

# 一个水稻苗期温敏感白色条斑叶突变体的遗传分析及基因定位

李 超<sup>1</sup> 林冬枝<sup>1,\*</sup> 董彦君<sup>1,\*</sup> 叶胜海<sup>2</sup> 张小明<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>上海师范大学 生命与环境科学学院 植物遗传与功能基因研究室, 上海 200234; <sup>2</sup>浙江省农业科学院 作物与核技术利用研究所, 浙江 杭州 310021; \* 通讯联系人, E-mail: dzlin@shnu.edu.cn; dong@shnu.edu.cn)

## Genetic Analysis and Mapping of a Thermo-Sensitive White Stripe Leaf Mutant at the Seedling Stage in Rice(*Oryza sativa*)

LI Chao<sup>1</sup>, LIN Dong-zhi<sup>1,\*</sup>, DONG Yan-jun<sup>1,\*</sup>, YE Sheng-hai<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-ming<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Laboratory of Plant Genetics and Functional Genes, College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; <sup>2</sup>Institute of Crop and Nuclear Technology Utilization, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; \* Corresponding author, E-mail: dzlin@shnu.edu.cn; dong@shnu.edu.cn)

LI Chao, LIN Dongzhi, DONG Yanjun, et al. Genetic analysis and mapping of a thermo-sensitive white stripe leaf mutant at the seedling stage in rice(*Oryza sativa*). *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(3): 223-227.  
**Abstract:** A thermo-sensitive white stripe-leaf mutant (*tws*) was selected from the M<sub>2</sub> progeny of a japonica rice variety, Jiahua 1, treated with <sup>60</sup>Co γ-radiation. In comparison with the wild type parent (Jiahua 1), the mutant displayed a phenotype of white stripe on the 3rd and 4th leaves, but began to turn a normal green phenotype on the 5th leaf when grown at low temperatures (20℃, 24℃). And also the content of total chlorophyll showed an obvious decrease in the leaves with white stripe. These results suggest that the expression of the mutant trait was thermo-sensitive and correlated with the leaf age of seedlings. The genetic analysis indicated that the mutant trait was controlled by a single recessive nuclear gene, designated as *tws* (thermo-sensitive white stripe-leaf). In addition, by using SSR markers and an F<sub>2</sub> segregating population derived from the cross between the *tws* mutant and 9311, the *tws* gene was mapped between MM3907 and MM3928 with a physical distance of 86 kb on chromosome 4.  
**Key words:** rice(*Oryza sativa*); thermo-sensitivity; white stripe-leaf; gene mapping

李 超,林冬枝,董彦君,等. 一个水稻苗期温敏感白色条斑叶突变体的遗传分析及基因定位. 中国水稻科学, 2010, 24(3): 223-227.  
**摘 要:** 通过对梗稻品种嘉花 1 号<sup>60</sup>Co γ 射线诱变,从 M<sub>2</sub> 中筛选出一株低温敏感型白色条斑叶突变体(*tws*)。它在低温(20℃,24℃)条件下培养时,苗期第 3 和第 4 叶表现出白色条斑,而第 5 叶开始转为正常。低温条件下该突变体白斑叶片叶绿素含量明显下降。该突变体白色条斑叶性状具有温敏感性,且与叶龄相关。遗传分析表明,该突变性状受 1 对隐性核基因控制,定名为 *tws*(thermo-sensitive white stripe-leaf)基因。以 *tws* 突变体与籼稻 9311 杂交的 F<sub>2</sub> 分离群体作为定位群体,利用 SSR 标记将该基因定位在第 4 染色体 MM3907 和 MM3928 之间,其物理距离约为 86 kb。  
**关键词:** 水稻; 温度敏感性; 白色条斑叶; 基因定位  
**中图分类号:** Q943.2; S511.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-7216(2010)03-0223-05

水稻(*Oryza sativa* L.)是一种重要的粮食作物,世界上近一半人口,包括几乎整个东亚和东南亚的人口,都以稻米为主食。同时,由于具有较小的基因组(约 430 Mb)并建立了比较完善的转化系统以及与其他禾本科植物较好的共线性,水稻成为研究植物功能基因的一种重要的单子叶模式植物<sup>[1]</sup>。目前寻找新基因和认识新基因的功能已经成为功能基因组学研究的重要任务之一。突变体是基因克隆及基因功能研究的理想材料,同时它又能作为新的种质用于水稻遗传育种研究。而温度敏感型叶色突变体则是研究高等植物光合作用,叶绿体遗传、分化

