Rice Research and Promotion Board, USA

*Corresponding author. Tel: 86-574-88222851, E-mail: wang1972@zwu.edu.cn

分子生物学基础实验技术培训班

(天根生化科技(北京)有限公司举办)

培训宗旨: 适应科学发展需要, 培养分子生物学领域初级技术人员。

培训时间: 周六、周日全天。

培训内容: 分子生物学基本实验技术的原理方法及常见问题分析和解决方案(包括: 理论讲解及实际动手操作)。

第一部分: 分子生物学基础实验技术

(1) PCR 技术原理及应用, 包括: 模板制备、引物设计、体系建立和 PCR 反应等; (2) 琼脂糖凝胶电泳技术; (3) DNA 片段的纯化回收; (4) 质粒的提取(菌体的收集、裂解及质粒的纯化、鉴定); (5) DNA 片段的克隆(DNA 片段与载体的连接、转化); (6) 重组菌的鉴定。

第二部分: RNA 的相关实验及 DNA 的提取

(1) 总 RNA 提取(细菌、酵母、组织、血液); (2) RT-PCR 反应; (3) 基因组 DNA 的提取。

第三部分: 荧光定量 PCR 技术

(1) 荧光定量 PCR 技术: 原理, 引物设计, 体系建立, 反应结果分析。

第四部分: 蛋白质免疫反应相关实验(Western blotting)

(1) 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术; (2) Western blotting 实验: 原理, 方法(蛋白质样品的分离、转膜、封闭、抗体反应、显色)。

培训地点: 天根生化科技(北京)有限公司分子生物学实验室

公司地址: 北京海淀区成府路 35 号北陆楼 4 层 邮编: 100083

报名方式: 电话: 010-62521767, 62526072 传真: 010-62551779 E-mail: people@tw-biotech.com

招收人数: 15~20 人/期。收费标准: 询价。

有关信息会定期在公司网站(www.tiangen.com)上发布, 欢迎大家咨询。