

# 水稻白条纹叶及白穗突变体 *wlp6* 的鉴定与基因定位

李玲锋<sup>#</sup> 熊玉毅<sup>#</sup> 欧阳林娟 彭小松 陈小荣 贺晓鹏 傅军如 边建民 胡丽芳 徐杰  
贺浩华 孙晓棠<sup>\*</sup> 朱昌兰<sup>\*</sup>

(江西农业大学 作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室, 南昌 330045; <sup>#</sup>共同第一作者; <sup>\*</sup>通讯联系人, E-mail: 45101034@qq.com; zhuchanglan@163.com)

## Identification and Gene Mapping of White Stripe Leaf and White Panicle Mutant *wlp6* in Rice

LI Lingfeng<sup>#</sup>, XIONG Yuyi<sup>#</sup>, OUYANG Linjuan, PENG Xiaosong, CHEN Xiaorong, HE Xiaopeng, FU Junru, BIAN Jianmin, HU Lifang, XU Jie, HE Haohua, SUN Xiaotang<sup>\*</sup>, ZHU Changlan<sup>\*</sup>

(Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetics and Breeding of Ministry of Education, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this paper; <sup>\*</sup>Corresponding author, E-mail: 45101034@qq.com; zhuchanglan@163.com)

**Abstract:**【Objective】Leaf color mutants are important materials for studying the regulation of photosynthesis, chlorophyll biosynthesis and genetic development in rice. The discovery of leaf color mutants is an important genetic basis for functional genomics research in rice. 【Method】A mutant of white stripe leaf and white panicle was found in Changhui 121, which could be inherited stably to successive generations, and temporarily termed *wlp6* (white striped leaf and panicle 6). *wlp6* and wild-type seeds were seeded in the early, middle and late seasons in Nanchang, Jiangxi Province and the agronomic traits of the middle and late rice were investigated. Chlorophyll contents in leaf and glume at the 3-leaf stage, tillering stage and heading stage were tested. The development of mesophyll cells at the heading stage was observed with a electron microscopy. Temperature and light sensitive experiments were carried out in an illumination incubator. The phenotype of reciprocal F<sub>1</sub> between *wlp6* and Changhui 121, 02428 was observed and chi-square test was conducted on F<sub>2</sub> segregating population to analyze the genetic pattern of the mutant. The F<sub>2</sub> population derived from *wlp6*/02428 was used as material, and the mapping was carried out by the BSA method. 【Result】From 1-leaf stage to mature stage, all leaves of *wlp6* showed white stripes. At the heading stage, glumes and branches were albino, and the panicle turned green under high temperature. The plant height, number of effective panicles and number of grains per panicle of the mutant were significantly lower than those of its wild type in the two seasons, and the seed-setting rate and 1000-grain weight of *wlp6* in late season were also significantly lower. The leaf chlorophyll contents of *wlp6* were significantly lower than those of the wild type at all growth stages. The husk chlorophyll contents of *wlp6* were significantly lower than those of the wild type in early and late season. In *wlp6*, the number of chloroplasts decreased, the volume became smaller, and there was no obvious lamellar structure. Leaf chlorophyll contents increased with the temperature and sunshine duration increase. Genetic analysis showed that the trait was controlled by recessive nuclear genes. *WLP6* was located in the interval InDel markers R-7-R-8(physical distance 137 kb), on the short arm of chromosome 6. In this interval, 21 candidate genes were predicted. Through the analysis of candidate genes and sequencing, we found that *LOC\_Os06g14620* encodes a small chain of RNA reductase, 142nd and 158th base of the coding region carried a substitution from T to C, and the base A was inserted at the 288th position. The insertion of the base leads to termination of the gene translation. Therefore, it is speculated that *LOC\_Os06g14620* is the candidate gene for *WLP6*. 【Conclusion】*LOC\_Os06g14620* is the candidate gene of the cloned white stripe gene *St1*. *WLP6* is the allele of *St1*, with different mutation sites and phenotypes.

**Key words:** rice; white stripe and white panicle; chlorophyll; temperature and light sensitive; gene mapping

**摘 要:**【目的】叶色突变体是研究水稻光合作用, 叶绿素生物合成和遗传发育调控机理的重要材料。发掘水稻叶色突变体, 是水稻功能基因组学研究的重要遗传基础。【方法】在昌恢 121 中发现了一份白条纹叶及抽穗期白穗突变体, 经过连续多代自交能稳定遗传, 暂命名为 *wlp6*(white striped leaf and white panicle 6)。在南昌分早、中和晚 3 季播种 *wlp6* 与野生型种子, 考查了中稻与晚稻的部分农艺性状; 测定 3 叶期、分蘖期、抽穗期叶片及颖壳的叶绿素含量; 通过电镜观察抽穗期叶肉细胞发育情况。在光照培养箱中进行温光敏感实验; 将 *wlp6* 与昌恢 121 及 02428 正反交, 观察 F<sub>1</sub> 植株表型, 对 F<sub>2</sub> 分离群体进行卡方测验, 分析突变体遗传规律; 以 *wlp6*/02428 衍生的 F<sub>2</sub> 群体为材料, 利用 BSA 法进行基因定位。【结果】*wlp6* 自第 1 片叶到成熟, 叶片均呈白条纹, 抽穗期颖

收稿日期: 2017-11-26; 修改稿收到日期: 2017-12-29。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31560507); 江西省“5511”优势科技创新团队资助项目(20165BCB19005); 江西省教育厅项目(GJJ150409)。

壳及枝梗失绿, 高温天气穗转绿。突变体株高、有效穗数和每穗粒数在早稻季和中稻季均显著低于野生型, 晚稻季 *wlp6* 的结实率和千粒重也显著降低。叶绿素含量测定表明, *wlp6* 叶片叶绿素含量在不同生育期及不同季均显著低于野生型, 早稻和晚稻季种植的 *wlp6* 颖壳叶绿素含量也比野生型低。电镜观察抽穗期的叶肉细胞发现, *wlp6* 叶绿体数目减少, 体积变小, 没有分化出明显的片层结构。温光敏感实验表明, 突变体对光照强弱钝感, 叶色受温度和日照长短影响, 随着温度升高和日照时间变长突变体叶绿素含量有上升趋势。遗传分析表明, 该性状受隐性核基因控制, 利用 *wlp6/02428* 得到的 616 个  $F_2$  单株将 *WLP6* 定位于第 6 染色体短臂 InDel 标记 R-7 与 R-8 间, 物理距离 137 kb, 此区间预测了 21 个候选基因。经候选基因分析及测序发现, 其中 *LOC\_Os06g14620* 编码一个核糖核酸还原酶小亚基, 编码区第 142 和 158 位碱基由 T 替换为 C, 第 288 位插入了碱基 A, 碱基的插入导致翻译提前终止, 因此推测 *LOC\_Os06g14620* 是 *WLP6* 的候选基因。【结论】*LOC\_Os06g14620* 是已经克隆的白条纹叶基因 *St1* 的候选基因, 推测 *WLP6* 与 *St1* 等位, 但突变位点不同, 且表型也有差异。