及发育和内部生物化学过程的有力工具。在高等植物中,已对许多温度敏感型叶色突变体进行了研究,比如棉花<sup>[2]</sup>、拟南芥<sup>[3]</sup>、大麦<sup>[4]</sup>、水稻<sup>[5]</sup>和玉米<sup>[6]</sup>。本研究对一个新的低温敏感型白色条斑叶突变体的形态和生理特征进行了初步调查,并对它进行了遗传分析和分子定位,以期为该基因的克隆和功能分

收稿日期: 2009-09-26; 修改稿收到日期: 2009-11-05。  
**基金 项 目:** 上海市科学技术委员会资助项目(08PJ14085, 075405117, 09DJ1400505, 0939191200); 国家自然科学基金资助项目(30971552); 国家航天育种工程资助项目(2006HT100013)。  
**第一作者简介:** 李 超(1984—),男,硕士研究生。

析奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

水稻温敏感白色条斑叶突变体 *tws* (thermo-sensitive white stripe-leaf mutant) 来源于经  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线诱变处理的粳稻嘉花 1 号产生的  $M_2$  群体后代,经多次自交繁殖和选择,该突变体的各种农艺性状已稳定。

### 1.2 突变体苗期叶色温敏感特征鉴定

为明确 *tws* 突变体苗期叶色的温敏感特征,将 *tws* 突变体及其野生型嘉花 1 号的种子于 25℃ 下浸种催芽 4 d 后,播于装有水稻土的培养皿内,分别放置在 4 种不同温度(20℃、24℃、28℃和 32℃),光照强度为 180  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  的光照培养箱(GXZ 智能型,宁波江南仪器厂)中培养,每天光照 12 h。从 2 叶期开始观察叶色的变化,并分别在第 3、第 4 和第 5 叶完全展开时使用快速非破坏性叶绿素计(SPAD-502,Minolta,日本)测定幼叶最宽处的叶绿素 SPAD 值<sup>[7-8]</sup>。每次测量取野生型和突变型亲本各 5 株,每个温度 3 次重复。本试验采用 SPAD 值作为水稻叶片总叶绿素的相对含量。

### 1.3 幼苗叶片叶绿体电镜观察

分别取一直在 20℃ 下生长具有 20 d 苗龄的突变体第 3 叶白色部分和野生型嘉花 1 号相同部位叶片,用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸(用 0.2 mol/L pH 7.2 的磷酸缓冲液配制)于 4℃ 下固定 5 h 后,分别用 50%、70%、80%、95% 和 100% 的乙醇和丙酮进行脱水,最后用环氧树脂包埋,样品经过切片、醋酸铀染色后用 Hitachi-600 型透射电镜进行观察和拍照。

### 1.4 遗传分析和定位群体的构建

2007 年夏在上海以 *tws* 突变体为母本分别与籼稻 9311 和粳稻 P24 杂交配组,同时还分别以它为父本与培矮 64S、广占 63S 进行杂交配组,获得的  $F_1$  种子同年冬季在海南省陵水县浙江省农业科学院南繁基地加代种植,获得  $F_2$  种子。 $F_2$  种子经 25℃ 浸种催芽后,播种于盛有水稻土的塑料盒内,并放置在光照培养箱(GXZ 智能型,宁波江南仪器厂)中,设置温度为 20℃,光照强度为 180  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,每天光照 12 h。约 10 d 后开始观察幼苗叶色分离情况,进行统计分析。并进一步将从 *tws* 突变体/9311 的  $F_2$  群体中挑选出的突变型幼苗移至 32℃ 光照培养箱中继续生长,用于 DNA 提取及基因定位。

