

## 水稻温敏转绿突变体 *osv15* 的鉴定和遗传分析

齐岳翰<sup>1,2</sup> 李瑞莉<sup>2,3</sup> 王芳<sup>2</sup> 刘洪家<sup>2,\*</sup> 易可可<sup>4</sup> 朱诚<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>中国计量大学 生命科学学院, 杭州 310018; <sup>2</sup>浙江省农业科学院 病毒学与生物技术研究所 / 省部共建国家重点实验室培育基地—浙江省植物有害生物防控重点实验室, 杭州 310021; <sup>3</sup>浙江师范大学 化学与生命科学学院, 浙江 金华 321000; <sup>4</sup>中国农业科学院 农业资源与农业区划研究所, 北京 100081; \*通讯联系人, E-mail: pzhch@cjl.edu.cn; lhjzju@aliyun.com)

### Identification and Genetic Analysis of Thermo-sensitive Mutant *osv15* in Rice

QI Yuehan<sup>1,2</sup>, LI Ruili<sup>2,3</sup>, WANG Fang<sup>2</sup>, LIU Hongjia<sup>2,\*</sup>, YI Keke<sup>4</sup>, ZHU Cheng<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory Breeding Base for Sustainable Control of Pest and Disease / Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; <sup>3</sup>College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; <sup>4</sup>Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; \*Corresponding author, E-mail: pzhch@cjl.edu.cn; lhjzju@aliyun.com)

**Abstract:** 【Objective】The objective of the research is to identify and clone a new thermo-sensitive gene of rice, and to reveal the molecular mechanism involved in the process of chloroplast development and photosynthesis, providing theoretical support for photosynthetic efficiency breeding. 【Method】A yellow leaf mutant *osv15* was obtained from rice cultivar Nipponbare (abbreviated as Nip) mutagenized by irradiation. The phenotypic, agronomic traits and genetic patterns of *osv15* were analyzed in detail, and F<sub>2</sub> population was constructed by crossing the mutant with Kasalath, and mutant individuals were selected to map the gene *OsV15*. 【Result】The mutant *osv15* exhibited etiolation at seedling stage, with only ten percent of the chlorophyll content of the wild type, declined photochemical efficiency and abnormal structure of chloroplasts under low temperature condition (22°C). As temperature rose, leaf color of the mutant regreened due to increased chlorophyll content, which recovered to sixty-eight percent of that of the wild type under higher temperature condition (30°C). In natural environment, *osv15* showed leaf yellowing from seedling stage to maturity stage, and significant differences in plant height, tiller number, seed setting rate and so on. Genetic analysis revealed that the mutant phenotype of *osv15* was controlled by a single recessive gene. The gene was located in the 84 kb region of chromosome 6, between molecular markers S4 and S5. Sequencing analysis in this region showed that *Cpn60β1*(LOC\_Os06g02380) that encodes a putative chaperonin 60 beta precursor, carried a single base deletion in *osv15*. 【Conclusion】*osv15* is a new thermo-sensitive mutant, and *Cpn60β1* may be the mutant gene.

**Key words:** rice; thermo-sensitive; chloroplast; gene mapping

**摘要:** 【目的】本研究旨在鉴定和克隆水稻温敏转绿新基因, 揭示其参与叶绿体发生发育和光合作用的分子机制, 为高光效育种提供理论支撑。【方法】利用辐射诱变的方法, 从粳稻品种日本晴中筛选获得叶片黄化突变体 *osv15*, 并对其表型、农艺性状和遗传方式进行详细分析。构建了突变体与 Kasalath 的 F<sub>2</sub> 群体, 利用多态性分子标记对目的基因进行定位和测序分析。【结果】*osv15* 幼苗期在 22°C 低温下叶片黄化, 叶绿素含量仅为野生型的 10%, 光化学效率下降, 叶绿体结构异常; 随着温度的升高, *osv15* 的叶色由黄转绿, 30°C 时叶绿素含量恢复到野生型的 68%, 光化学效率和叶绿体发育与野生型相近。在自然环境下, *osv15* 突变体从苗期至成熟期均表现为叶片黄化, 且株高、分蘖数和产量等农艺性状与野生型相比差异显著。遗传分析表明 *osv15* 突变体的表型由一对隐性核基因控制。将 *OsV15* 基因定位到第 6 染色体多态性标记 S4 和 S5 之间 84 kb 的区间内, 定位区间测序发现突变体中编码分子伴侣蛋白的基因 *Cpn60β1*(LOC\_Os06g02380) 发生单碱基缺失。【结论】*osv15* 是一个新的水稻温敏转绿突变体, *Cpn60β1* 可能为突变基因。

**关键词:** 水稻; 温敏; 叶绿体; 基因定位

中图分类号: Q343.5; S511.032

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2018)04-0349-08

收稿日期: 2017-11-01; 修改稿收到日期: 2018-02-06。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31571633); 浙江省自然科学基金资助项目(LY17C150008)。