**关键词:** 水稻; 白条纹叶及白穗; 叶绿素; 温光敏感; 基因定位

**中图分类号:** Q343.5; Q755; S511.034

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-7216(2018)06-0538-11

叶片是植物进行光合作用的主要场所, 水稻产量的 90%~95% 来自叶片叶绿体的光合作用<sup>[1]</sup>, 叶绿体除了进行光合作用外, 还参与植物生长物质、维生素、氨基酸、脂肪酸、核苷酸以及次生代谢产物的合成<sup>[2]</sup>。水稻叶色突变体是研究植物光合作用及光形态建成等复杂生理代谢过程的主要材料, 同时, 由于叶色突变表型常在苗期出现, 易于发现和鉴定, 因此, 在种子纯度鉴定中也有重要应用<sup>[3]</sup>。叶色突变体来源广泛, 变异类型丰富, 按表型可将突变体分为 8 种类型, 即白化、黄化、浅绿、绿白、白翠、黄绿、绿黄和条纹<sup>[4]</sup>。目前, 已报道水稻叶色突变体超过 190 份, 定位的叶色突变基因超过 145 个, 这些基因广泛分布于水稻 12 条染色体上<sup>[5]</sup>。平行叶脉的条纹叶, 叶色表型主要由于叶绿体发育受阻造成<sup>[6]</sup>。目前已报道的白条纹叶突变体近 30 个, 包括 *v1*<sup>[7]</sup>、*v13*<sup>[8]</sup>、*wp1*<sup>[9]</sup>、*wp2*<sup>[9]</sup>、*wp(t)*<sup>[10]</sup>、*wpsm*<sup>[11]</sup>、*oswm*<sup>[12]</sup>、*oswm2*<sup>[13]</sup>、*wslwp*<sup>[14]</sup>、*st1~st12*<sup>[9,15-25]</sup>、*st(t)*<sup>[26]</sup>、*st(k)*<sup>[27]</sup>、*B38*<sup>[28]</sup>、*gws*<sup>[29]</sup>、*wgl58*<sup>[30]</sup>、*st-wp*<sup>[6]</sup> 和 *al5942*<sup>[31]</sup> 等, 其中大部分属于低温敏感型, 只有 *st10* 和 *st12* 属于高温敏感型。与叶片相比, 穗部叶绿体色素含量较少、光合效率较低, 穗部光合产物仅占水稻植株总光合产物的 5.4% 左右<sup>[32]</sup>。根据库、源关系, 穗部光合作用可能对水稻产量也具有一定影响<sup>[33]</sup>。目前, 定位的白穗基因还较少, 包括 *WP1*<sup>[9,34]</sup>、*WP4*<sup>[32,35]</sup>、*Wp(t)*<sup>[10]</sup>、*WLP1*<sup>[36]</sup>、*St-wp*<sup>[6]</sup>、*St-fon*<sup>[37]</sup>、*WSLWP*<sup>[14]</sup> 和 *WSP1*<sup>[38]</sup> 等, 这些突变体表现为白穗时, 大部分叶片也白化或呈白条纹, 其中 *WP1*、*WLP1* 和 *WSP1* 均与叶绿体发育相关。

水稻叶绿素合成降解途径的调控机制复杂, 目前其分子机制并未研究透彻。我们利用一个自然突变的白条纹叶及白穗突变体, 对该突变体的光温敏感特性进行了初步探究, 并对该叶色基因进行了精细定位, 以期详细地了解叶色转绿发生的分子机

制, 为叶色突变体在杂交育种中的应用及叶绿素合成途径的深入研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

白条纹叶及抽穗期白穗突变体 *wlp6* 是昌恢 121 的自然突变体, 白化表型连续多代种植均能稳定遗传。实验材料种植于江西农业大学试验田和三亚林旺南繁基地, 所有植株单株种植, 按常规管理。

### 1.2 农艺性状及叶绿素含量的测定

2017 年在江西农业大学实验基地分别按早(3 月 20 日播种, 4 月 24 日移栽)、中(5 月 17 日播种, 6 月 16 日移栽)和晚(6 月 20 日播种, 7 月 28 日移栽)三季种植突变体和野生型植株, 每份 5 行, 每行 10 株, 行间距为 16.7 cm×18.7 cm。3 叶期和分蘖期分别测定突变体与野生型叶片的叶绿素含量, 抽穗期测定剑叶及颖壳的叶绿素含量, 每个样品 3 次重复。齐穗后调查中间 5 株的叶长和叶宽, 成熟期考查株高、有效穗数、每穗粒数、结实率和千粒重等农艺性状。

称取 0.1~0.2 g 植株新鲜组织剪成 2~3 mm 的小片测定叶绿素含量, 方法参照文献[39]。

### 1.3 突变体温光敏感特性研究

#### 1.3.1 温度梯度实验

在光照培养箱中, 分别设 5 个不同的温度即 20℃、25℃、28℃、30℃和 32℃进行温敏实验, 光照和黑暗时间均为 12 h, 光照强度 15 000 lx。植株长到 2 叶期时测定第 2 片叶的叶绿素含量, 每个样品 3 次重复。

#### 1.3.2 感光特性实验

分别在长日照(光照 16 h/黑暗 8 h)和短日照(光照 8 h/黑暗 16 h)条件下培养 *wlp6* 和野生型种子,

温度恒定 25℃, 光照强度 15 000 lx。2 叶期测定第 2 片叶的叶绿素含量, 每个样品 3 次重复, 研究叶色表型是否受日照长短影响。

分别在 5 000 lx 和 22 000 lx 光照强度下培养 *wlp6* 与野生型种子, 2 叶 1 心期测定了苗高、叶片可溶性糖含量及叶绿素含量, 每个样品 3 次重复。利用植物可溶性糖含量试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)测定可溶性糖含量。

#### 1.4 叶肉细胞超微结构观察

取抽穗期叶片, 用剪刀剪成 2~5 mm 小段, 放入 2.5% 戊二醛中固定, 抽真空直至组织下沉, 送浙江大学农工环测试中心观察叶肉细胞超微结构。

#### 1.5 遗传分析与定位群体的构建

将 *wlp6* 分别与昌恢 121 和 02428 正反交,  $F_1$  自交, 计算  $F_2$  群体的分离比。以 *wlp6* 与 02428 杂交得到的  $F_2$  群体进行基因定位。