## 1.5 水稻 DNA 的提取

亲本及其定位  $F_2$  遗传群体水稻植株的基因组 DNA 提取均采用 CTAB 法<sup>[9]</sup>,并略作调整。

## 1.6 突变体基因的定位

本研究首先选择 231 对 Gramene (<http://www.gramene.org/>) 公布的微卫星分子标记(SSR)引物检测 *tws* 突变体和 9311 的多态性,然后采用有多态性的 SSR 引物对 75 株突变型  $F_2$  遗传群体进行连锁分析初定位。接着进一步扩大  $F_2$  遗传群体至 330 株,并根据浙江大学沃森基因组科学研究院(<http://www.dnaresearch.oxfordjournals.org>)开发的和 Gramene 公布的 SSR 引物对突变基因进行进一步定位。25  $\mu\text{L}$  的 PCR 反应体系包括:100 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)、100 mmol/L KCl、20 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ 、80 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2.5 mmol/L dNTP、10  $\mu\text{mol/L}$  引物、5 U/mL *Taq* 酶和 20 ng 模板 DNA。使用 Eppendorf PCR 仪进行扩增,引物由上海生工生物工程技术服务公司合成,反应体系条件为:94℃ 下预变性 4 min;94℃ 下变性 60 s,55℃ 下复性 45 s,72℃ 下延伸 1 min,32 个循环;72℃ 下再延伸 10 min;反应产物用 2.5%~3.5% 琼脂糖凝胶电泳,经溴化乙锭染色后在 UVP 凝胶成像仪上成像。

## 1.7 连锁分析

根据已有分子标记的分析结果,利用 MAPMAKER/EXP 3.0<sup>[10]</sup> 作图软件,构建目标基因区域的分子标记连锁图谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变体的温敏感特征

对 4 种温度下幼苗的叶色调查表明(图 1),20℃ 下 3 叶期突变体的白色条斑表型最为明显,只有中脉附近表现为淡绿色,其他部分几乎为白色。但随着处理温度的升高,失绿逐渐减轻,28℃ 时基本恢复正常,32℃ 时与野生型相比无明显差异;同时还发现在同一低温(20℃ 或 24℃)下,第 3 叶白色条斑表现最为显著,到第 4 叶表现渐减,第 5 叶基本不表现,叶色接近正常。叶绿素含量测定结果显示(图 2),与野生型嘉花 1 号相比,低温下第 3 和第 4 叶片的叶绿素含量均显著下降,且第 3 叶比第 4 叶下降更明显,但第 5 叶的叶绿素含量均接近野生型正常水平。在 28℃ 和 32℃ 下,所有幼叶叶绿素含量及其变化趋势均与野生型亲本一致。由此初步推定,*tws* 突变体的白色条斑叶表型表达的临界温度为

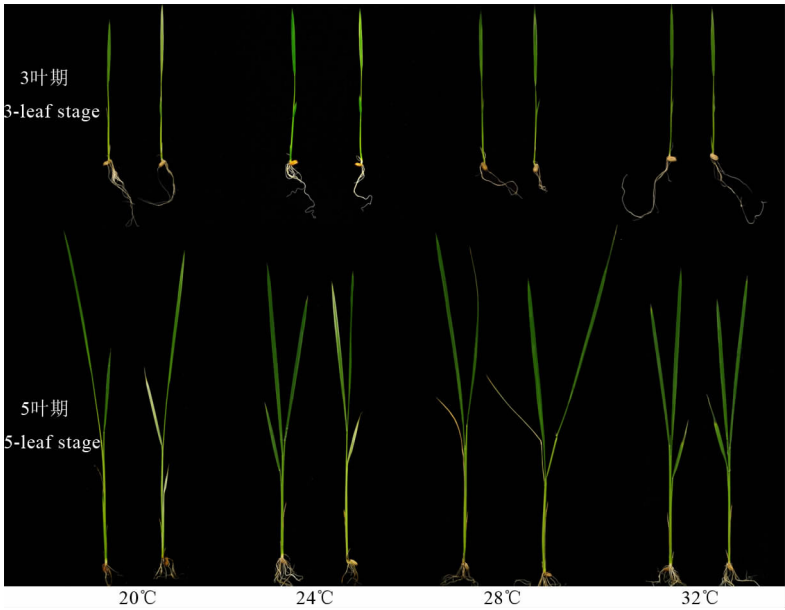


图 1 不同温度下突变体 *twS* (右) 和野生型嘉花 1 号 (左) 幼苗的叶色变化  
Fig. 1. Changes in leaf color of the *twS* mutant (right) and wild type (left) grown at different temperatures.