光合作用是自养生物将太阳能转化为有机物的重要能量转换过程。在高等植物中,这一过程在叶绿体中进行,依赖于叶绿素的合成和叶绿体的发育。叶绿体作为一个半自主细胞器,它的发育受到核基因和质体基因协同表达控制<sup>[1]</sup>。研究表明经过长期的共生进化,高等植物叶绿体中有 2000 多个蛋白,其中约 100 个由叶绿体基因组编码,其余则由核基因编码翻译后转入到叶绿体,大部分基因的功能及其参与叶绿体发育调控机制仍然未知<sup>[2]</sup>。植物叶色突变体是一种多发于苗期的常见突变性状,往往由于叶绿素合成或降解途径受阻表现为叶片失绿黄化或白化等叶色缺陷,从而影响植物光合作用,最终造成植物生长减弱、减产甚至死亡<sup>[3]</sup>。叶色突变体在研究植物光合作用机制,鉴定叶绿素生物合成与降解途径机理,明确叶绿体结构功能与调控机制等方面具有重要应用价值。水稻是单子叶模式植物,全基因组测序的完成为其功能基因的研究奠定了基础<sup>[4]</sup>。迄今为止,已经报道发现至少 180 个叶色突变体,其中大部分被定位到染色体特定的区间内,如 *yld*、*z12*、*ygl13*、*pgl11*、*stgra254* 和 *abl25* 等多个叶色突变体<sup>[5-11]</sup>。目前已经克隆了一些叶色相关基因,如 *PORB*、*OsHO2*、*YGL1*、*YGL2* 等<sup>[12-15]</sup>。

温度是影响水稻生长发育的一个重要因素,有一类水稻叶色突变体在特定的温度下叶片呈现白色、黄色或者黄绿色等叶绿素含量减少的表型,而在其他温度下叶色几乎正常,被称为温敏转绿突变体<sup>[16]</sup>。这类突变体通常是非致死的,因而是研究叶绿体发育的理想材料<sup>[17]</sup>。目前,水稻中报道了多个温敏转绿突变体。例如, *v1* 和 *v2* 突变体在 20℃ 的低温条件下表现为叶片黄化,当生长温度为 30℃ 时,其叶色与野生型一样<sup>[18]</sup>。*V1* 基因的编码产物参与调控质体 RNA 代谢和蛋白翻译过程<sup>[19]</sup>。*V2* 基因编码的低分子量鸟苷酸激酶,在叶绿体发育早期具有特殊的重要作用<sup>[20]</sup>。*v3* 和 *st1* 突变体在恒定温度(20℃ 或 30℃)下,叶片失绿;但是昼夜交替的温度节律条件(30℃/20℃)下叶片颜色正常。*V3* 和 *ST1* 基因分别编码核苷酸还原酶的大亚基和小亚基,参与调控 DNA 合成和修复所需的脱氧核苷酸的产生速率<sup>[21]</sup>。*v4* 突变体的温敏转绿表型与上述 *v1* 和 *v2* 突变体相似,由一个编码叶绿体定位蛋白的 *PPR* 基因突变造成,但它对叶绿体的调控作用机理与前面二者可能不同<sup>[22]</sup>。*v5*(*osv5a*, *ylc1*)突变体和 *tcd9* 突变体在 22℃ 温度条件下,叶片黄化、白化,当温度高于 28℃ 时,则叶色正常, *OsV5A* 基因编码叶绿体定位的分子伴侣蛋白,能够直接与 *PORA* 和 *PORB*

相互作用,进而稳定 *PORB* 蛋白<sup>[12,14,23]</sup>。*TCD9* 编码叶绿体伴侣蛋白 *OsCpn60α* 亚基,在叶片发育早期促进叶绿体的发育<sup>[24]</sup>。*cde1(t)* 突变体对高低温的敏感与上述相反,低于 23℃ 温度下生长叶色正常,叶绿素含量无变化,而在高于 26℃ 下生长时叶片为黄绿色<sup>[25]</sup>。可见,温度对叶绿素合成和叶绿体发育的影响非常复杂。

本研究利用 <sup>60</sup>Co γ 辐射诱变方法,获得一个温敏转绿的突变体 *osv15*(*virescent15*)。从表型、生理性状、遗传等方面对该突变体进行了鉴定,明确了其遗传特性,并对该突变基因进行了精细定位和测序分析,旨在揭示参与叶绿体发育和控制光合效率的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与生长条件

本研究所用水稻突变体 *osv15* 是由日本晴(*Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. *Nipponbare*)种子经 <sup>60</sup>Co γ 辐射诱变获得,经多代自交繁育,其表型和农艺性状已稳定遗传。在光照人工气候培养箱(型号 QHX-350BS-III)内进行野生型和 *osv15* 突变体苗期的水培。培养温度分别为恒定 22℃、24℃、26℃、28℃ 和 30℃,相对湿度为 70%,光周期为 12 h 光照/12 h 黑暗。培养溶液参照国际水稻研究所的水稻营养液配方。

### 1.2 遗传分析和定位群体创建

*osv15* 突变体与粳稻日本晴杂交收获 F<sub>1</sub>, F<sub>1</sub> 自花授粉收获 F<sub>2</sub>。对 F<sub>1</sub> 和 F<sub>2</sub> 进行表型和遗传分析。*osv15* 突变体与籼稻 *Kasalath* 杂交获得的 F<sub>2</sub> 群体用于基因定位分析。

### 1.3 DNA 的提取和 PCR 扩增

对亲本以及 F<sub>2</sub> 遗传群体植株采用 CTAB 法<sup>[26]</sup>提取 DNA。PCR 采用 10 μL 体系,模板 DNA 0.5 μL,正反向引物(10 μmol/L)各 0.2 μL, dNTPs(10 μmol/L) 0.5 μL, 10×PCR 缓冲液 1 μL, *Taq* 酶 0.1 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 补足至 10 μL。PCR 扩增程序如下:94℃ 下预变性 5 min, 35 个循环(94℃, 30 s; 55℃, 30 s; 72℃, 30 s); 72℃ 下延伸 7 min。PCR 产物在 3.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,EB 染色,伯乐凝胶成像仪拍照。

### 1.4 基因定位和候选基因序列测定

利用 *osv15* 突变体与 *Kasalath* 杂交获得的 F<sub>2</sub> 群体,选取 22 个具有突变表型植株,对近似均匀分布于 12 条染色体上的 120 对 SSR 分子标记进行初

表1 用于精细定位的多态性STS标记

Table 1. Polymorphic STS markers used in fine mapping.

