

水稻条纹叶和白穗基因 *SLWP* 的定位及变异分析

周坤能 夏加发 马廷臣 王元垒 李泽福*

(安徽省农业科学院 水稻研究所, 安徽省水稻遗传育种重点实验室, 国家水稻改良中心合肥分中心, 合肥 230001; *通讯联系人, E-mail: lizefu@aliyun.com)

Mapping and Mutation Analysis of Stripe Leaf and White Panicle Gene *SLWP* in Rice

ZHOU Kunneng, XIA Jiafa, MA Tingchen, WANG Yuanlei, LI Zefu*

(Rice Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory for Rice Genetics and Breeding of Anhui Province/Hefei Sub-Center of National Rice Improvement Center, Hefei 230031, China; *Corresponding author, E-mail: lizefu@aliyun.com)

Abstract: 【Objective】Cloning and function analysis of chloroplast development-associated genes will lay a molecular basis for clarifying chloroplast function. 【Method】A stripe leaf and white panicle mutant, *slwp*, was isolated from an ethylmethylsulfone (EMS) mutagenic population of *indica* rice cultivar 9311. The phenotypic characteristics of *slwp* were analyzed by pigments determination and agronomic traits observation. The *SLWP* gene was identified by map-based cloning method. The gene expression was analyzed by the quantitative real-time PCR. 【Result】The *slwp* mutant showed stripe leaf phenotype from two-leaf stage to heading and white panicle after heading accompanied by obviously decreased pigment contents compared with wild type. The *slwp* mutant was also featured with delayed heading and decreased plant height and yield and so on. Genetic analysis demonstrated that the mutant phenotype was controlled by a recessive nuclear gene. The *SLWP* gene was fine-mapped to a 0.91 Mb interval between markers C6-4 and N14 on the short arm of rice chromosome 6. Sequence comparison displayed that a single nucleotide substitution (G776A) in the coding region of ribonucleoside-diphosphate reductase small chain(RNRS1), which led to the amino acid change from Gly to Asp. The *SLWP* was allelic to *Stl*, *Gws* and *St-wp*. We analyzed the mutant sites and phenotypes of the four alleles and summarized the effect of mutation on plant phenotypes and the difference between *indica* and *japonica*. In addition, expression analysis revealed that genes involved in chlorophyll biosynthesis were differently regulated, genes involved in the first and second steps of chloroplast differentiation were up-regulated, and genes involved in photosynthesis were down-regulated. 【Conclusion】We analyzed the effect of mutant sites in *SLWP(RNRS1)* gene on rice phenotypes. It deepens understanding for *RNRS1* function and help to elucidate the molecular mechanism of chloroplast development.

Key words: rice (*Oryza sativa*); mutant; mutation analysis; expression analysis

摘要: 【目的】对叶绿体发育相关基因进行克隆和功能分析, 为解析叶绿体功能奠定分子基础。【方法】用甲基磺酸乙酯(EMS)处理籼稻 9311 获得一个条纹叶和白穗突变体 *slwp*, 通过色素分析和农艺性状观察分析该突变体的表型, 通过图位克隆方法分离该基因, 进一步利用定量 PCR 分析相关基因的表达情况。【结果】突变体 *slwp* 从 2 叶期开始至抽穗期表现出条纹叶表型, 抽穗后幼穗白化, 光合色素含量明显低于野生型; 株高降低、抽穗延迟、产量降低等表型。该突变性状为单隐性核基因控制, 该基因定位于水稻第 6 染色体短臂 C6-4 和 N14 标记之间 0.91 Mb 区间内。基因组测序表明核糖核苷二磷酸还原酶小亚基基因(*RNRS1*)编码区第 776 位点发生单碱基替换, 导致甘氨酸突变为天冬氨酸; 该基因与已报导的水稻基因 *Stl*、*Gws* 和 *St-wp* 为等位基因。通过对这 4 个等位基因的突变位点和表型进行分析, 总结了该基因不同位点突变对植株表型的影响以及籼粳之间的差异。表达分析显示与叶绿素合成有关的基因受到不同程度调控, 叶绿体发育第一和第二阶段基因上调表达, 光合作用相关基因均下调表达。【结论】本研究分析了 *SLWP(RNRS1)* 基因不同位点的变异对水稻表型的影响, 相关结果加深了对 *RNRS1* 基因功能的认识, 有助于阐明叶绿体发育的分子机制。

关键词: 水稻; 突变体; 变异分析; 表达分析

中图分类号: Q343.5; Q754; S511.01

文献标志码: A

文章编号: 1001-7216(2018)04-0325-10

收稿日期: 2017-09-28; 修改稿收到日期: 2018-01-14。

基金项目: 安徽省农业科学院科技创新团队项目(18C0101); 安徽省农业科学院学科建设项目(17A0103); 国家 863 计划资助项目(2014AA10A604-17); 国家重点研发计划资助项目(2016YFD0100101-06; 2017YFD0100406)。

叶绿素广泛存在于绿色高等植物、绿藻、蓝细菌等光合生物中,作为主要的光受体色素参与植物的光合作用^[1];类胡萝卜素参与稳定光系统并使植株避免受到光伤害^[2,3]。叶绿素缺失突变体是研究叶绿素合成、叶绿体发育和光合作用等的理想材料。参与叶片中叶绿素合成途径中的基因已被明确鉴定^[4],然而,叶绿素代谢是一个复杂的代谢过程,仍有许多调控基因还未被鉴定。

水稻条纹叶表型受多个基因调控,其分子生物学机理较为复杂。影响叶绿体生物合成相关基因突变后造成叶片白条纹表型,研究表明水稻 *V3* 和 *St1* 基因在 3 叶期茎基部组织中高表达,即叶绿体发育第一阶段,这两个基因突变后影响质体 DNA 的合成,阻碍叶绿体分化^[5];水稻 *VI*、*V2* 和 *VYL* 基因分别在叶绿体发育的第二阶段高度积累,其突变影响叶绿体遗传机制的建立,阻碍叶绿体的形成,造成水稻白条纹表型^[6-10]。*WSL* 和 *WSL4* 属于 PPR 家族蛋白,与叶绿体中 RNA 代谢有关,其基因突变造成 *rpl2*、*ndhA*、*atpF* 等叶绿体转录本不能被正常剪切,导致叶片产生条纹^[11,12]。还有一类定位于叶绿体类核中的蛋白,这些蛋白的主要功能是参与质体转录,调控丙酮酸羧化酶(PEP)和 RNA 聚合酶有关基因的表达,如 *WSL3* 和 *YSSI1*,其突变后损坏 PEP 活性,造成白条纹表型^[13,14]。此外,编码钾离子通道蛋白的基因 *AMI* 突变后亦可造成叶片白条纹表型^[15]。