#### 1.6 基因定位

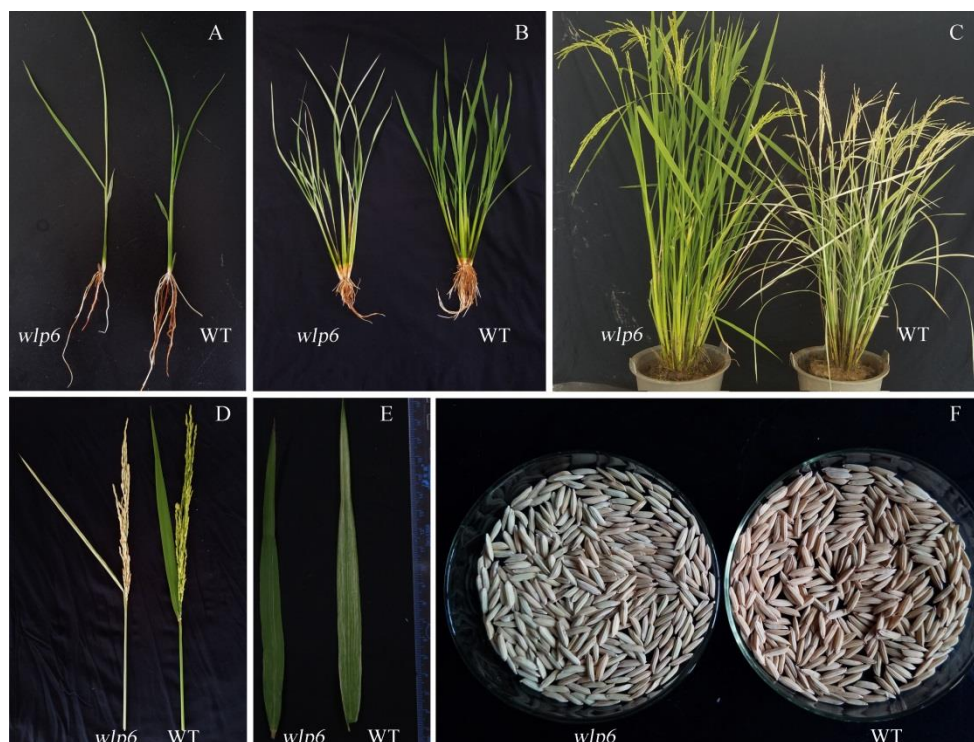
DNA 的提取采用 CTAB 法<sup>[40]</sup>, 略作修改。并根据集群分离分析法, 依据  $F_2$  分离群体植株表型, 随机等量取 15 株白条纹叶植株的 DNA 和 15 株正常植株的 DNA, 构建白条纹叶 DNA 池和正常叶 DNA 池。利用 412 对公共 SSR 标记引物(委托上海生工生物工程有限公司合成)在双亲间进行多态性

筛选, 再用 216 对多态性引物扩增两个 DNA 池, 然后利用在两个基因池间有多态性的 SSR 引物对 22 个白条纹叶和正常叶单株进行验证, 再利用 264 个白条纹叶单株进行初定位。初定位后, 比对 9311 和日本晴基因组序列, 根据插入缺失 4 bp 以上的位点, 开发新的 InDel 标记, 进一步扩大  $F_2$  群体对基因进行精细定位。PCR 参照 Panaud<sup>[41]</sup>的方法, 略作修改。10  $\mu$ L PCR 体系包括缓冲液 1  $\mu$ L, dNTPs 0.2  $\mu$ L, 引物各 0.5  $\mu$ L, 模板 DNA 2  $\mu$ L, 无菌水 5.7  $\mu$ L, *Taq* 聚合酶 0.1  $\mu$ L。反应条件如下: 94℃ 下预变性 5 min; 94℃ 下 30 s, 55℃~58℃ 下 30 s, 72℃ 下 30 s, 30 个循环; 72℃ 下延伸 10 min。反应产物用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

#### 2.1 *wlp6* 表型及主要农艺性状

在南昌按早、中和晚 3 季分别种植突变体与野生型植株, 3 季种植的突变体整个生育期所有叶片及叶鞘均呈白条纹(图 1)。早稻和晚稻穗失绿白化, 成熟后谷壳颜色比野生型浅, 中稻穗部颜色与野生型无明显差别。中稻与晚稻两季调查了 *wlp6* 与野生型的部分农艺性状(表 1), *wlp6* 的株高、有效穗



A—3 叶期; B—分蘖期; C—抽穗期; D—穗的颜色对比; E—抽穗期剑叶对比; F—成熟时籽粒。

A, 3-leaf stage; B, Tillering stage; C, Heading stage; D, Panicle color; E, Flag leaf at heading; F, Mature grains.

图 1 *wlp6* 与野生型表型

Fig. 1. Phenotype of *wlp6* and its wild type.

表 1 *wlp6* 与野生型部分农艺性状

Table 1. Part agronomic traits of *wlp6* and its wild type(WT).

农艺性状 Agronomic trait	中季 Middle season		晚季 Late season	
	突变体 Mutant	野生型 WT	突变体 Mutant	野生型 WT
生育期 Growth duration / d	116.0±3.7	121.0±1.6	135.0±2.3	132.0±3.6
株高 Plant height / cm	137.4±6.6	149.2±5.2*	118.0±4.7	134.6±3.0**
剑叶长 Length of flag leaf / cm	28.2±1.4	36.6±3.3**	31.1±3.9	34.8±2.2
剑叶宽 Width of flag leaf / cm	1.8±0.1	2.0±0.0	1.8±0.2	1.9±0.1
有效穗数 No.of Effective panicle per plant	7.6±1.1	10.2±2.4*	7.4±0.9	10.8±1.6**
穗长 Panicle length / cm	26.2±1.8	27.7±1.0	24.2±0.5	27.2±1.2**
穗粒数 Grain number per panicle	147.1±19.9	190.9±13.7*	142.8±5.9	204.4±20.8**
结实率 Seed-setting rate / %	89.0±4.7	89.3±2.8	60.7±1.1	74.1±5.9**
千粒重 1000-grain weight / g	24.3±0.3	23.6±0.3	22.1±1.6	24.5±1.1**

数据表示为平均数±标准差, 样本数量  $n=5$ ; \*\*, \* 分别表示突变体与野生型间差异达 0.01 和 0.05 显著水平(双尾  $t$  检验)。

Values are listed as mean±SD( $n=5$ ). \*\*, \* Difference between the mutant and WT was significant at 0.01 and 0.05 levels, respectively(two-tailed  $t$  test).

数和每穗粒数在两季均显著低于野生型, 晚稻 *wlp6* 的结实率和千粒重也显著低于野生型。晚稻 *wlp6* 白化表型的加剧导致产量进一步降低。

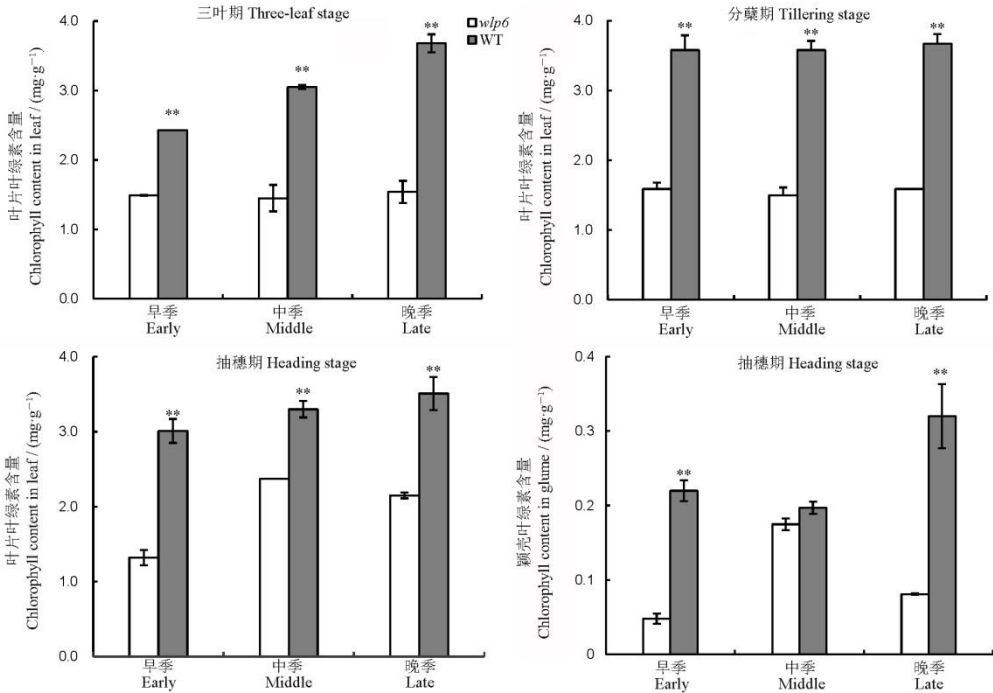
2.2 *wlp6* 与野生型在大田环境下的叶绿素含量

由图 2 可见, 3 叶期, *wlp6* 叶片叶绿素含量显著低于野生型, 随着播种期的延迟野生型叶绿素含量逐渐升高, 而 *wlp6* 无升高的趋势。分蘖期, *wlp6* 的叶片叶绿素含量也显著低于野生型, 随着播期的延迟突变型和野生型的叶绿素含量没有明显变化。抽穗期, 中季种植的突变体叶片叶绿素含量最接近