标记名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	所在BAC
Marker name	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')	BAC location
S1	TAACACGCACTCAAAACGTG	TGCCGACTCTCATTGATCTG	AP001552
S2	CAACCCCTAACGACCATAGC	CACATGCATGACACGATCAA	AP001552
S3	CCAACTCTACATGCTCCTTCTG	CCCCAGAGAAGATCTCCTAGC	AP001389
S4	TCCTCACCTCCTCCTCTT	CACAAGCTTCTCTTCCCTTC	AP001389
S5	AGAGGCAATGTGCGAGTATG	GGTGGTTCTGCTCCCATTTA	AP002837
S6	ACAACTTCGCTTCTCGGTTG	GTACCTGACAGAGGCGATCC	AP002838

步连锁分析。从 F<sub>2</sub> 群体中增选 2607 个突变表型单株，根据初步定位区间，同时参照粳稻(日本晴)和籼稻(9311)的序列差异(NCBI)设计新的 STS(sequence-tagged site)分子标记用于精细定位。精细定位引物序列见表 1。

候选基因的序列测定，以突变体 DNA 为模板，利用 Kod-plus 高保真 DNA 聚合酶扩增目标基因。PCR 采用 20 μL 体系，模板 DNA 0.5 μL，正反向引物(10 μmol/L)各 0.6 μL，dNTPs(10 μmol/L) 2.0 μL，50% DMSO 2.0 μL，10×PCR 缓冲液 2 μL，2.5 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 1.2 μL，Kod-plus 酶 0.4 μL，加 ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。PCR 程序如下：95℃下预变性 2 min，35 个循环(98℃，10 s；60℃，30 s；68℃，90 s)；68℃下延伸 10 min。PCR 产物送公司进行序列测定，测序结果与日本晴序列(NCBI)进行比对。

1.5 光合色素含量测定

光合色素含量参照张其德法测定<sup>[27]</sup>。取光照人工气候培养箱中 2 叶期幼苗的第 1 叶，称重并剪碎后浸入 10 mL 95%的乙醇中，黑暗放置约 48 h，利用岛津 UV-1800 紫外分光光度计测定萃取液在 470 nm、649 nm、665 nm 处的吸光值。

1.6 叶绿体超微结构分析

透射电镜切片分析，电镜样品制备参照吕典华等<sup>[28]</sup>的方法。分别取光照人工气候培养箱 22℃下生长 14 d 和 30℃下生长 10 d 的野生型和 *osv15* 突变体叶片，用 2.5 %戊二醛固定液固定 4 h，然后用 1% OsO<sub>4</sub> 进一步固定。固定的叶片经过乙醇脱水，最后用环氧树脂包埋，样品经过切片、醋酸铀染色后用 Philips CM100 透射电子显微镜观察。

1.7 叶绿素荧光动力学参数测定

参照郭鹏等<sup>[29]</sup>的方法，利用叶绿素荧光成像系统(IMAGING-PAM, MAX I)测定野生型与突变体的叶绿素荧光动力学参数。在恒温(22℃、24℃、26℃、28℃和 30℃)条件下，将萌发后的野生型和 *osv15* 突变体培养至 2 叶期。将幼苗黑暗处理 30~60 min，

分别测定相关光合效率系数。每次测量取野生型和突变体各 5 株，计算结果取平均值。

1.8 农艺性状分析

将光照人工气候培养箱内培养 3 周的野生型和 *osv15* 突变体幼苗移栽到大田中种植。成熟期分别测量野生型与突变体的株高、分蘖数、叶长、叶宽、穗长、结实率、单株有效穗数、千粒重等农艺性状，利用 *t* 测验分析两者差异的显著性。

2 结果与分析

2.1 突变体的表型分析

调查人工气候培养箱环境下苗期和自然环境下成熟期的表型，发现突变体均表现黄化(图1)。22℃低温环境条件下，突变体幼苗出现黄化表型；30℃时苗期突变体为黄绿色表型。与野生型相比，成熟期 *osv15* 突变体的株高降低 7.0%，结实率和千粒重分别降低 12.5%和 11.0%，分蘖数和有效分蘖数则分别下降 44.7%和 52.9%。而在穗长和叶形等方面，野生型和突变体无显著差异(表2)。

2.2 突变体对温度的敏感及其光合色素的含量

不同温度处理表明，突变体对温度敏感，在 22℃低温环境下表现黄化，在 30℃下则表现为黄绿(图1)。在低温环境下，成熟期突变体的新生叶片也表现黄化(图1-C)。在 5 个不同环境温度(22℃，24℃，26℃，28℃和 30℃)条件下，*osv15* 幼苗叶片的叶绿素总含量分别为野生型的 10.0%、16.8%、17.8%、24.3%和 68.0%；类胡萝卜素含量也出现相似的变化，突变体叶片分别为野生型的 20.7%、33.4%、35.7%、43.1%和 107.0%。但叶绿素 a 与叶绿素 b 的比值，野生型与突变体无显著差异(图2)。

2.3 突变体叶绿体超微结构

对不同温度下的野生型和突变体叶片中叶绿体超微结构进行观察，发现在 22℃低温环境下，野生型具有规则和多层的基粒类囊体，且基粒片层垛

表2 野生型和突变体农艺性状分析

Table 2. Agronomic traits of the wild type and mutant.