然而,目前关于幼穗中叶绿素合成和叶绿体发育的报道较少。李红昌等^[16]于粳交 F₆ 群体中获得一个白穗突变体,并将控制该性状的基因 *wp(t)* 定位于水稻第 1 染色体。同样地,控制白穗相关性状的基因 *WSLWP* 和 *WP4* 被分别定位在水稻第 7 染色体 87 kb 和第 8 染色体 79 kb 区间内^[17,18]。*WLP1* 基因编码一个 50S 核糖体大亚基蛋白 L13,其突变体 4 叶期之前显示明显的白化叶表型,4 叶期之后至抽穗期叶片表型正常,抽穗期幼穗呈现白化表型,低温下突变体表型更加明显^[19]。*WPI* 基因突变显示两种突变表型,严重时叶片白化,4 叶期植株死亡;轻微时叶片从苗期至开花期表现为条纹表型,抽穗后幼穗白化;该基因编码一个缬氨酸-tRNA 合成酶,主要参与调控叶绿体核糖体的发育^[20]。水稻幼苗条纹基因 *YSS2* 突变后植株在 2 叶期至 4 叶期表现出条纹表型,之后叶色正常,但在抽穗之前植株生长受到抑制,抽穗期叶片显示轻微的条纹表型,幼穗颖壳白化,成熟后种皮仍表现出白化性状^[21]。此外,一个控制水稻条白叶和白穗性状的基因 *St-wp* 与 *St1*

和 *Gws* 为等位基因,但其在性状上差异明显^[5,22,23]。这 3 个基因编码同一个蛋白,即核糖核苷酸还原酶小亚基蛋白(RNRS1)。RNRS1 是 DNA 复制和 DNA 损伤修复必不可少的酶之一,它能够催化核苷二磷酸形成脱氧核苷二磷酸,促进脱氧核苷二磷酸的生成^[24];酵母实验表明 RNRS1 能够与核糖核苷酸还原酶大亚基蛋白(RNRL1)互作形成异源二聚体,编码该蛋白的基因突变后减弱二聚体的形成,进而影响质体基因组的复制,抑制叶绿体的发育分化^[5]。

本研究利用 EMS 诱变粳稻品种 9311 获得一个条纹叶和白穗突变体 *shwp*,对其表型和农艺性状进行了分析考查,同时对该突变基因进行遗传分析和精细定位,并通过序列分析确定突变位点;通过突变分析揭示该基因不同位点突变对表型的影响;进一步通过表达分析明确该基因参与调控叶绿素合成、叶绿体发育以及光合作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻条纹叶和白穗突变体 *shwp* 由 EMS 处理粳稻品种 9311 变异获得,经过多代自交选择,性状稳定遗传。

1.2 光合色素含量测定

利用分光光度计法,测定 2 叶期、3 叶期和分蘖期不同叶片以及抽穗期颖壳中的光合色素含量。3 次重复。

1.3 主要农艺性状调查

将野生型和突变体同时播种移栽,种植密度为 16.67 cm×26.67 cm,种植面积为 6.67 m²,各 3 次重复。抽穗期调查播始历期,成熟期调查株高、穗长、有效穗数、每穗粒数、结实率、千粒重等农艺性状,10 次重复。收获后测量实际产量,3 次重复。

1.4 遗传分析和基因定位

利用 *shwp* 突变体与野生型 9311 正反交构建遗传分析群体,种植 F₂ 群体 1000~1200 株,统计正常单株与突变单株的株数,利用卡方测验进行遗传分析。构建 *shwp* 和农院 238 粳杂交 F₂ 群体,利用 10 个具有典型突变性状的 F₂ 单株和覆盖水稻 12 条染色体的 SSR 标记进行连锁分析,再利用 134 个 F₂ 突变单株进行初定位,进一步利用 851 个 F₂ 突变单株并开发新的 InDel 标记对目的基因进行精细定位。InDel 标记根据 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公布的 9311 与日本晴的插入/缺失差异,利用软件 Primer Premier 5.0 设计,基因定位引物序列

表 1 本研究所用引物的序列

Table 1. Primer sequences used in the study.

引物用途与名称 Usage and name	正向引物 Forward sequence(5'-3')	反向引物 Reverse sequence(5'-3')
定位和测序引物 Primers for mapping and sequencing		
C6-4	CAGTTAACACCAATCCAATCCA	CCAAATGGGCAGTAGTTTGAA
C6-5	GCTTCTCCCGAGTATGTCA	TGGTCTGAAAAGTGCCAAAA
C6-6	CCCCAAGCTTGTTGTCTCT	TGGGTCTTTGAGCTTCCTC
N4	TCAAGTTGCTAAACCTTATCTG	AGATGAACTGTGCTAAAAGATG
N12	GTAACCTAAAAGCCAATGTTGA	GAGTACTACCATCCATCCCTGT
N14	TCTGTGGACGTAGTAGGTTGA	CCTTCCTTAGGTCTGGCTC
slwp-g	ACAACCCCAAATCCCCATCCA	ACCACGCGCATGTATTACTACT
定量 PCR 引物 Primers for quantitative RT-PCR		
PORA	ATCACCAAGGGCTACGTCTC	GAGTTGTTGTTCCAGCTCCA
HEMA1	CACCAGTCTGAATCATAT	CTACCACTTCTCTAATCC
YGL1	TGGACAGTTGAAGATGTT	GAATAGGACGGTAAGGTT
CHLI	AGTAACCTTGGTGCTGTG	AATCCATCAACATTCAACTCTG
CHLH	CTATACATTGCCCACACT	TATCACACAACCTCCCAAG
CHLD	GGAAAGAGAGGGCATTAG	CAATACGATCAAGTAAGTGT
FtsZ	GTTGGTGTTTCTTCCAGCAA	CCTCAATAGACGACCCGATT
RpoTp2	AAGTCTGGCTTACGCTGGTT	AGGATCCTCAGCATTATCC
rpoA	AAATCGTTGATACGGCACAA	ATTCACATTTGAAACAGGCA
rpoB	GCAITGTTGGAAGTGGATTG	GCCGATGGGTAAGTAAAGGA
rbcL	GTTGAAAGGGATAAGTTGA	AATGGTTGTGAGTTTACG
rbcS	TCATCAGCTTCATCGCCTAC	ACTGGGAACACACGAAACAA
psbA	AAGTTTCTCTGATGGTATG	ATAGCACTGAATAGGGAA
psaA	GAGATACCACTTCCTCAT	ACTAAGAAATTCTGCGTATT
psaB	TTGGTATTGCTACCGCACAT	CCGGACGTCCATAGAAAGAT
psbB	TCATATTGCTGCGGGTACAT	AGTTGCTGACCCATACCACA
psbC	TACAACCTTGGCAAGAACGA	TACGCCACCCACAGAAATTA
SLWP	AGTAATACATGCGCGTGGTG	ACACGGGCAGCTGATACTAA
RNRS2	AGATGTACAACGTCGCCAAC	GACATTACGGACGCCTTCTG
Ubq	GCTCCGTGGCGGTATCAT	CGGCAGTTGACAGCCCTAG

见表 1。利用引物 slwp-g(表 1)对突变体和野生型的基因组 DNA 进行扩增, 测序获得核糖核苷二磷酸还原酶小亚基基因(*RNRS1*, LOC_Os06g14620)的序列差异。PCR 程序为: 95℃下 5 min; 95℃下 30 s, 55℃下退火 30 s, 72℃下延伸(1 min/kb), 34 个循环; 72℃下 5 min; 4℃下 10 min。