野生型, 达野生型的 71.82%, 相对于早季(43.85%)和晚季(61.25%), 有所提高。就抽穗期颖壳的叶绿素含量而言, 中季种植的野生型与突变型没有显著差异, 早季与晚季种植的 *wlp6* 颖壳几乎检测不到叶绿素, 这与抽穗期叶片叶绿素含量结果相似, 表明颖壳颜色随叶色变化而变化。根据以上结果推测 *wlp6* 的叶色表型受光温影响。

2.3 叶片细胞叶绿体超微结构

在抽穗期观察 *wlp6* 与野生型剑叶叶绿体的发育情况(图 3), 发现突变体叶片中大部分细胞内部结



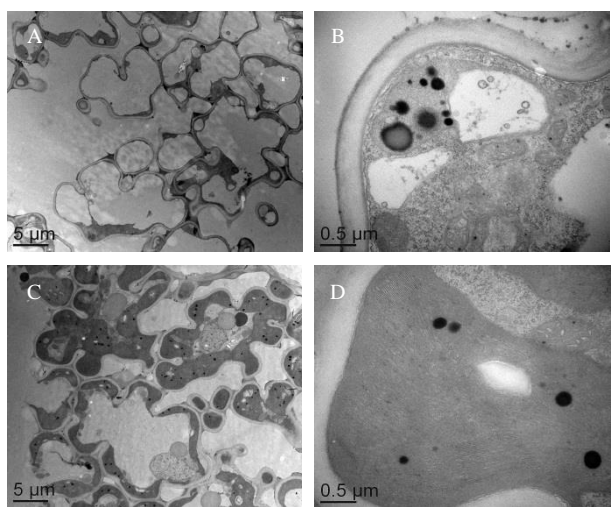
\*\*表示突变体与野生型间差异达 0.01 显著水平(双尾  $t$  检验)。

\*\*Difference between the mutant and WT was significant at 0.01 level, respectively(two-tailed  $t$  test).

图 2 早、中、晚 3 季 *wlp6* 与野生型在 3 叶期、分蘖期和抽穗期的叶片及颖壳的叶绿素含量比较

Fig. 2. Comparison of chlorophyll contents of the leaves and glume between *wlp6* and wild-type in early, middle and late seasons at the three-leaf stage, tillering stage and heading stage.





A 和 B 表示 *wlp6* 叶肉细胞; C 和 D 表示野生型叶肉细胞。

A and B represent mesophyll cells of *wlp6*; C and D represent wild-type mesophyll cells.

图 3 *wlp6* 与野生型叶肉细胞超微结构

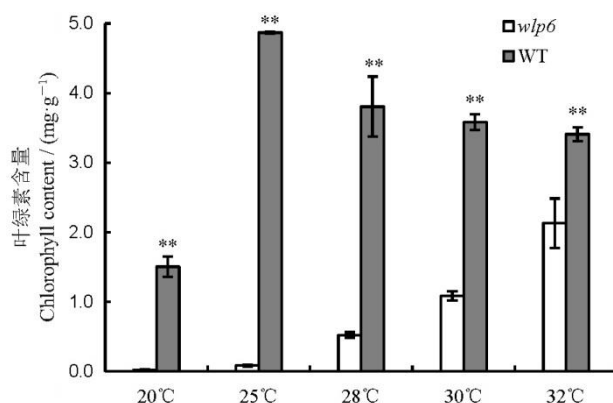
Fig. 3. Ultrastructure of mesophyll cells in *wlp6* and its wild type.

构简单, 叶绿体数目少, 体积小而且尚未分化出类囊体片层结构及基粒, 整个叶绿体表现发育不良。而野生型则与之相反, 细胞内部充实, 叶绿体数目正常, 基粒堆积有序, 含有正常的片层结构。

## 2.4 *wlp6* 的光温敏感特性

### 2.4.1 *wlp6* 对环境温度的敏感特性

在光照培养箱中分别设置 20℃、25℃、28℃、30℃ 和 32℃ 共 5 个温度梯度培养野生型与 *wlp6*, 在 20℃ 时 *wlp6* 叶片几乎完全白化, 随着温度的升高, *wlp6* 叶色有转绿趋势(图 4)。在 2 叶期取第 2 片叶测定叶绿素含量, 发现 20℃ 下 *wlp6* 几乎检测不到叶绿素, 野生型叶绿素含量相较于其他温度也明显下降。随着温度升高 *wlp6* 叶绿素含量逐渐提高, 32℃ 下 *wlp6* 叶绿素含量与野生型最接近, 达



\*\*表示突变体与野生型间差异达 0.01 显著水平(双尾 *t* 检验)。

\*\*Difference between the mutant and WT was significant at 0.01 level, respectively(two-tailed *t* test).

图 5 不同温度下生长的幼苗叶片叶绿素含量

Fig. 5. Leaf chlorophyll contents at various temperatures.

到了野生型的 62.46%(图 5)。

### 2.4.2 *wlp6* 对光照强弱和光照时间的敏感特性

25℃、短日照条件下突变型叶绿素含量仅为野生型的 6.07%, 长日照条件下提高到 18.8%(图 6), 表明突变体表型也受日照长度的影响。

在不同光照强度下培养了 *wlp6* 与野生型种子, 2 叶 1 心期考查苗高、可溶性糖含量、叶绿素含量及叶绿素 a/b 值(图 7)。*wlp6* 在不同光强下苗高、可溶性糖含量和叶绿素含量变化不显著。野生型在弱光照下徒长, 株高和叶绿素含量显著升高, 强光照下植株受到胁迫, 叶片可溶性糖含量显著升高。

## 2.5 *wlp6* 的遗传分析

为研究突变体的遗传特性, 将 *wlp6* 与昌恢 121 和 02428 正反交, 4 个组合的 F<sub>1</sub> 均表现为正常叶色, 抽穗后颖壳和枝梗颜色正常。播种 F<sub>2</sub>, 调查了 *wlp6* 为母本, 昌恢 121 和 02428 为父本的 F<sub>2</sub> 群体的分离比, 白条纹叶与正常叶植株的比例接近 1:3(表 2), 经卡方检验符合孟德尔单基因遗传规律, 表明 *wlp6*

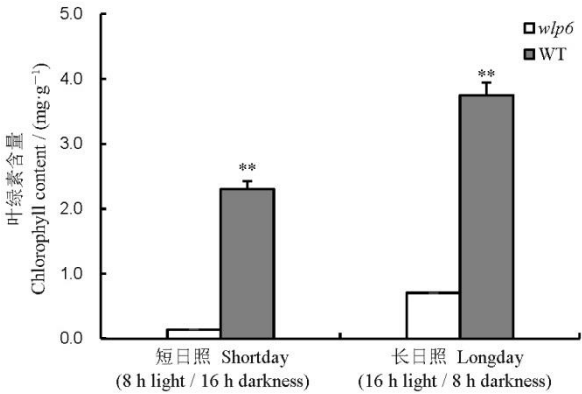


A、B、C、D 和 E 分别表示 20℃、25℃、28℃、30℃ 和 32℃ 下 2 叶期的幼苗。

A, B, C, D and E represent the 2-leaf stage seedlings at 20℃, 25℃, 28℃, 30℃ and 32℃, respectively.