材料 Material	株高 Plant height / cm	分蘖数 Tiller number	有效穗数 No. of productive panicles	穗长 Panicle length / cm	叶长 Leaf length / cm	叶宽 Leaf width / cm	结实率 Seed setting rate / %	千粒重 1000-grain weight / g
WT	87.3±2.0	15.8±2.2	14.3±2.1	21.5±0.6	31.5±1.3	1.3±0.1	91.4±2.1	25.8±0.6
<i>osv15</i>	80.2±1.9**	8.6±1.4**	6.8±1.0**	20.1±1.0	29.9±1.5	1.2±0.1	80.1±4.0**	22.8±1.8**

\*\*表示野生型与突变体在0.01水平上差异显著。  
\*\* Difference between WT and mutant was significant at 0.01 level.



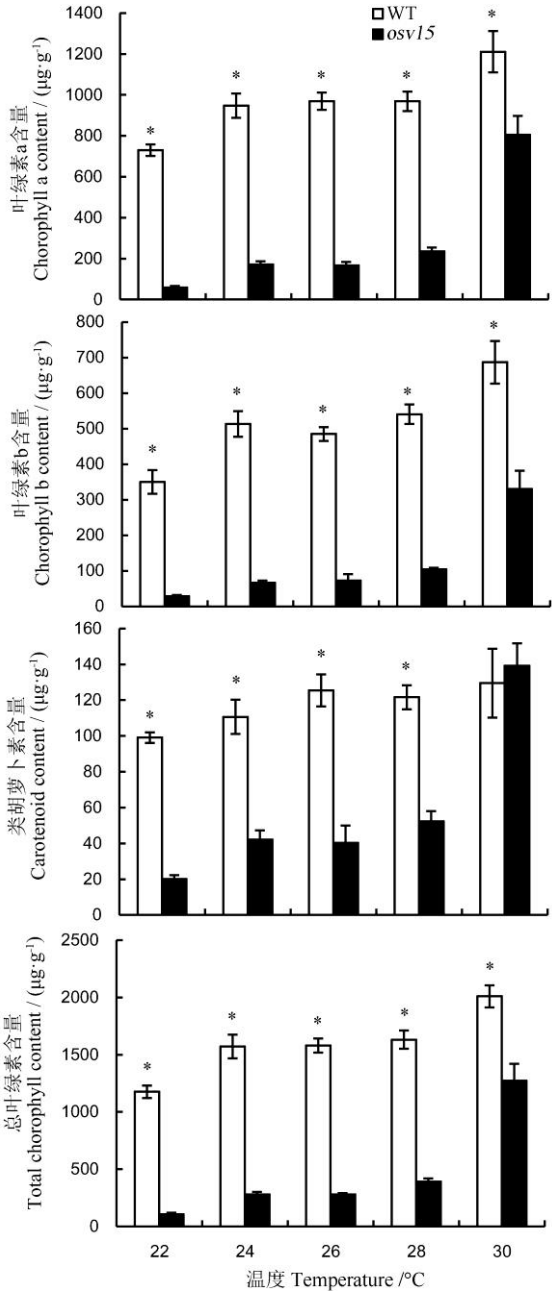
A—22℃培养箱生长14 d; B—30℃培养箱生长9 d; C—成熟期(11月); D—成熟期(7月)。标尺=3 cm。  
A, 14 d-old seedlings at 22℃; B, 9 d-old seedlings at 30℃; C, At maturity stage in November; D, At maturity stage in July. Bar=3 cm.  
图1 不同时期野生型(WT)和突变体表型

Fig. 1. Phenotype of the wild type (WT) and mutant at different growth stages.

叠较厚, 堆积紧密, 而突变体叶片中基粒类囊体稀疏分散, 基质垛叠松散, 出现更多更大的嗜饿小体(图3-A、B)。30℃下, *osv15*突变体基粒类囊体排列整齐, 基粒类囊体数目增多, 嗜饿小体的数量减少且体积缩小, 叶绿体结构发育虽趋于完善, 但未达到野生型的正常发育状态(图3-C、D)。

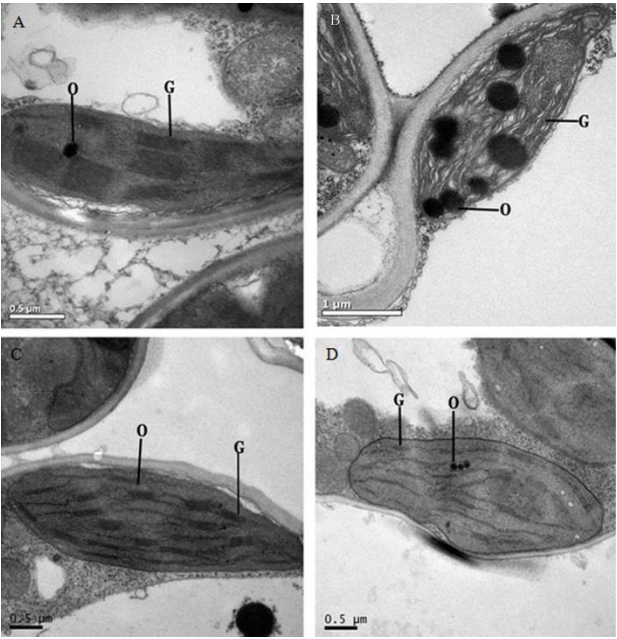
2.4 突变体的叶绿素荧光动力学参数

对不同温度条件下的荧光参数测定发现, 突变体的光系统II的最大光化学效率( $F_v/F_m$ )与野生型相比差异不大; 而实际光化学效率( $\Phi_{PSII}$ )和光化学



\*表示野生型与突变体在0.05水平上差异显著。  
\*Difference between WT and mutant was significant at 0.05 level.