1.5 序列分析和蛋白三维结构预测

利用 RGAP(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)数据库预测基因功能, 用 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库蛋白搜索功能预测结构域, 并查询与 SLWP 蛋白高度同源的序列, 采用 Bioedit 软件进行同源比对。利用 SWISS-MODEL(<https://www.swissmodel.expasy.org/>)软件预测蛋白三维结构。

1.6 定量 PCR 分析

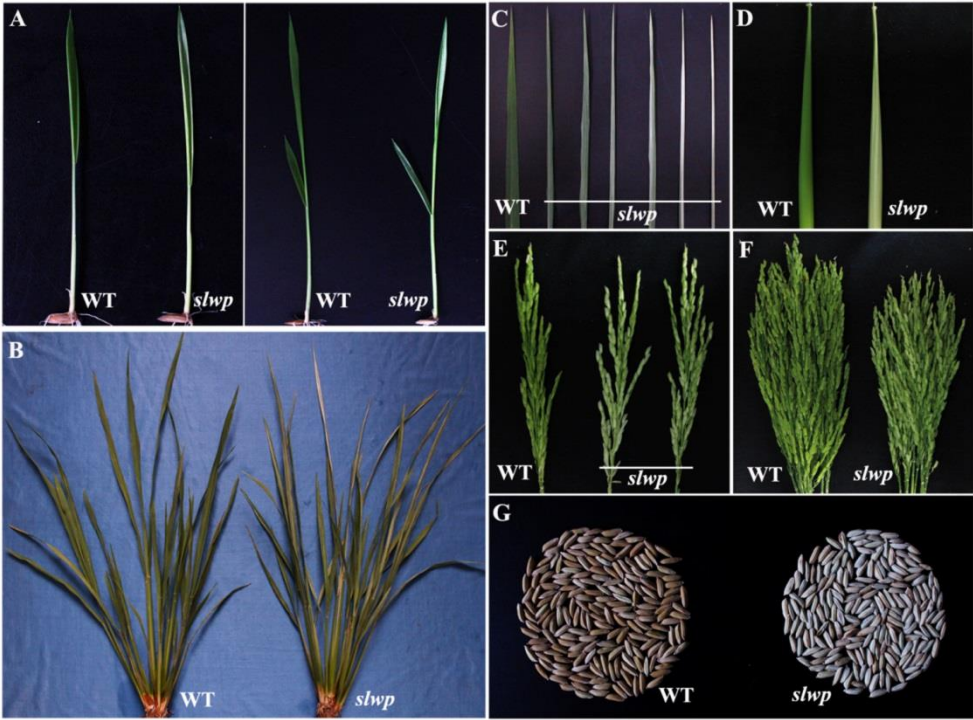
利用天根 RNA 提取试剂盒(RNA prep pure plant kit)提取 3 叶期突变体 *slwp*、野生型(9311)和中

花 11 叶片以及抽穗初期 9311 和中花 11 幼穗中的总 RNA。采用 TaKaRa 反转录试剂盒(SuperScript II kit)反转录得到 cDNA, 于-20℃下保存备用。采用 TaKaRa 试剂盒(SYBR® Premix Ex Taq™ kit)和 Roche 定量 PCR 仪(LightCycler 480 Real-Time PCR System)进行定量 PCR, 以 *Ubiquitin* 基因(LOC_Os03g13170)为内参, 利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析结果。定量 PCR 引物及其序列见表 1^[14]。

2 结果与分析

2.1 突变体 *slwp* 的表型分析

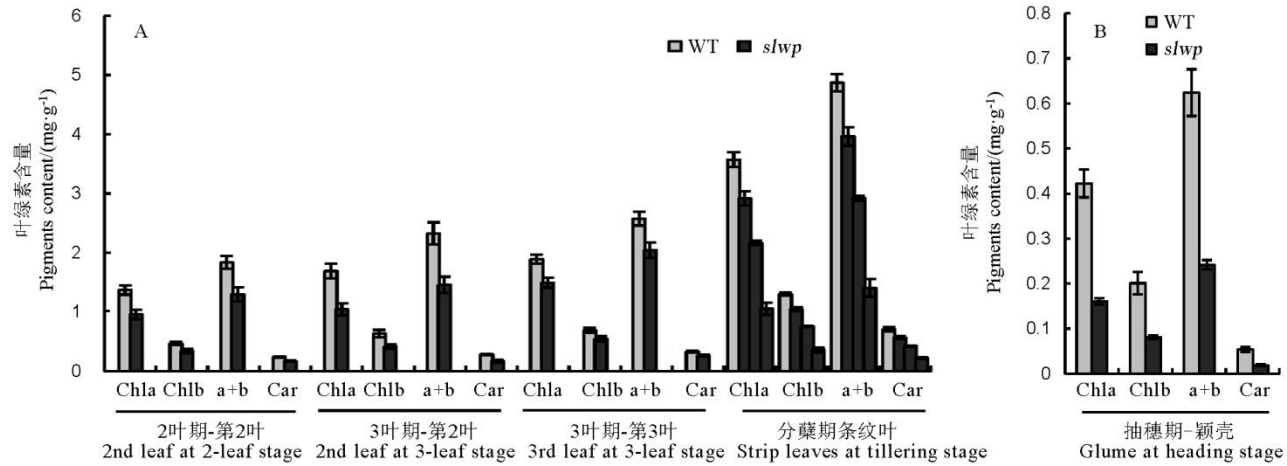
突变体 *slwp* 从 2 叶期开始表现出条纹叶表型, 3 叶期表型更加明显(图 1-A), 分蘖期表型持续, 各叶片显示出不同程度的缺绿(图 1-B、C), 抽穗期植株叶鞘也表现出条纹表型(图 1-D), 同时幼穗明显



A—2 叶期和 3 叶期表型；B 和 C—分蘖期叶片表型；D—孕穗期叶鞘表型；E 和 F—抽穗期幼穗表型；G—种子表型。
A, Phenotypes of two- and three-leaf stages; B and C, Leaf phenotype of tillering stage; D, Sheath phenotype of booting stage; E and F—Panicle phenotype of heading stage; G, Seed phenotype.

图 1 突变体 *slwp* 和野生型的表型性状

Fig. 1. Phenotypic characteristics of the *slwp* mutant and its wild type(WT).



chl_a—叶绿素 a；chl_b—叶绿素 b；a+b—总叶绿素；Car—胡萝卜素。
Chla, Chlorophyll a; chl_b, Chlorophyll b; a+b, Total chlorophyll; Car—Carotene.

图 2 突变体 *slwp* 和野生型色素含量测定

Fig. 2. Pigments determination of the *slwp* mutant and its wild type(WT).