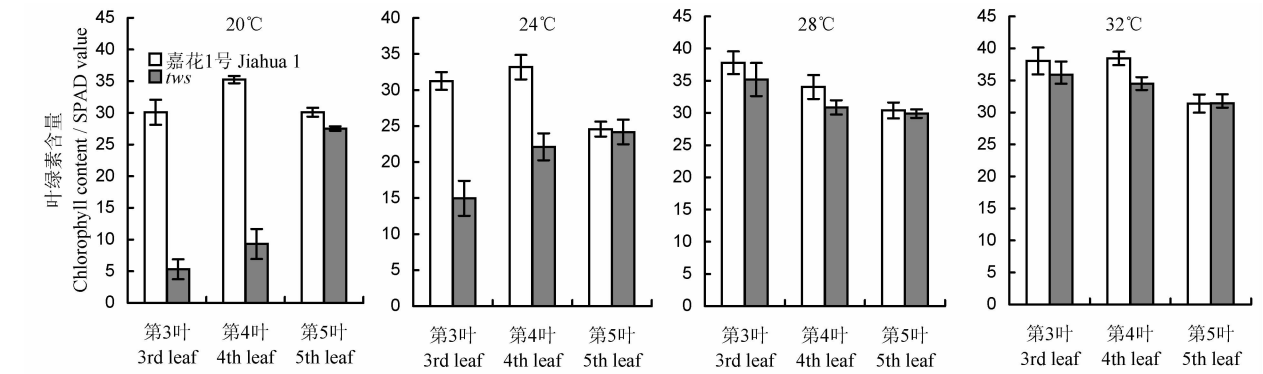


图 2 不同温度下各幼叶叶绿素含量的变化  
Fig. 2. Changes in chlorophyll content in leaves from seedlings grown at different temperatures.

28℃左右,并且此温敏性状的表达与叶龄相关,只发生在苗期 5 叶期之前。

通过透射电镜照片对比发现(图 3),野生型的叶绿体内部具有明显的类囊体基粒片层结构,数量丰富,排列紧凑;突变体叶片白色部位的叶绿体发育极不正常,只能看到一些空的囊泡状结构,观察不到类囊体基粒片层结构存在。这表明可能是低温导致了该突变体叶绿体发育的异常,从而阻碍叶绿素的合成。

2.2 突变体性状的遗传分析

不论以 *twS* 突变体为母本还是父本,它与粳稻 P24,籼稻广占 63S、培矮 64S 和 9311 的杂交后代中,所有 F<sub>1</sub> 的个体都表现为正常表型,说明 *twS* 突变体为隐性核基因突变,与细胞质无关。本研究对

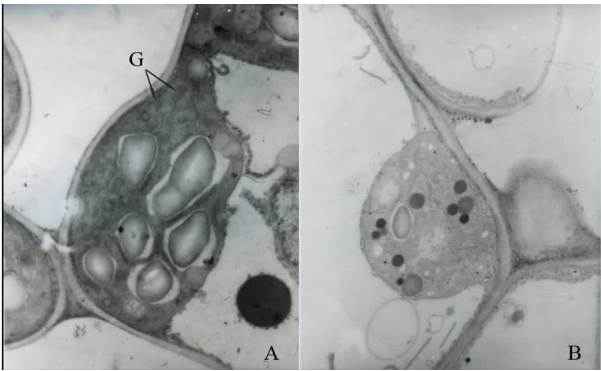


图 3 20℃条件下突变体与野生型第 3 叶叶绿体(12 000 倍)  
Fig. 3. Chloroplasts (×12 000) of the 3rd leaf in wild and mutant seedlings grown at 20°C.

A—野生型; B—突变型; G—基粒类囊体。  
A, Wild type; B, Mutant; G, Granum thylakoid.

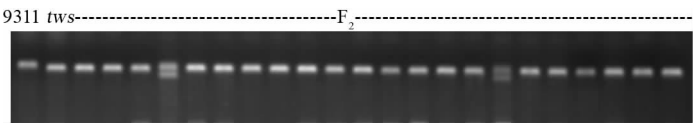


图 4 SSR 标记 RM280 在突变型 F<sub>2</sub> 植株群体的分离带型  
Fig. 4. Segregation of the SSR marker RM280 in mutants from F<sub>2</sub> population.