图2 不同温度下野生型和突变体光合色素含量  
Fig. 2. Photosynthetic pigment contents in leaves of the wild type(WT) and mutant at different temperatures.

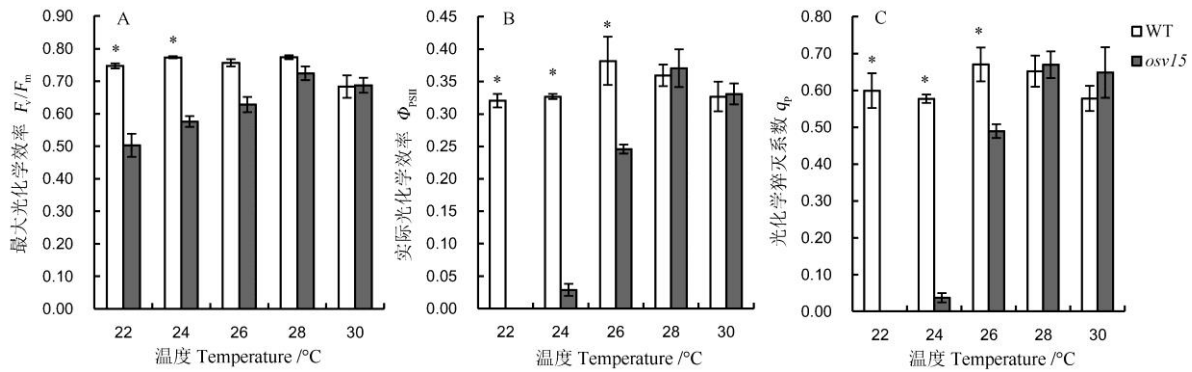


A—22℃条件下野生型；B—22℃条件下突变体；C—30℃条件下野生型；D—30℃条件下突变体。G—基粒；O—嗜锇粒。  
A, The wild type under 22℃; B, Mutant under 22℃; C, The wild type under 30℃; D, Mutant under 30℃. G, Granum; O, Osmiophilic globule.

图3 野生型和突变体叶绿体超微结构

Fig. 3. Chloroplast ultrastructure of the wild type and mutant.

猝灭系数( $q_p$ )，在 22℃低温环境下，突变体几乎为零，随温度升高突变体的实际光化学效率和光化学



A—最大光化学效率( $F_v/F_m$ )；B—实际光化学效率( $\Phi_{PSII}$ )；C—光化学猝灭系数( $q_p$ )。  
A, Maximum photochemical efficiency( $F_v/F_m$ ); B, Actual photochemical efficiency( $\Phi_{PSII}$ ); C, Photochemical quenching coefficient( $q_p$ ).

图4 不同温度下野生型和突变体叶绿素荧光动力学参数

Fig. 4. Chlorophyll fluorescence kinetics parameters of the wild type(WT) and mutant at different temperatures.

表3 突变体后代叶色性状的分离分析

Table 3. Segregation of leaf color of progenies derived from mutant.

组合 Combination	绿苗株数 Number of green-leaf plants	黄苗株数 Number of yellow leaf plants	总株数 Total number of plants	分离比 Segregation	$\chi^2$
<i>osv15</i> /Nipponbare	310	95	405	3 : 1	0.53
<i>osv15</i> /Kasalath	279	88	367	3 : 1	0.29

猝灭系数逐渐增加，在 28℃和 30℃下，恢复到野生型水平(图 4)。

2.5 突变体的遗传分析

突变体与野生型日本晴正反交，后代 $F_1$ 在人工气候培养箱和自然环境下生长都呈现野生型的表型，叶片颜色正常，说明该表型受隐性核基因控制。在人工气候培养箱中，统计 $F_2$ 群体中正常叶色幼苗和黄叶幼苗数，绿叶幼苗有310株，黄叶幼苗有95株，分析表明，绿叶与黄叶幼苗的株数符合3：1分离比，说明该表型受一对隐性基因控制。突变体与Kasalath杂交 $F_2$ 群体中，绿叶幼苗有279株，黄叶幼苗有88株，经 $\chi^2$ 测验，正常株与突变株的分离比符合3: 1，也表明该表型受一对隐性基因控制(表3)。

2.6 *OsV15* 基因的定位和候选基因分析

从突变体与Kasalath杂交得到的 $F_2$ 群体作为定位群体，首先选用近似均匀分布在水稻12条染色体上的120对SSR分子标记定位突变基因。将突变基因*OsV15*初步定位到水稻第6染色体上，位于RM508和RM584分子标记之间(图5)。进一步增加突变型个体数量至2607株，同时加密区间内的标记，最终精细定位在标记S4和S5之间，物理距离约为84 kb(图5)。区间内共包含有24个开放阅读框，测序分析发现突变体中，编码分子伴侣蛋白(Cpn60 $\beta$ 1)基因，在5154 bp处(位于最后一个外显子上)存在碱基的缺失突变，推测其缺失导致编码蛋白的移码突