白化(图 1-E、F)，成熟期野生型水稻颖壳为金黄色，而突变体颖壳仍为白色(图 1-G)。

色素含量分析表明，2 叶期和 3 叶期不同叶片中叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素含量明显低于野生型，分蘖期叶片叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素含量与野生型相比分别降低了 18.3%~70.5%、19.3%~72.7%、18.6%~71.1%

和 19.2%~68.0%(图 2-A)。抽穗期突变体 *slwp* 颖壳叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素含量显著低于野生型(图 2-B)。

2.2 突变体 *slwp* 的农艺性状观察

农艺性状调查显示，突变体与野生型相比，其株高、穗长、每穗粒数和千粒重明显降低，抽穗期延长，理论产量降低，实际产量不足野生型的一半；

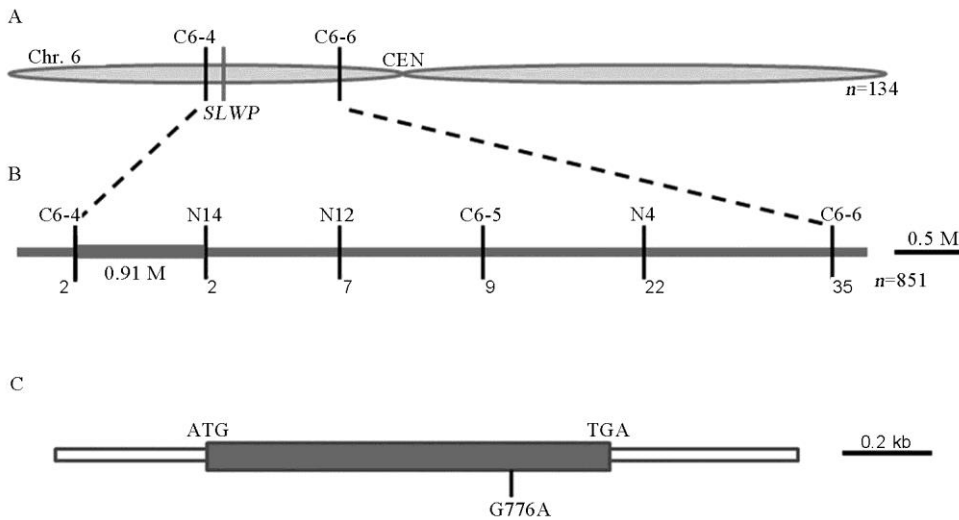
表 2 野生型和突变体的农艺性状分析

Table 2. Agronomic traits of the wild type (WT) and *slwp* mutant.

农艺性状 Agronomic trait	野生型 Wild type	突变体 <i>slwp</i>
株高 Plant height / cm	124.7±3.4	98.2±4.8**
播始历期 Days from sowing to heading / d	98.4±1.2	108.3±1.0**
穗长 Panicle length / cm	25.5±1.1	22.1±1.3**
有效穗数 Number of effective panicles per plant	7.1±1.4	6.6±1.7
每穗粒数 Grain number per panicle	245.1±32.6	145.0±21.0**
结实率 Seed-setting rate / %	88.2±1.3	87.9±1.6
千粒重 1000-grain weight / g	30.8±0.4	27.9±0.6**
理论产量 Theoretical yield per plot / kg	10.74±0.23	5.34±0.35**
实际产量 Actual yield per plot / kg	9.16±0.26	4.43±0.47**

数据结果为 10 次重复, 来源于 2015 年合肥正季, 种植密度为 16.67 cm × 26.67 cm, 种植面积为 6.67 m². ***P*<0.01.

Values are the mean±SD from ten replications in Hefei, in 2015. The planting density was 16.67 × 26.67 cm. The area per plot was 6.67 m². ***P*<0.01.



A—*SLWP* 基因初定位; B—*SLWP* 基因精细定位; C—*SLWP* 基因结构和突变位点; ATG 和 TGA 分别代表起始密码子和终止密码子。

A, Initial mapping of the *SLWP* gene; B, Fine mapping of the *SLWP* gene; C, Structure and mutant site of the *SLWP* gene; ATG and TGA indicate initiation codon and termination codon, respectively.

图 3 *SLWP* 基因的图位克隆

Fig. 3. Map-based cloning of the *SLWP* gene.

有效穗数和结实率没有显著差异(表 2)。

2.3 *SLWP* 遗传分析和基因定位

构建 *slwp* 突变体与野生型 9311 的正反交 F₂ 群体进行遗传分析。F₁ 均表现出正常的野生型表型, *slwp*/9311 的 F₂ 群体中正常叶色植株 893 株, 条纹叶植株 284 株, 卡方测验正常叶色与条纹叶植株的分离比符合 3 : 1($\chi^2=0.476<\chi^2_{0.05}=3.84$), 9311/*slwp* 的 F₂ 群体中正常叶色植株 734 株, 条纹叶植株 264 株, 卡方测验正常叶色与条纹叶植株的分离比符合 3 : 1($\chi^2=1.124<\chi^2_{0.05}=3.84$), 这些结果表明该突变性状受单隐性核基因控制。

同时构建 *slwp* 突变体与农院 238 的籼粳交 F₂ 定位群体。首先利用 10 个具有典型突变体表型的

F₂ 单株以及与突变表型连锁的分子标记将目的基因初定位到第 6 染色体短臂, 选取 134 个 F₂ 突变单株进行初定位, 将目的基因定位于标记 C6-4 和 C6-6 之间(图 3-A)。进一步利用 851 个 F₂ 突变单株, 开发新的 InDel 标记, 将目的基因定位于标记 C6-4 和 N14 之间 0.91 Mb 区间内(图 3-B)。对该定位区间进行基因预测, 发现一个与水稻叶片条纹和白穗有关的基因, 即核糖核苷二磷酸还原酶小亚基基因(LOC_Os06g14620)。基因组测序显示, *SLWP* 在该基因编码区的第 776 个碱基由 G 突变为 A, 导致甘氨酸突变为天冬氨酸(图 3-C)。