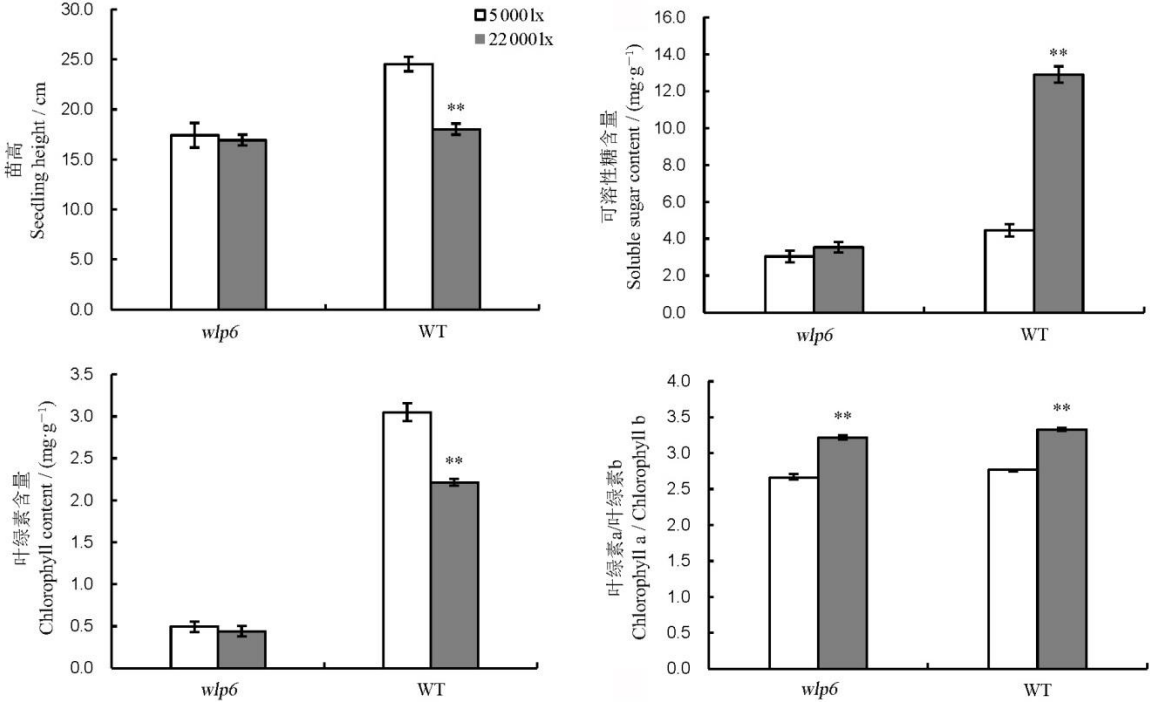
图 4 不同温度下生长的 *wlp6*(左)和野生型(右)

Fig. 4. *wlp6*(left) and its wild type(right) at different temperatures.



\*\*表示突变体与野生型间差异达 0.01 显著水平(双尾 *t* 检验)。  
\*\*Difference between the mutant and WT was significant at 0.01 level, respectively(two-tailed *t* test).

图 6 不同光照时间下生长的幼苗叶绿素含量  
Fig. 6. Chlorophyll contents of seedlings grown under different photoperiods.



\*\*表示突变体与野生型间差异达 0.01 显著水平(双尾 *t* 检验)。  
\*\*Difference between the mutant and WT was significant at 0.01 level, respectively(two-tailed *t* test).

图 7 不同光照强度下 *wlp6* 与野生型幼苗的株高、可溶性糖含量、叶绿素含量及叶绿素 a/b 比值  
Fig. 7. Plant height, soluble sugar content, chlorophyll contents and chlorophyll a/b ratio of *wlp6* and wild-type seedlings under different light intensities.

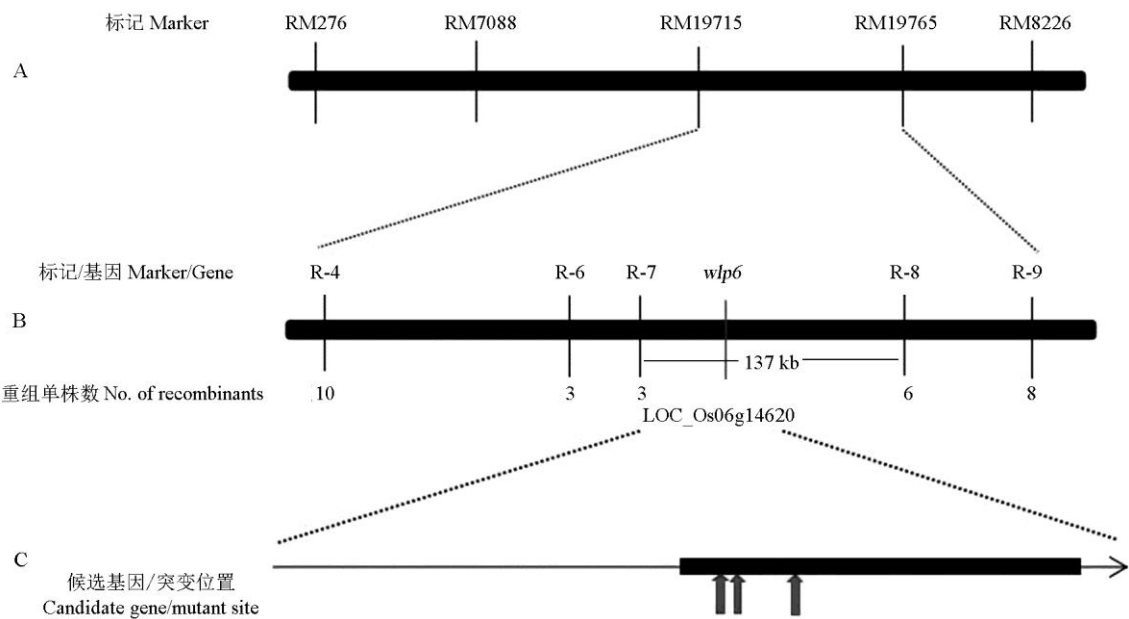
表 2 白条纹株与正常株在两个  $F_2$  群体中的分离比

杂交组合	白条纹	正常株	分离比	卡方值 $\chi^2$
Cross-combination	White striped plants	Normal plants	Ratio of segregation	
<i>wlp6</i> /昌恢 121 <i>wlp6</i> /Changhui 121	838	2 546	1 : 3.04	0.09
<i>wlp6</i> /02428	457	1 412	1 : 3.09	0.27