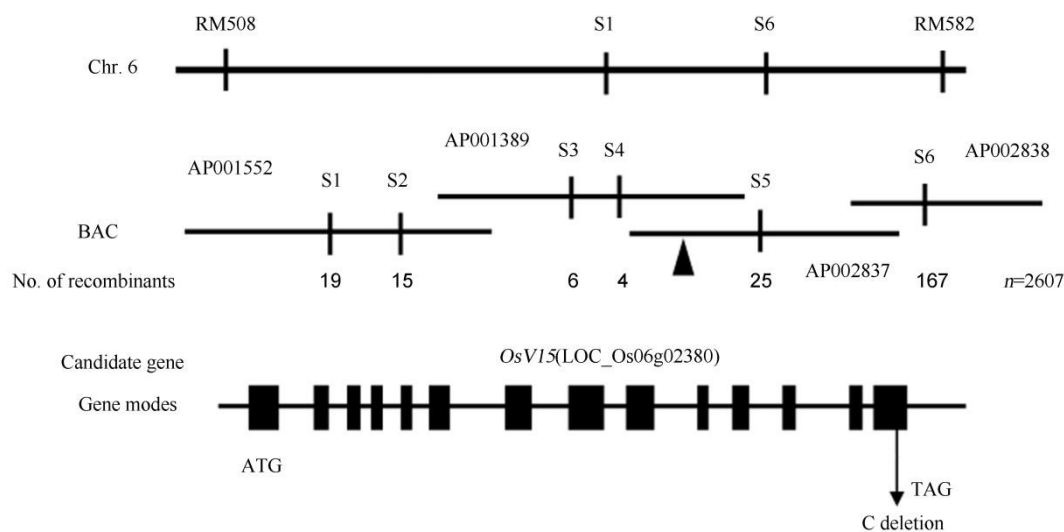


图5 *OsV15* 基因在第6染色体的精细定位及候选基因结构

Fig. 5. Fine mapping of *OsV15* on chromosome 6 and the structure of candidate gene.

变,造成突变体的表型,拟将其作为候选基因。

### 3 讨论

水稻是世界上重要的粮食作物,叶片光合作用效率是决定水稻产量的重要因子之一。较高的光合作用效率依赖于叶绿素的合成和叶绿体的正常发育。因此,利用叶色突变体对叶绿体发育的调控模式、光合作用机制的研究具有重要意义。叶色突变体中包含一类温敏转绿型突变体,研究发现这类突变体在不同低温环境下出现叶片黄化表型,在不同发育阶段、高温和自然环境下则呈现不同程度的恢复表现。水稻*osv4*突变体和*tcd9*突变体在低温环境下都出现叶片白化的表型,但是4叶期和5叶期后,即使低温条件下叶片也逐渐转绿,表明它们的温敏转绿同时具有发育时期特异性<sup>[22,24]</sup>。*tcm11*突变体幼苗在20℃时为黄叶,从第4叶期开始逐渐转为浅黄绿色,在32℃条件下,*tcm11*突变体完全表现绿叶<sup>[30]</sup>。水稻*dy1*突变体在温度低于20℃时也具有白化的表型,但是在自然环境中从苗期到成熟期始终为黄叶的表型<sup>[31]</sup>。水稻*osv5a*突变体和*lta1*突变体在24℃低温环境下为明显的突变表型,当高于24℃时逐渐恢复野生型的表型<sup>[23,32]</sup>。本研究鉴定了一个温敏转绿突变体*osv15*,在22℃条件下幼苗叶片黄化,当温度升到30℃时叶片为黄绿色。在自然环境下,*osv15*突变体表现正常,但是遇到低温环境时新生的叶片则表现为白化(图1),表明*osv15*突变体的新生叶片中叶绿素的合成受到低温抑制。因此,*osv15*突变体是一个新的温敏转绿突变体。

本研究利用*osv15*突变体与Kasalath杂交的F<sub>2</sub>群体,将*OsV15*基因精细定位到第6染色体分子标记S4和S5之间84 kb的区间内。对该区间的序列分析,拟将一个编码分子伴侣蛋白OsCpn60β1的Os06g02380基因作为候选基因进一步研究。植物Cpn60蛋白是由蓝藻质体GroE蛋白进化而来,由两类不同的亚基组成,具有辅助管家蛋白的功能。水稻基因组中有6个Cpn60亚基,3个Cpn60α亚基和3个Cpn60β亚基,之前研究发现水稻*OsCpn60β1*基因在各组织中的表达量都最高,推测它在分子伴侣蛋白功能中发挥主要作用<sup>[33]</sup>。水稻中已报道Cpn60α1和Cpn60α3蛋白都表明Cpn60蛋白对于低温环境下叶绿体发育具有重要调控作用。在拟南芥中,*AtCpn60β1*突变时幼苗叶片与野生型并无差异,而*AtCpn60β1*和*AtCpn60β2*同时突变时才表现幼苗叶片白化<sup>[34]</sup>,表明拟南芥中不同Cpn60β亚基的功能有冗余性。本研究*osv15*突变体在低温下幼苗黄化表型,显示水稻*OsCpn60β1*基因具有不同于拟南芥*AtCpn60β1*的重要功能和作用机制。

### 参考文献:

- [1] Mullet J E. Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol*, 1993, 103(2): 309-313.
- [2] Abdallah F, Salamini F, Leister D. A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(4): 141-142.
- [3] 何冰,刘玲珑,张文伟,万建民. 植物叶色突变体. 植物生理学报, 2006, 42(1): 1-9.