2.4 *SLWP* 及其同源蛋白的序列分析

序列分析显示 *SLWP* 基因编码一个含 339 个氨

OsSLWP	MPAAPT---	VPACDLEPTLAESESRFSMFPIRYPQIWEYKKAASFWTAEEVDLSA	56
AT3G23580	MSLKEGGQGRDMEEGE	SEPTLMAQNRFTIMFPIRYKSIWEYKKAASFWTAEEVDLST	60
Gm_XP_003547645.1	MPSIP-----	BEPTLAPNDRFCMFPIRYPQIWEYKKAASFWTAEEVDLSQ	48
Zm_NP_001130908.2	MPSAPAL---	VPACDMCEPTLAESSDRFSMFPIRYPQIWEYKKAASFWTAEEVDLSA	56
Nt_NP_001312237.1	MPLIP-----	BEPTLASSPDRFCMFPIRYPQIWEYKKAASFWTAEEVDLSS	48
Pp_XP_001768501.1	MIALDQ-----	KEPTLVENPNRFTIMEPIRYPCVWEYKKAASFWTAEEVDLSA	49
OsSLWP	DARFWDAA	LSPEERHFISHVLAFFAASDGIVLENLASRFMSDVCVFEARAFYGFQIAIEN	116
AT3G23580	DVQQWEA-L	TDSEKHFISHVLAFFAASDGIVLENLASRFRLNDVCVFEARAFYGFQIAIEN	119
Gm_XP_003547645.1	DLRFWDS-L	TDGERHFISHVLAFFAASDGIVLENLASRFKKEICIFEARAFYGFQIAIEN	107
Zm_NP_001130908.2	DARFWDAA	LSPEERHFISHVLAFFAASDGIVLENLASRFMSDVCVFEARAFYGFQIAIEN	116
Nt_NP_001312237.1	DTRRWET-L	TPGERHFITHVLAFFAASDGIVLENLASRFMKEVCVFEARAFYGFQIAIEN	107
Pp_XP_001768501.1	DSKRWET-L	DDERHFISHVLAFFAASDGIVLENLASRFMKEICIFEARAFYGFQIAIEN	108
OsSLWP	IHSEMYSL	LLETYIRDGAEKORLFAIDTVPVRRKADWAMRWIDGGERFAERLVAFAVCV	176
AT3G23580	IHSEMYSL	LLETYIKDSKEKDRLEFAITETIPCISSKAKWCLDIQSPMSFAERLVAFAVCV	179
Gm_XP_003547645.1	IHSEMYSL	LLETYIKDSSCKSLFAIDTIPCVTKKAWLRWIDSSDSFAERLVAFAVCV	167
Zm_NP_001130908.2	IHSEMYSL	LLETYIRDGTEKORLFAITETVPVRRKADWAMRWIDGGERFAERLVAFAVCV	176
Nt_NP_001312237.1	IHSEMYSL	LLETYIKDSKEKDRLEFAITETIPCVKAKWLRWIDGSETFAERLVAFAVCV	167
Pp_XP_001768501.1	IHSEMYSL	LLETYIKDQAEKSLFAITETIPCVARKADWLRWIDSGSFAERLVAFAVCV	168
OsSLWP	EGIFFSGS	FCAIFWLKKRGLMPGLTFSNELISRDEGLHCDFACLLYLLRQKLDFAFVRE	236
AT3G23580	EGIFFSGS	FCAIFWLKKRGLMPGLTFSNELISRDEGLHCDFACLLYSLLQKLPLEKVVQ	239
Gm_XP_003547645.1	EGIFFSGS	FCAIFWLKKRGLMPGLTFSNELISRDEGLHCDFACLLYSLLRQKLTERRVRE	227
Zm_NP_001130908.2	EGIFFSGS	FCAIFWLKKRGLMPGLTFSNELISRDEGLHCDFACLLYLLRQKLDSEFVRE	236
Nt_NP_001312237.1	EGIFFSGS	FCAIFWLKKRGLMPGLTFSNELISRDEGLHCDFACLLYSLLRQKLTERRVKG	227
Pp_XP_001768501.1	EGIFFSGS	FCAIFWLKKRGLMPGLTFSNELISRDEGLHCDFACLLYLLRQKLTERRVRE	228
OsSLWP	IVADAVD	IEREFVCDALPVAVIGMNSDLMSCYIEFVADRLLMALGCKKYNVANPFDWME	296
AT3G23580	IVAEAVD	IEREFVCKALPCDILGMNSNLMSCYIEFVADRLLVTLGCERTYKAENPFDWME	299
Gm_XP_003547645.1	IVKDAVD	IEREFVCDALPCATVIGMNSDLMSCYIEFVADRLLMALGCKKYNVANPFDWME	287
Zm_NP_001130908.2	IVADAVD	IEREFVCDALPVAVIGMNSDLMSCYIEFVADRLLMALGCKKYNVANPFDWME	296
Nt_NP_001312237.1	IVADAVD	IEREFVCDALPCATVIGMNSDLMSCYIEFVADRLLMALGCKKYNVANPFDWME	287
Pp_XP_001768501.1	IVAEAVD	IEREFVCDALPCDILGMNSDLMSCYIEFVADRLLVSLGKRYNANPFDWME	288
OsSLWP	LISLQGKT	NFFEKRVGQYQKASVMSNLNGGASANHVFSEIDEDF	339
AT3G23580	LISLQGKT	NFFEKRVGQYQKASVMSNLQNGN-QNYEFTTEDEDF	341
Gm_XP_003547645.1	LISLQGKT	NFFEKRVGQYQKASVMSNLNGGGNHVFKMDEDF	330
Zm_NP_001130908.2	LISLQGKT	NFFEKRVGQYQKASVMSNLNGGAANHVFSEIDEDF	339
Nt_NP_001312237.1	LISLQGKT	NFFEKRVGQYQKASVMSNLNGG-ATHEFKLDEDF	329
Pp_XP_001768501.1	LISLQGKT	NFFEKRVGQYQKASVMSNLNGGDTNNHVFRLDEDF	331

序列来源于水稻 LOC_Os06g14620(SLWP)、拟南芥 At3g23580、大豆 XP_003547645.1、玉米 NP_001130908.2、烟草 NP_001312237.1 和小立碗藓 XP_001768501.1; 下划线代表核糖核苷酸还原酶结构域; ST1、STWP、GWS 和 SLWP 蛋白突变位点以红色字体和线框标出。

Sequences are for *Oryza sativa* LOC_Os06g14620(SLWP), *Arabidopsis thaliana* At3g23580, *Glycine max* XP_003547645.1, *Zea mays* NP_001130908.2, *Nicotiana tabacum* NP_001312237.1 and *Physcomitrella patens* XP_001768501.1; Underline represents nucleotide reductase domain; Red font and frame indicate mutant sites of ST1, STWP, GWS and SLWP.

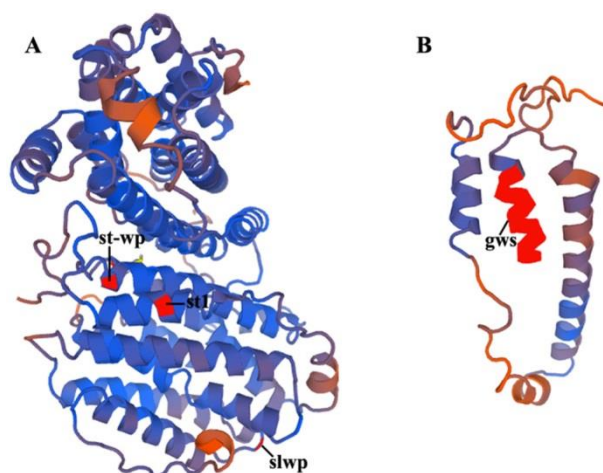
图 4 SLWP 及其同源蛋白的序列比对

Fig. 4. Alignment of SLWP and SLWP-related proteins of different organisms.

氨基酸残基的蛋白且只含有 1 个外显子(图 3-C)。蛋白结构域预测发现该蛋白 15—296 氨基酸为核苷酸还原酶结构域, 该区域高度保守。同源分析表明 SLWP 蛋白与其他物种如拟南芥、大豆、玉米、烟草和小立碗藓中的同源蛋白具有很高的相似性(图 4)。

2.5 SLWP 变异分析

SLWP 基因与水稻中已报道的 *st1*、*gws* 和 *st-wp* 为等位基因, 蛋白的各突变位点均在核苷酸还原酶结构域内, 且都是高度保守的氨基酸序列。*st1*、*st-wp* 和 *slwp* 分别在该蛋白的第 40、103 和 259 位点发生单氨基酸突变, *gws* 突变后编码一个只有 118 个氨基酸残基的截断蛋白, 且 105 位至 118 位氨基酸与野生型不同(图 4), 同时利用蛋白三维结构预测 SLWP 蛋白及其等位突变蛋白结构, 发现 *st1*、*st-wp* 和 *slwp* 蛋白突变分别发生在 α 螺旋内或靠近 α 螺旋位置(图 5-A), *gws* 蛋白严重缺失了该蛋白的重要



A—*st1*、*st-wp* 和 *slwp*; B—突变蛋白 *gws*; 红色表示突变位点。

A—*st1*, *st-wp* and *slwp*; B—Mutant protein *gws*; The red regions represent mutant sites.