叶色受 1 对隐性核基因控制。

**2.6 WLP6 的定位**

为了定位 *WLP6*，在  $F_2$  分离群体中提取了白条纹叶单株和正常叶单株叶片的 DNA 用于初定位和精细定位。随机等量混合了 15 株白条纹叶及 15 株正常叶单株 DNA 构成两个 DNA 池，用两亲本间扩增产物有多态的引物扩增两 DNA 池，发现两混池在第 6 染色体上的引物 RM276、RM7088、RM19715 和 RM19765 间有扩增多态。又分别用这些引物扩增 22 个条纹叶与绿叶单株的 DNA，确定 *WLP6* 与第 6 染色体上的这些标记存在连锁关系。后面又利用 264 个白条纹单株将 *WLP6* 定位于标记 RM19715 与 RM19765 间(图 8-A)。在初定位结果的基础上比对 9311 和日本晴的基因组序列，根据插入缺失 4 bp 以上的位点设计 InDel 引物共 12 对，其中有多态的



A—*WLP6* 的初定位; B—*WLP6* 的精细定位; C—候选基因, 粗箭头处表示发生突变的位置。  
A, The initial location of *WLP6*; B, Fine mapping of *WLP6*; C, Candidate gene, thick arrow indicating location of mutation.

图 8 *WLP6* 的定位(A、B)及突变位点(C)  
Fig. 8. Location of *WLP6*(A, B) and mutation site(C).

表 3 定位基因用到的重要引物  
Table 3. Some important primers used for gene mapping.

标记 Marker	正向引物序列 Forward primer	反向引物序列 Reverse primer	物理距离 Physical distance / kb
RM19715	CCAATCTAAATTACGCCGCTAGG	GCCAGCTGTGTTGTAGTTTCG	7 869
RM19765	GCTCCACAGAAAAGCAAAGC	TGCAACAGTAGCTGTAGCCG	8 931
R-9	TTTTCATATGGCGACCAAGC	CATAAAATTTGGCTCAGTACAGC	8 363
R-8	CTCGGAGTAAGCCCAAATCA	CTGGTTGGCTTTTGCTGTG	8 325
R-7	GCTGATTTGTTTGGTCCGGG	TCTTCCGGCATCCCATGTC	8 188
R-6	GTTTAGGCTGTCAGCAAGGC	TCAGTGACGACTCGCTCTTC	8 180

物理距离参考日本晴基因组。  
Physical distance based on Nipponbare genome sequence.

5 对。在 616 个隐性单株中, 标记 R-6、R-7、R-8 和 R-9(表 3)的交换单株数分别为 3、3、6 和 8 个, 并且前后两个标记的交换单株不相同, 因此将 *WLP6* 定位于 InDel 标记 R-7 与 R-8 间, 物理距离 137 kb(图 8-B), 此区间预测了 21 个候选基因。候选基因分析及测序发现, 核糖核酸还原酶小亚基基因 LOC\_Os06g14620 编码区第 142 和 158 位碱基由 T 替换为 C, 第 288 位插入了碱基 A, 碱基的插入导致了翻译提前终止(图 8-C)。因此推测 LOC\_Os06g14620 是 *WLP6* 的候选基因。

3 讨论

Yoo<sup>[15]</sup>等在 2009 年定位并克隆了 *Stl*, 国内学者又相继报道了与 *Stl* 等位的基因 *Gws*<sup>[29]</sup>、

*Wgl58*<sup>[30]</sup>、*St-wp*<sup>[6]</sup>。本研究中的 *WLP6* 与以上这些基因等位, 这些突变体叶片均表现为白条纹, 但出现白穗的仅 *St-wp* 和 *WLP6*。突变位点的不同造成了白条纹叶表型的差异, *Stl* 白条纹出现在第 4 或第 5 片叶片之后, 其编码由 339 个氨基酸组成的核糖核酸还原酶小亚基, 编码区第 119 位碱基由 A 突变成 G, 导致赖氨酸突变成精氨酸, 影响了叶片发育过程中叶绿素的合成。水稻核糖核酸还原酶由大亚基和小亚基形成的异源二聚体构成, 催化核糖核酸二磷酸形成脱氧核糖核酸二磷酸, 在 DNA 复制和损失修复中发挥重要作用<sup>[15]</sup>。 *Gws* 编码区第 314-315 位碱基发生缺失, 第 316-317 碱基由 GC 变为 TT, 导致该基因阅读框移码突变, 蛋白质翻译提前终止, 其表型发生在第 2 叶之后。 *Wgl58* 在外显子上第 511 位碱基发生 G-T 的点突变, 其表型也

是出现在第 2 叶之后。*st-wp* 与 *wlp6* 表型类似, 均呈条纹白叶和白穗, *St-wp* 编码区第 308 位碱基突变(A-T), 导致编码氨基酸突变。*wlp6* 穗在高温天气下可转绿, 编码区多个碱基发生突变, 对蛋白质翻译影响最大的是第 288 位插入了碱基 A, 导致了该基因蛋白质翻译提前终止。

叶绿素是植物光合作用的必要物质, 经光合作用转化的光能可转化成化学能储存在有机物中。叶绿素的生物合成需要通过一系列的酶促反应, 温度过高或过低都会抑制反应进行, 不同白化突变体对温度的感知不一样。许多叶色突变体都对温度敏感, 按温度高低来分又可分为高温敏感型和低温敏感型<sup>[42]</sup>。本研究中 *wlp6* 属于低温敏感型, 在培养箱高温处理和田间作中稻种植条件下, 叶片叶绿素含量均会升高, 叶色转绿。所不同的是, 在昼夜 32℃ 的恒定高温处理下, 突变体叶色并没有完全转绿, 叶绿素含量仅达到了野生型的 62.46%, 而在田间作中稻种植的突变体叶片叶绿素含量达到了野生型的 71.82%。除了温度差异之外, 昼夜温度交替是否对 *wlp6* 叶色转绿有影响, 还需要进一步系统研究。Yoo 等<sup>[15]</sup>发现, *St1* 突变体在昼夜均为 20℃ 和 30℃ 表现白化, 然而夜间与白天 20℃ 与 30℃ 交替的情况下转绿。可见, 白天高温, 夜间低温, 昼夜温度交替是水稻健康生长重要条件。温度升高导致 *wlp6* 幼苗叶绿素含量提高, 其发生的分子机制值得进一步深入探讨。

影响植物生长的外界环境因素除了温度还有水分和光照。光照是作物生长的能量来源, 水稻叶片的光合速率在一定范围内随光照强度的增加而增加, 但长期生长在强光照环境下, 即超过 CO<sub>2</sub> 同化所需, 则光合能力会下降<sup>[43]</sup>。我们在光照培养箱中进行温度梯度实验时, 观察到野生型相对突变体徒长明显, 开始以为是野生型播种过密, 降低播种密度后发现还是相同结果。在同一培养箱及同等栽培条件下野生型与突变体有如此大的差异, 推测突变体对光照强弱不敏感, 因此我们又在培养箱中开展了光照强度实验。弱光胁迫下, 植物功能叶片叶绿素含量上升, 而叶绿素 b 的含量增加得更多, 使叶绿素 a/b 比值下降, 叶绿素 b 的增加有利于吸收漫射光中占优势的波长较短的蓝紫光, 从而使处于弱光中的植株增加对弱光的利用, 这说明光合色素的增加及其相对含量的变化是植物对弱光逆境的一种适应性反应<sup>[44]</sup>。可溶性糖是一类具有渗透调节功能的小分子有机化合物, 是逆境条件下许多非盐生植物的渗透调节剂, 植物在受到胁迫后可溶性糖