- He B, Liu L L, Zhang W W, Wan J M. Plant leaf color mutants. *Plant Physiol J*, 2006, 42(1): 1-9. (in Chinese with English abstract)
- [4] 刘艳霞, 林冬枝, 董彦君. 水稻温敏感叶色突变体研究进展. *中国水稻科学*, 2015, 29(4): 439-446.  
Liu Y X, Lin D Z, Dong Y J. Research advances in thermo-sensitive leaf coloration mutants in rice. *Chin J Rice Sci*, 2015, 29(4): 439-446. (in Chinese with English abstract)
- [5] 初志战, 刘小林, 陈远玲, 刘耀光. 一个水稻白化致死突变基因的精细定位和遗传研究. *中国水稻科学*, 2016, 30(2): 136-142.  
Chu Z Z, Liu X L, Chen Y L, Liu Y G. Genetic analysis and gene mapping of an albino lethal mutant in rice. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(2): 136-142. (in Chinese with English abstract)
- [6] 李自壮, 徐乾坤, 余海平, 周亭亭, 薛大伟, 曾大力, 郭龙彪, 钱前, 任德勇. 水稻淡黄叶矮化突变体 *yld* 的遗传分析及基因定位. *作物学报*, 2017, 43(4): 522-529.  
Li Z Z, Xu Q K, Yu H P, Zhou T T, Xue D W, Zeng D L, Guo L B, Qian Q, Ren D Y. Genetic analysis and gene mapping of *Yellow leaf and dwarf (yld)* mutant in rice. *Act Agron Sin*, 2017, 43(4): 522-529. (in Chinese with English abstract)
- [7] 刘胜, 魏祥进, 邵高能, 唐绍清, 胡培松. 一个水稻“斑马叶”叶色突变体基因 *zebra leaf2(zl2)* 的图位克隆. *中国水稻科学*, 2013, 27(3): 231-239.  
Liu S, Wei J X, Shao G N, Tang S Q, Hu P S. Map-based cloning of a zebra leaf mutant gene *zl2* in rice. *Chin J Rice Sci*, 2013, 27(3): 231-239. (in Chinese with English abstract)
- [8] 王亚琴, 施军琼, 张婷, 李燕, 张天泉, 张小龙, 桑贤春, 凌英华, 何光华. 水稻黄绿叶突变体 *yg113* 的鉴定及候选基因分析. *中国农业科学*, 2015, 48(21): 4197-4208.  
Wang Y Q, Shi J Q, Zhang T, Li Y, Zhang T Q, Zhang X L, Sang X C, Ling Y H, He G H. Characterization and candidate gene analysis of *Yellow-Green Leaf* mutant *yg113* in rice (*Oryza sativa*). *Sci Agric Sin*, 2015, 48(21): 4197-4208. (in Chinese with English abstract)
- [9] 涂政军, 邹国兴, 黄李超, 陈龙, 代丽萍, 高易宏, 冷语佳, 朱丽, 张光恒, 胡江, 任德勇, 高振宇, 董国军, 陈光, 郭龙彪, 钱前, 曾大力. 水稻淡绿叶基因 *PGL11* 的鉴定与精细定位. *中国水稻科学*, 2017, 31(5): 489-499.  
Tu Z J, Zou G X, Huang L C, Chen L, Dai L P, Gao Y H, Leng Y J, Zhu L, Zhang G H, Hu J, Ren D Y, Gao Z Y, Dong G J, Chen G, Guo L B, Qian Q, Zeng D L. Identification and fine mapping of pale green leaf *PGL11* in rice. *Chin J Rice Sci*, 2017, 31(5): 489-499. (in Chinese with English abstract)
- [10] 邹金财, 张维林, 夏明辉, 邱洋松, 王长春, 杨玲, 张小明. 水稻阶段性温敏白化转绿突变体 *stgra254* 的特征和基因定位. *华北农学报*, 2017, 32(3): 1-6.  
Zhou J C, Zhang W L, Xia M H, Qiu Y S, Wang C C, Yang L, Zhang X M. Characterization and gene mapping of stage thermo-sensitive green-revertible albino mutant *stgra254* in rice. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2017, 32(3): 1-6. (in Chinese with English abstract)
- [11] 朱环环, 刘艳霞, 潘倩文, 郑凯伦, 林冬枝, 董彦君. 一个水稻白化致死突变体 *abl25* 鉴定及其基因定位. *上海师范大学学报: 自然科学版*, 2014, 43(3): 238-244.  
Zhu H H, Liu Y X, Pan Q W, Zheng K W, Lin D Z, Dong Y J. Identification and gene mapping of a novel rice albino lethal *abl25* mutant. *J Shanghai Normal Univ: Nat Sci*, 2014, 43(3): 238-244. (in Chinese with English abstract)
- [12] 高小丽, 李素娟, 邵健丰, 刘洪家, 陶跃之. 水稻 *POR* 基因的分离、定位与功能的初步研究. *植物生理学报*, 2015, 51(6): 860-868.  
Gao X L, Li S J, Shao J F, Liu H J, Tao Y Z. Preliminary study on isolation, mapping, and function of NADPH: Proto-chlorophyllide oxidoreductase (*POR*) gene in rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiol J*, 2015, 51(6): 860-868. (in Chinese with English abstract)
- [13] Li Q, Zhu F Y, Gao X, Sun Y, Li S, Tao Y, Lo C, Liu H. *Young Leaf Chlorosis 2* encodes the stroma-localized heme oxygenase 2 which is required for normal tetrapyrrole biosynthesis in rice. *Planta*, 2014, 240(4): 701-712.
- [14] Zhou K, Ren Y, Lv J, Wang Y, Liu F, Zhou F, Zhao S, Chen S, Peng C, Zhang X. *Young Leaf Chlorosis 1*, a chloroplast-localized gene required for chlorophyll and lutein accumulation during early leaf development in rice. *Planta*, 2013, 237(1): 279.
- [15] Chen H, Cheng Z, Ma X, Wu H, Liu Y, Zhou K, Chen Y, Ma W, Bi J, Zhang X. A knockdown mutation of *YELLOW-GREEN LEAF2* blocks chlorophyll biosynthesis in rice. *Plant Cell Rep*, 2013, 32(12): 1855.
- [16] Archer E K, Bonnett H T. Characterization of a virescent chloroplast mutant of tobacco. *Plant Physiol*, 1987, 83(4): 920-925.