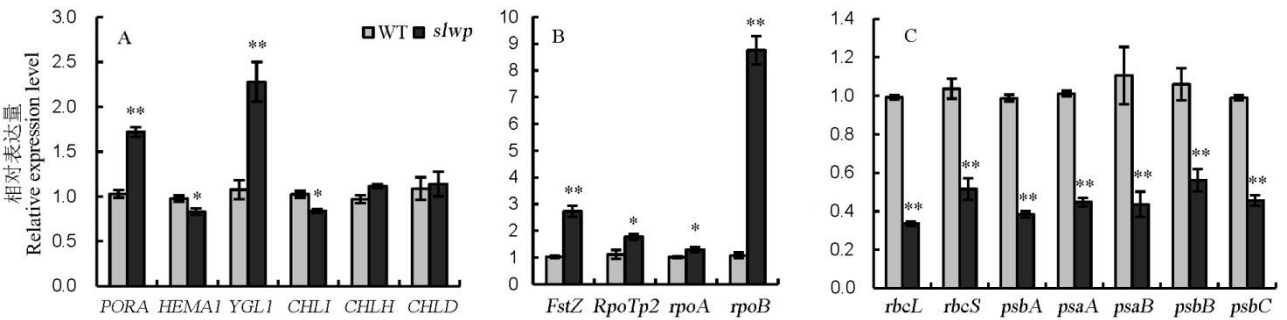
图 5 蛋白三维结构预测

Fig. 5. Prediction of 3D structure model.

表 3 *SLWP* 变异分析

Table 3. Mutation analysis of *SLWP*.

突变体	野生型	氨基酸突变位点	叶片表型	穗部表型	主要农艺性状变化
Mutant	Wild type	Mutant site of amino acid	Leaf phenotype	Panicle phenotype	Agronomic trait change compared with its wild type
<i>stl</i>	FL176	p. Lys40Arg	4 或 5 叶期至分蘖期出现条纹; 抽穗后表型恢复 Display stripe from 4- or 5-leaf stage to tillering, then revert to normal after heading	无 None	无 None
<i>gws</i>	日本晴 Nipponbare	104 原有+插入 14 个氨基酸 104 original+Inserted 14 amino acid residues	苗期至抽穗期叶片均出现条纹 Display stripe from the seedling to heading stage	无 None	株高、穗长、有效分蘖数、结实率、千粒重、单株生物量均降低 Decreased plant height, panicle length, tiller number, seed-setting rate, 1000-grain weight, and plant biomass per plant
<i>st-wp</i>	9311	p. Glu103Val	苗期至抽穗期叶片均出现条纹 Display stripe from the seedling to heading stage	白穗 White panicle	株高、穗长、每穗粒数、结实率、千粒重降低, 抽穗期延长, 有效穗数不变 Decreased plant height, panicle length, grain number per panicle, seed-setting rate, and 1000-grain weight; prolonged heading date; similar tiller number
<i>slwp</i>	9311	p. Gly259Asp	苗期至抽穗期叶片出现条纹 Display stripe from the seedling to heading stage	白穗 White panicle	株高、穗长、每穗粒数、千粒重、理论产量、实际产量下降, 抽穗期延长, 有效穗数和结实率不变 Decreased plant height, panicle length, grain number per panicle, 1000-grain weight, theoretical yield, and actual yield; prolonged heading date, similar tiller number and seed-setting rate



A—叶绿素合成相关基因表达分析; B—叶绿体发育相关基因表达分析; C—光合作用相关基因表达分析。*和**分别表示 5% 和 1% 显著水平。
A, Expression analysis of genes associated with chlorophyll biosynthesis; B, Expression analysis of genes associated with chloroplast development; C, Expression analysis of genes associated with photosynthesis. * and ** represent significant difference at 5% and 1% levels, respectively.

图 6 野生型和突变体中叶绿素合成、叶绿体发育和光合作用相关基因的表达分析

Fig. 6. Expression analysis of genes involved in chlorophyll biosynthesis, chloroplast development and photosynthesis between wild type(WT) and mutant.

结构域(图 5-B)。

SLWP 蛋白不同位点突变导致不同的表型变化。*stl* 由粳稻品种 FL176 突变而来, 从 4 叶期或 5 叶期至分蘖期表现出明显的条纹表型, 抽穗后表型恢复^[5]; *gws* 由粳稻品种日本晴突变而来, 从苗期开始直至抽穗期叶片均表现出条纹表型, 其农艺性状与野生型相比发生较大变化, 其株高、穗长、分蘖数、结实率、千粒重和单株生物量均明显降低^[22]; *st-wp* 由籼稻品种 9311 突变而来, 从苗期至抽穗期叶片均显示条纹表型, 抽穗后幼穗白化, 农艺性状与野生型相比差异较大, 其株高、穗长、每穗粒数、结实率、千粒重明显降低, 抽穗延迟, 分蘖数无明显差异^[23]; *slwp* 突变表型与 *st-wp* 较为相似, 但 *slwp* 突变体中结实率与野生型差异不显著(表 3)。这些等位突变体在叶片中均有条纹表型, 除 *stl* 农艺性状

不变外, 其他 3 个突变体水稻产量均降低; 此外, 粳稻突变体 *stl* 和 *gws* 未出现白穗。

2.6 叶绿素合成、叶绿体发育和光合作用相关基因表达分析

进一步利用定量方法对突变体和野生型中叶绿素合成、叶绿体发育和光合作用有关的基因进行表达分析。叶绿素合成相关基因在突变体中受到不同程度的调控, 与野生型相比, NADPH 原叶绿素酸酯氧化还原酶基因 *PORA* 和叶绿素合成酶基因 *YGL1* 表达明显上调, 谷氨酰-tRNA 还原酶 *HEMA1* 基因和镁离子螯合酶 I 亚基基因 *CHLI* 表达下调, 镁离子螯合酶亚基基因 *CHLH* 和 *CHLD* 无显著差异(图 6-A); 参与叶绿体分化第一阶段(*FtsZ* 编码质体分化机制原件)和第二阶段相关基因(*RpoTp2* 编码 NEP 蛋白, *rpoA* 和 *rpoB* 分别编码 PEP α 和 β 亚基)

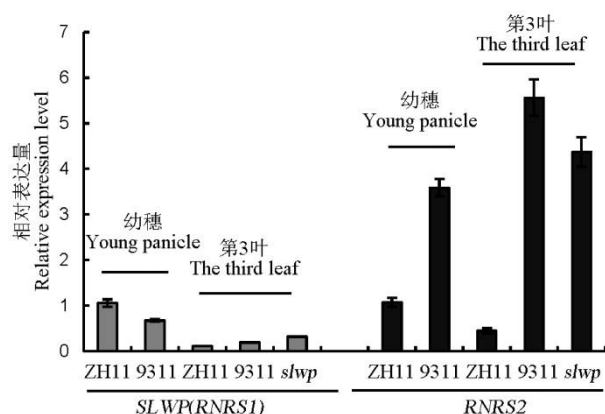


图 7 *SLWP(RNRS1)* 和 *RNRS2* 在中花 11(ZH11)、9311 和 *slwp* 突变体不同组织中的表达分析

Fig. 7. Expression analysis of *SLWP (RNRS1)* and *RNRS2* in different tissues of ZH11, 9311 and *slwp* mutant.