含量升高<sup>[45]</sup>。本研究也发现野生型在强光照下植株受到胁迫, 叶片可溶性糖含量显著升高。综合以上因素考虑, 本研究以苗高、可溶性糖含量和叶绿素含量作为幼苗对光照敏感的评价标准。*wlp6* 表现为对光照强弱钝感, 这是叶色突变体的普遍现象还是个例有待验证。

## 参考文献:

- [1] von Caemmerer S, Quick W P, Furbank R T. The development of C4 rice: Current progress and future challenges. *Science*, 2012, 336(6089): 1671-1672.
- [2] Leister D. Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet*, 2003, 19(1): 47-56.
- [3] 张洪征, 程治军, 万建民. 水稻白化突变体研究进展. *生物技术通报*, 2013, 1(11): 1-7.  
Zhang H Z, Cheng Z J, Wan J M. Progresses on the studying of rice leaf albino. *Biotechnol Bull*, 2013, 1(11): 1-7. (in Chinese with English abstract)
- [4] Awan M A, Konzak C F, Rutger J N, Nilan R A. Mutagenic effect of sodium azide in rice. *Crop Sci*, 1980, 20(5): 663-668.
- [5] 孙亚利, 李万昌, 姬生栋. 水稻苗期叶色失绿基因的研究概况. *湖北农业科学*, 2015, 54(11): 2564-2568.  
Sun W J, Li W C, Ji S D. Research overview on the rice seeding leaf chlorosis genes. *Hubei Agric Sci*, 2015, 54(11): 2564-2568. (in Chinese)
- [6] 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. *J Nucl Agric Sci*, 2015, 29(7): 1246-1252. (in Chinese with English abstract)
- [7] Kusumi K, Mizutani A, Nishimura M, Lba 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.
- [8] 孙林鹤. 水稻白化转绿突变体 *v13* 的表型分析及精细定位. 南京: 南京农业大学, 2011.  
Sun L H. Phenotypic analysis of a rice virescent mutant *v13* and fine mapping of the gene causing mutation. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011. (in Chinese with English abstract)



- [9] Sanchez A C, Khush G S. Chromosomal location of some marker genes in rice using the primary trisomics. *J Hered*, 1994, 85(4): 297-300.
- [10] 李红昌, 钱前, 王赞, 李晓波, 朱丽煌, 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, 25(3): 461-466.  
Li H C, Qian Q, Wang Y, Li X B, Zhu L H, Xu J C. Identification and chromosomal localization of rice white panicle. *Chin Sci Bull*, 2003, 25(3): 461-466. (in Chinese with English abstract)
- [11] 朱小燕, 徐芳芳, 桑贤春, 蒋钰东, 代高猛, 王楠, 张长伟, 何光华. 水稻叶脉白化突变体*wpsm*的遗传分析与基因定位. 作物学报, 2013, 39(8): 1409-1415.  
Zhu X Y, Xu F F, Sang X C, Jiang Y D, Dai G M, Wang N, Zhang C W, He G H. Genetic analysis and gene mapping of a rice white midrib mutant *wpsm*. *Acta Agron Sin*, 2013, 39(8): 1409-1415. (in Chinese with English abstract)
- [12] 李娜, 储黄伟, 文铁桥, 张大兵. 水稻白色中脉*Oswm*突变体的遗传分析与基因定位. 上海农业学报, 2007, 23(1): 1-4.  
Li N, Chu H W, Wen T Q, Zhang D B. Genetic analysis and mapping of the rice white midrib mutant *Oswm*. *Acta Agric Shanghai*, 2007, 23(1): 1-4. (in Chinese with English abstract)
- [13] 胡景涛, 张甲, 李园园, 付宠允, 郑静, 陈家彬, 胡燕, 李仕贵. 水稻白色中脉*Oswm2*的遗传分析与分子标记定位. 遗传, 2008, 30(9): 1201-1206.  
Hu J T, Zhang J, Li Y Y, Fu C Y, Zheng J, Chen J B, Hu Y, Li S G. Genetic analysis and mapping of a rice white midrib mutant *Oswm2*. *Hereditas*, 2008, 31(9): 1201-1206. (in Chinese with English abstract)
- [14] 金怡, 刘合芹, 汪得凯, 陶跃之. 一个水稻苗期白条纹叶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. *Chin J Rice Sci*, 2011, 25(5): 161-166. (in Chinese with English abstract)
- [15] Yoo S C, Cho S H, Sugimoto H, Li J J, Kusumi K, Koh H J, Koh I, Paek N C. Rice virescrt 3 and stripe 1 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.
- [16] Nagao S. Genie analysis and linkage relationship of characters in rice. *Adv Genet*, 1951, 4(4): 181-212.
- [17] Iwata N, Satoh H, Omura T. Linkage studies in rice new genes belonging to the 11th linkage group. *Jpn J Breed*, 1979, 29(2): 182-183.
- [18] Maekawa M. Studies on genetical difference between distantly related rice varieties. *Mem Facul Agric Hokk Univ*, 1982, 13(2): 146-177.
- [19] Maekawa M. A new leaf stripe gene *st-5* its linkage with *d-2* and the location of gene *P* in the second linkage group. *Rice Genet Newsl*, 1988, 5(21): 85-87.
- [20] Maekawa M, Inukai T, Shinbashi N. A new gene for leaf stripe(*st-6*) found in linkage group 3. *Rice Genet Newsl*, 1990, 7(11): 108-109.
- [21] Stern D B, Hanson M R, Barkan A. Genetics and genomics of chloroplast biogenesis: Maize as a model system. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(6): 293-301.
- [22] 刘少奎, 张启军, 漆庆明, 赖东, 廖慧敏, 颜文飞, 张斌, 吕川根. 水稻白条纹新基因*st9(t)*的初步定位. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 928-932.  
Liu S K, Zhang Q J, Qi Q M, Lai D, Liao H M, Yan W F, Zhang B, Lu C G. Mapping a novel rice white stripe gene, *st9(t)*. *Jiangsu J Agric Sci*, 2012, 28(5): 928-932. (in Chinese with English abstract)
- [23] 何颖红, 邹国兴, 饶玉春, 胡江, 刘坚, 高振宇, 郭龙彪, 朱丽, 钱前. 水稻白条纹叶突变体(*st10*)的遗传分析与基因定位. 分子植物育种, 2011, 9(2): 136-142.  
He Y H, Zou G X, Rao Y C, Hu J, Liu J, Gao Z Y, Guo L B, Zhu L, Qian Q. Genetic analysis and molecular mapping of a white-stripe leaf mutation in rice. *Mol Plant Breed*, 2011, 9(2): 136-142. (in Chinese with English abstract)
- [24] 成钦淑, 叶邦全, 袁灿, 李伟滔, 尹俊杰, 王静, 贺闽, 汪吉春, 王玉平, 李仕贵, 陈学伟. 水稻白条纹叶突变体*st11*的遗传分析与基因定位. 中国水稻科学, 2015, 29(01): 14-21.  
Cheng Q S, Ye B Q, Yuan C, Li W T, Yin J J, Wang J, He M, Wang J C, Wang Y P, Li S G, Cheng X W. Genetic analysis and gene mapping of white stripe leaf mutant *st11* in rice. *Chin J Rice Sci*, 2015, 29(1): 14-21. (in Chinese with English abstract)
- [25] 叶卫军. 水稻白条纹叶突变体*st12*的精细定位. 金华: 浙江师范大学, 2013.