- [17] 谭炎宁, 孙学武, 袁定阳, 孙志忠, 余东, 何强, 段美娟, 邓华凤, 袁隆平. 水稻单叶独立转绿型黄化突变体 *grc2* 的鉴定与基因精细定位. *作物学报*, 2015, 41(6): 831-837.  
Tan Y N, Sun X W, Yuan D Y, Sun Z Z, Yu D, He Q, Duan M J, Deng H F, Yuan L P. Identification and fine mapping of green-revertible chlorina gene *grc2* in rice (*Oryza sativa* L.). *Act Agron Sin*, 2015, 41(6): 831-837. (in Chinese with English abstract)
- [18] Iba K, Takamiya K I, Toh Y, Satoh H, Nishimura M. Formation of functionally active chloroplasts is determined at a limited stage of leaf development in virescent mutants of rice. *Genesis*, 2010, 12(5): 342-348.
- [19] 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(6): 1241-1250.
- [20] 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(3): 512-527.
- [21] 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(1): 388-401.
- [22] Gong X, Su Q, Lin D, Jiang Q, Xu J, Zhang J, Teng S, Dong Y. The rice *OsV4* encoding a novel pentatricopeptide repeat protein is required for chloroplast development during the early leaf stage under cold stress. *J Integr Plant Biol*, 2014, 56(4): 400-410.
- [23] Liu H, Li Q, Yang F, Zhu F, Sun Y, Tao Y, Lo C. Differential regulation of protochlorophyllide oxidoreductase abundances by *VIRESCENT 5A* (*OsV5A*) and *VIRESCENT 5B* (*OsV5B*) in rice seedlings. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57(11): 2392-2402.
- [24] Jiang Q, Mei J, Gong X D, Xu J L, Zhang J H, Teng S, Lin D Z, Dong Y J. Importance of the rice *TCD9* encoding  $\alpha$  subunit of chaperonin protein 60 (*Cpn60a*) for the chloroplast development during the early leaf stage. *Plant Sci*, 2014(215/216): 172-179.
- [25] Liu W, Fu Y, Hu G, Si H, Zhu L, Wu C, Sun Z. Identification and fine mapping of a thermo-sensitive chlorophyll deficient mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 2007, 226(3): 785-795.
- [26] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [27] 张其德. 测定叶绿素的几种方法. 植物学报, 1985, 3(5): 60-64.  
Zhang Z D. Methods of determination of chlorophyll. *Chin Bull Bot*, 1985, 3(5): 60-64. (in Chinese)
- [28] 吕典华, 宗学风, 王三根, 凌英华, 桑贤春, 何光华. 两个水稻叶色突变体的光合特性研究. 作物学报, 2009, 35(12): 2304-2308.
- Lv D H, Zong X F, Wang S G, Ling Y H, Sang X C, He G H. Characteristics of photosynthesis in two leaf color mutants of rice. *Act Agron Sin*, 2009, 35(12): 2304-2308. (in Chinese with English abstract)
- [29] 郭鹏. 水稻温敏黄转绿突变体v5的鉴定和基因克隆. 金华: 浙江师范大学, 2011.  
Guo P. Identification and gene mapping of a rice thermo-sensitivevirescent mutant v5. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2011. (in Chinese with English abstract)
- [30] 王文娟, 吴兰兰, 雷晓庆, 赵怀玉, 林冬枝, 董彦君. 一个新水稻低温敏感叶色突变体*tcm11*的鉴定及基因定位. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2017, 46(2): 319-325.  
Wang W J, Wu L L, Lei X Q, Zhao H Y, Lin D Z, Dong Y J. Identification and gene mapping of a novel low temperature sensitive leaf color mutant *tcm11* in rice (*Oryza sativa* L.). *J Shanghai Normal Univ: Nat Sci*, 2017, 46(2): 319-325. (in Chinese with English abstract)
- [31] 张天雨, 周春雷, 刘喜, 孙爱玲, 曹鹏辉, Nguyen T, 田云录, 翟虎渠, 江玲. 一个水稻温敏黄化突变体的表型分析和基因定位. 作物学报, 2017, 43(10): 1426-1433.  
Zhang T Y, Zhou C L, Liu X, Sun A L, Cao P H, Nguyen T, Tian Y L, Zhai H Q, Jiang L. Phenotypes and gene mapping of a thermo-sensitive yellow leaf mutant of rice. *Act Agron Sin*, 2017, 43(10): 1426-1433. (in Chinese with English abstract)
- [32] Peng Y, Zhang Y, Lv J, Zhang J H, Li P, Shi X L, Wang Y F, Zhang H L, He Z H, Teng S. Characterization and fine mapping of a novel rice albino mutant low temperature *albino 1*. *J Gene Genom*, 2012, 39(8): 385-396.
- [33] Peng L W, Fukao Y, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Shikanai T. A chaperonin subunit with unique structures is essential for folding of a specific substrate. *Plos Biol*, 2011, 9(4): e1001040.
- [34] Suzuki K, Nakanishi H, Bower J, Yoder D W, Osteryoung K W, Miyagishima S Y. Plastid chaperonin proteins *Cpn60a* and *Cpn60b* are required for plastid division in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*, 2009, 9(1): 38.