表达明显上调(图 6-B); 编码核酮糖 1,5 二磷酸羧化酶大小亚基基因 *rbcL* 和 *rbcS*、编码光系统 I 复合体亚基基因 *psaA* 和 *psaB* 以及编码光系统 II 复合体亚基基因 *psbA*, *psbB* 和 *psbC* 在突变体中表达明显下调(图 6-C)。定量 PCR 检测 *SLWP(RNRS1)* 及其同源基因 *RNRS2* 基因在粳稻中花 11 和籼稻 9311 相同时期不同组织中的表达差异, 结果表明 *SLWP (RNRS1)* 基因在中花 11 和 9311 的幼穗和幼叶中表达差异明显, *RNRS2* 基因在 9311 的幼穗和幼叶中表达水平明显高于中花 11(图 7)。

3 讨论

目前, 已克隆了大量通过不同途径参与叶片中叶绿素合成和叶绿体发育的叶色基因^[5-15]。然而, 影响幼穗中叶绿素合成和叶绿体发育相关基因的报道较少, 其中 *WLP1*、*WPI*、*ST-WP* 以及 *YSS2* 已被克隆^[19-21,23]。白穗突变体往往在苗期即显示出明显的白条纹性状, 抽穗期叶片呈现不同粗细的条纹。幼穗白化突变体往往株高降低, 植株生长延缓, 植株主要农艺性状变差进而产量下降^[21,23]。

本研究通过自然变异获得一个幼穗白化突变体 *slwp*, 经基因精细定位和克隆发现该基因编码一个核糖核苷酸还原酶小亚基蛋白 *RNRS1*, 并与已报道的 *ST-WP*、*GWS* 和 *STI* 为等位基因, 但突变位点不同, 且在表型和农艺性状上存在差异。从表型上来看, *gws*、*st-wp* 和 *slwp* 突变体从苗期至抽穗期叶片均显示白条纹性状, *stI* 突变体叶片从 4 叶或 5 叶期至分蘖期表现白条纹, 抽穗后恢复, 农艺性状上, *stI* 抽穗后期与野生型无显著差异; *gws*、*st-wp* 和 *slwp* 均显示出株高、穗长、千粒重降低的表型,

推测 *stI* 突变可能不影响核糖核苷酸还原酶结构域的功能, 该突变位点可利用基因编辑技术应用于水稻育种。此外, *stI* 和 *gws* 由粳稻品种突变得到, 未显示白穗表型, 而 *st-wp* 和 *slwp* 由籼稻品种突变而来, 显示明显的幼穗白化。为了解释这一现象, 我们观察 F_2 定位群体中条纹和白穗表型情况, 发现抽穗期幼穗白化与叶片条纹性状是紧密连锁的, 初步排除籼粳遗传背景的影响; *SLWP(RNRS1)* 基因在中花 11 和 9311 的幼穗和幼叶中表达差异明显(图 7), 暗示该基因突变后在籼粳之间的表型差异可能受其自身表达的影响; *RNRS2* 在 9311 的幼穗和幼叶中表达水平明显高于中花 11(图 7), 其在粳稻背景下的表达水平低于 *RNRS1*^[5], 但在籼稻中的表达明显高于 *RNRS1*(图 7), 这些数据说明 *RNRS2* 在籼稻与粳稻中行使的功能可能存在较大差异, 可能与籼粳之间 *RNRS1* 基因突变造成的表型差异有关。 *RNRS1* 在 *slwp* 突变体中表达明显高于野生型, 而 *RNRS2* 在 *slwp* 突变体中表达明显低野生型(图 7), 这与 Yoo 等^[5]研究结果一致。

RNRS1(STI) 在茎基部组织中高度表达, 说明其在叶绿体发育第一阶段, 即质体分化和质体 DNA 合成中行使重要功能, *stI* 突变体中 dNTPs 水平明显低于野生型, 表明 *stI* 中质体 DNA 合成受阻^[5]。 *slwp* 突变体中幼穗白化, 说明 *RNRS1* 在幼穗发育早期发挥作用, 该基因突变可能阻碍幼穗中质体 DNA 的合成, 进而抑制叶绿体的分化, 降低叶绿素水平。叶绿素合成相关基因在 *slwp* 中受到不同程度调控(图 6-A), 暗示 *RNRS1* 可能参与调控叶绿素合成网络; 叶绿体发育第一阶段和第二阶段相关基因表达上调(图 6-B), 说明叶绿体发育受 *RNRS1* 调控; 编码光系统 I 和 II 复合体亚基的基因在突变体中表达明显下调(图 6-C), 暗示 *slwp* 中光合作用可能受到抑制, *slwp* 影响农艺性状, 降低产量可能与此有关。本研究对于探索相同基因不同等位突变在不同遗传背景下行使不同功能的原因具有重要意义。

参考文献:

- [1] Fromme P, Melkozernov A, Jordan P, Krauss N. Structure and function of photosystem I: interaction with its soluble electron carriers and external antenna systems. *FEBS Lett*, 2003, 555: 40-44.
- [2] Lokstein H, Tian L, Polle J E W, DellaPenna D. Xanthophyll biosynthetic mutants of *Arabidopsis thaliana*: Altered nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence is due to changes in Photosystem II antenna size and stability. *Biochim*