- Ye W J. Fine mapping of a white stripe leaf mutant *st12* in rice. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2013. (in Chinese with English abstract)
- [26] 桑贤春, 徐芳芳, 凌英华, 赵芳明, 杨正林, 唐彦强, 田晓庆, 李云峰, 何光华. 水稻条斑花叶突变体 *st(t)* 的鉴定与遗传定位. 作物学报, 2010, 36(2): 211-216.  
Sang X C, Xu F F, Ling Y H, Zhao F M, Yang Z L, Tang Y Q, Tian X Q, Li Y F, He G H. Identification and molecular mapping of stripe leaf mutant *st(t)* in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron Sin*, 2010, 36(2): 211-216. (in Chinese with English abstract)
- [27] 邝小林. 水稻白条纹叶突变体基因 *st(k)* 的遗传分析及基因定位. 成都: 四川农业大学, 2013.  
Kuang X L. Genetic analysis and molecular mapping of a white stripe leaf gene *st(k)* in rice. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2013. (in Chinese with English abstract)
- [28] 王新华. 水稻白条纹叶突变体 *B38* 的表型分析及突变基因的精细定位. 南京: 南京农业大学, 2013.  
Wang X H. Phenotypic analysis of rice green-white-stripe mutant *B38* and fine mapping of the underlying gene. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013. (in Chinese with English abstract)
- [29] 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)
- [30] 辛龙. 水稻白条纹叶突变体 *wgl58* 的遗传分析与基因定位. 成都: 四川农业大学, 2013.  
Xin L. Genetic analysis and gene mapping of a White-stripe-leaf mutant *wgl58* in rice. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2013. (in Chinese with English abstract)
- [31] 廖婷婷. 水稻白化基因 *AL5942* 的遗传鉴定及早衰基因 *D475* 的图位克隆. 成都: 四川农业大学, 2015.  
Liao T T. Genetic analysis and map-based cloning of the albino mutant *al5942* and the early senescence mutant *d475* in rice. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2015. (in Chinese with English abstract)
- [32] 宋桂云, 徐正进, 苏慧, 王翠花, 宫雅琴, 孙海燕. 不同穗型的两个水稻品种株型的研究. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2006, 21(3): 294-299.  
Song G Y, Xu Z J, Su H, Wang C, Gong Y Q, Sun H Y. The study on plant shape of different panicle rice varieties. *J Inn Mong Univ Nat*, 2006, 21(3): 294-299. (in Chinese with English abstract)
- [33] 左维维. 水稻白条纹叶白穗突变体基因 *WP4* 的图位克隆. 杭州: 浙江农林大学, 2016.  
Zuo W W. Map-based cloning of a rice mutant gene *wp4* controlling white stripe leaf and panicle. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2016. (in Chinese with English abstract)
- [34] Wang Y, Wang C, Zheng M, Lyu J, Xu Y, Li X, Niu M, Long W, Wang D, Wang H, Terzaghi W, Wang Y, Wan J. WHITE PANICLE 1, a Val-tRNA synthetase regulating chloroplast ribosome biogenesis in rice, is essential for early chloroplast development. *Plant Physiol*, 2016, 170(4): 2110.
- [35] 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, Liao H X, Yang B, Zou S Y, Zhu X Y, He G H, Sang X C. Identification and gene fine mapping of white panicle mutant *wp4* in *Oryza sativa*. *Acta Agron Sin*, 2015, 41(6): 838-844. (in Chinese with English abstract)
- [36] Song J, Wei X, Shao G N, Sheng Z H, Chen D B, Liu C L, Jiao G A, Xie L H, Tang S Q, Hu P S. The rice nuclear gene *WLP1* encoding a chloroplast ribosome L13 protein is needed for chloroplast development in rice grown under low temperature conditions. *Plant Mol Biol*, 2014, 84(3): 301-314.
- [37] 陈德西, 李婷, 曲广林, 黄文娟, 何忠全, 李仕贵. 水稻条斑和颖花异常突变体 *st-fon* 的鉴定与遗传分析. 中国水稻科学, 2012, 26(6): 677-685.  
Chen D X, Li T, Qu G L, Huang W J, He Z Q, Li S G. Characterization and genetic analysis of a streaked and abnormal glumous flower mutant *st-fon*. *Chin J Rice Sci*, 2012, 26(6): 677-685. (in Chinese with English abstract)
- [38] Zhang Z G, Cui X A, Wang Y W, Wu J X, Gu X F, Lu T G. The RNA editing actor *WSP1* is essential for chloroplast development in rice. *Mol Plant*, 2017, 10(1): 86-98.

- [39] 宋建. 水稻白叶白穗突变体基因*wlpl*的图位克隆与功能分析. 北京: 中国农业科学院, 2013.  
Song J. Map-based cloning and functional study of rice mutant gene *wlpl* gene controlling white leaf and panicle. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013. (in Chinese with English abstract)
- [40] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Mol Biol Manual*, 1988, 6(1): 1-10.
- [41] Panand O, Chen X, McCouch S R. Development microsatellite markers characterization of simple sequence length polymorphism (SSLPs) in rice (*Oryza sativa* L). *Mol Gen Genet*, 1996, 252(5): 597-607.
- [42] Iba K, Takamiya K I, Yoshihiro T. Formation of functionally active chloroplast is determined at a limited stage of leaf development in vi-rescent mutant of rice. *Dev Genet*, 1991, 12: 342-348.
- [43] 夏冰, 阳树英, 刘清波. 生态因子对水稻叶片光合生理功能的影响综述. 作物研究, 2008(2): 140-142.
- Xia B, Yang S Y, Liu Q B. Effects of ecological factors on photosynthetic physiological functions of rice leaves. *Crop Res*, 2008(2): 140-142. (in Chinese with English abstract)
- [44] 陈晓远, 凌木生, 高志红. 水分胁迫对水稻叶片可溶性糖和游离脯氨酸含量的影响. 河南农业科学, 2006(12): 26-30.  
Chen X Y, Ling M S, Gao Z H. Effects of water stress on soluble sugars and free proline content in leaves of rice. *J Henan Agric Sci*, 2006(12): 26-30. (in Chinese with English abstract)
- [45] 杨东, 段留生, 谢华安, 黄庭旭. 水稻幼苗生长对弱光胁迫的响应及相关分析. 中国农学通报, 2011, 27(5): 70-79.  
Yang D, Duan L S, Xie H A, Huang T X. The response and correlation analysis of rice seedlings growth to low-light stress. *Chin Agric Sci Bull*, 2011, 27(5): 70-79. (in Chinese with English abstract)