- Biophys Acta*, 2002, 1553: 309-319.
- [3] Lv M Z, Chao D Y, Shan J X, Zhu M Z, Shi M, Gao J P, Lin H X. Rice carotenoid b-ring hydroxylase CYP97A4 is involved in lutein biosynthesis. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53: 987-1002.
 - [4] Nagata N, Tanaka R, Satoh S, Tanaka A. Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of *Prochlorococcus* species. *Plant Cell*, 2005, 17(1): 233-240.
 - [5] Yoo S C, Cho S H, Sugimoto H, Li J, Kusumi K, Koh H J, Iba K, Paek N C. Rice *Virescent3* and *Stripe1* encoding the large and small subunits of ribonucleotide reductase are required for chloroplast biogenesis during early leaf development. *Plant Physiol*, 2009, 150: 388-401.
 - [6] Kusumi K, Mizutani A, Nishimura M, Iba K. A virescent gene *VI* determines the expression timing of plastid genes for transcription/translation apparatus during early leaf development in rice. *Plant J*, 1997, 12: 1241-1250.
 - [7] Kusumi K, Sakata C, Nakamura T, Kawasaki S, Yoshimura A, Iba K. A plastid protein NUS1 is essential for build-up of the genetic system for early chloroplast development under cold stress conditions. *Plant J*, 2011, 68: 1039-1050.
 - [8] Sugimoto H, Kusumi K, Tozawa Y, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S, Iba K. The *virescent-2* mutation inhibits translation of plastid transcripts for the plastid genetic system at an early stage of chloroplast differentiation. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 985-996.
 - [9] Sugimoto H, Kusumi K, Noguchi K, Yano M, Yoshimura A, Iba K. The rice nuclear gene, *VIRESCENT 2*, is essential for chloroplast development and encodes a novel type of guanylate kinase targeted to plastids and mitochondria. *Plant J*, 2007, 52: 512-527.
 - [10] Dong H, Fei G L, Wu C Y, Wu F Q, Sun Y Y, Chen M J, Ren Y L, Zhou K N, Cheng Z J, Wang J L, Jiang L, Zhang X, Guo X P, Lei C L, Su N, Wang H Y, Wan J M. A rice *virescent-yellow leaf* mutant reveals new insights into the role and assembly of plastid caseinolytic protease in higher plants. *Plant Physiol*, 2013, 162: 1867-1880.
 - [11] Tan J, Tan Z, Wu F, Sheng P, Heng Y, Wang X, Ren Y, Wang J, Guo X, Zhang X, Cheng Z, Jiang L, Liu X, Wang H, Wan J. A novel chloroplast-localized pentatricopeptide repeat protein involved in splicing affects chloroplast development and abiotic stress response in rice. *Mol Plant*, 2014, 7: 1329-1349.
 - [12] Wang Y, Ren Y, Zhou K, Liu L, Wang J, Xu Y, Zhang H, Zhang L, Feng Z, Wang L, Ma W, Wang Y, Guo X, Zhang X, Lei C, Cheng Z, Wan J. *WHITE STRIPE LEAF4* encodes a novel P-type PPR protein required for chloroplast biogenesis during early leaf development. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1116.
 - [13] Wang L, Wang C, Wang Y, Niu M, Ren Y, Zhou K, Zhang H, Lin Q, Wu F, Cheng Z, Wang J, Zhang X, Guo X, Jiang L, Lei C, Wang J, Zhu S, Zhao Z, Wan J. WSL3, a component of the plastid-encoded plastid RNA polymerase, is essential for early chloroplast development in rice. *Plant Mol Biol*, 2016, 92: 581-595.
 - [14] Zhou K N, Ren Y L, Zhou F, Wang Y, Zhang L, Lyu J, Wang Y H, Zhao S L, Ma W W, Zhang H, Wang L W, Wang C M, Wu F Q, Zhang X, Guo X P, Cheng Z J, Wang J L, Lei C L, Jiang L, Li Z F, Wan J M. *Young Seedling Stripe1* encodes a chloroplast nucleoid-associated protein required for chloroplast development in rice seedlings. *Planta*, 2017, 245: 45-60.
 - [15] Sheng P, Tan J, Jin M, Wu F, Zhou K, Ma W, Heng Y, Wang J, Guo X, Zhang X, Cheng Z, Liu L, Wang C, Liu X, Wan J. *Albino midrib 1*, encoding a putative potassium efflux antiporter, affects chloroplast development and drought tolerance in rice. *Plant Cell Rep*, 2014, 33: 1581-1594.
 - [16] 李红昌, 钱前, 王赞, 李晓波, 朱立煌, 徐吉臣. 水稻白穗突变体基因的鉴定和染色体定位. 科学通报, 2003, 48(3): 268-270.
Li H C, Qian Q, Wang Y, Li X B, Zhu L H, Xu J C. Identification and gene mapping of white panicle mutant in rice. *Chin Sci Bull*, 2003, 48(3): 268-270. (in Chinese with English abstract)
 - [17] 金怡, 刘合芹, 汪得凯, 陶跃之. 一个水稻苗期白条纹及抽穗期白穗突变体的鉴定和基因定位. 中国水稻科学, 2011, 25(5): 461-466.
Jin Y, Liu H Q, Wang D K, Tao Y Z. Genetic analysis and gene mapping of a white striped leaf and white panicle mutant in rice. *Chin J Rice Sci*, 2011, 25(5): 461-466. (in Chinese with English abstract)
 - [18] 王晓雯, 蒋钰东, 廖红香, 杨波, 邹帅宇, 朱小燕, 何光华, 桑贤春. 水稻白穗突变体 *wp4* 的鉴定与基因精细定位. 作物学报, 2015, 41(6): 838-844.
Wang X W, Jiang Y D, Niao H X, Yang B, Zou S Y, Zhu X Y, He G H, Sang X C. Identification and gene mapping of white panicle mutant *wp4* in *Oryza sativa*. *Acta Agron Sin*, 2015, 41(6): 838-844. (in Chinese with English abstract)
 - [19] Song J, Wei X J, Shao G N, Sheng Z H, Cheng D, Liu C, Jiao G A, Xie L H, Tang S Q, Hu P S. The rice nuclear gene *WLPI* encoding a chloroplast ribosome L13 protein is needed for chloroplast development in rice grown under low temperature conditions. *Plant Mol Biol*, 2014, 84: 301-314.
 - [20] Wang Y L, Wang C M, Zheng M, Lyu J, Xu Y, Li X H, Niu M, Long W H, Wang D, Wang H Y, Terzaghi W, Wang Y H, Wan J M. *WHITE PANICLE1*, a Val-tRNA synthetase regulating chloroplast ribosome biogenesis in rice, is essential for early chloroplast development. *Plant*

- Physiol*, 2016, 170: 2120-2123.
- [21] Zhou K N, Xia J F, Wang Y L, Ma T C, Li Z F. A *Young Seedling Stripe2* phenotype in rice is caused by mutation of a chloroplast-localized nucleoside diphosphate kinase 2 required for chloroplast biogenesis. *Genet Mol Biol*, 2017, 40: 630-642.
- [22] 许凤华, 程治军, 王久林, 吴自明, 孙伟, 张欣, 雷财林, 王洁, 吴赴清, 郭秀平, 刘玲珑, 万建民. 水稻白条纹叶 *Gws* 基因的精细定位与遗传分析. 作物学报, 2010, 36(5): 713-720.
- Xu F H, Cheng Z J, Wang J L, Wu Z M, Sun W, Zhang X, Lei C L, Wang J, Wu F Q, Guo X P, Liu L L, Wan J M. Genetic analysis and fine-mapping of *Gws* gene using *green-white-stripe* rice mutant. *Acta Agron Sin*, 2010, 36(5): 713-720. (in Chinese with English abstract)
- [23] 陈叶平, 翟哲, 杨文君, 孙健, 舒小丽, 吴殿星. 水稻条白叶和白穗突变基因 *St-wp* 的遗传分析与精细定位. 核农学报, 2015, 29(7): 1246-1252.
- Chen Y P, Zhai Z, Yang W J, Sun J, Shu X L, Wu D X. Genetic analysis and fine mapping of *St-wp* gene in mutant rice with stripe white leaf and white panicle. *Acta Agric Nucl Sin*, 2015, 29(7): 1246-1252. (in Chinese with English abstract)
- [24] Eriksson M, Uhlin U, Ramaswamy S, Ekberg M, Regnström K, Sjöberg B M, Eklund H. Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binding. *Structure*, 1997, 5: 1077-1092.