*tw*s 突变体与粳稻 P24 杂交产生的 926 株 F<sub>2</sub> 群体进行调查,发现野生型正常植株为 713 株,突变体型植株为 213 株,其分离比例符合 3 : 1 ( $\chi^2 = 1.97 < \chi^2_{0.05} = 3.84$ )。表明该突变性状由 1 对隐性核基因控制,暂将该突变基因命名为 *tw*s。

2.3 突变体的基因定位

利用 Gramene 公布的分布在水稻 12 条染色体上的 231 对 SSR 引物,对 *tw*s 突变体和 9311 进行多态性检测,共发现有 102 对 SSR 引物在两个亲本间表现出多态性。对 *tw*s 突变体与 9311 的杂交后代中的 75 株突变体型 F<sub>2</sub> 植株进行连锁分析,结果发现该突变基因 *tw*s 与第 4 染色体上的分子标记 RM5503 和 RM280 连锁(图 4),并把 *tw*s 基因初步定位于 MM3752 与 RM280 之间(图 5),其物理距离分别为 1.7 cM 和 1.9 cM。然后,进一步利用新发展的 SSR 标记(表 1),并把定位群体扩大至 330 株突变型 F<sub>2</sub> 植株,将 *tw*s 基因定位于分子标记 MM3907 与 MM3928 之间(图 5),其物理距离约为 86 kb。

表 1 本研究中新发展的分子标记  
Table 1. Newly developed molecular markers in this study.

| 分子标记<br>Molecular marker | 引物序列<br>Sequence of primers(5' - 3')                | 引物 BAC 位置<br>BAC position of markers |
|--------------------------|---|--------------------------------------|
| MM3752                   | ACAGCATGCGCACCATAAAGG<br>CGTGGTTCACACACTTACATTGTTGG | AL606652                             |
| MM3861                   | GCTACTACTGCTGGTATTGTATCC<br>AGCACAGGTGAGTTATTGTAGC  | AL606456                             |
| MM3907                   | CCGGAAACTCTAAAAAGCGA<br>CTGATACCCGGTTTTGCCTA        | AL606641                             |
| MM3928                   | GAGTGCAATGGCATGGAGATCG<br>CCAGCTAGCGTTGCTTGTTC      | AL606651                             |
| MM3944                   | TCTTCGTGGGGGCTCTAATA<br>CCATGCATAGGAGTAGCTTCG       | AL606651                             |
| MM3978                   | CTGAACAATGTACAAGCACAGAGG<br>CCTTAGATGTGCTATTGGGATGC | AL606686                             |
| MM4014                   | ATCCGTCTTATTCCATGCCA<br>AACAAACCATGGTGAACAAGA       | AL606637                             |

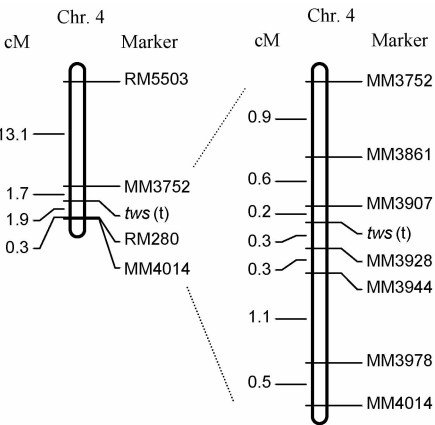


图 5 *tw*s 基因在第 4 染色体上的位置  
Fig. 5. Location of *tw*s gene on chromosome 4 of rice.

3 讨论

水稻基因组测序工作的完成以及高密度分子标记图谱的构建,大大加快了水稻图位克隆和功能基因组研究的进程。不断有水稻新基因克隆及功能研究的报道。叶绿体作为光合作用的场所,其发育调控机理一直是植物生理学和分子生物学研究的热点。

到目前为止,已报道的与叶绿素缺失相关的叶色突变体有 70 多个<sup>[11-12]</sup>,其中对 *virescent-1* (*vl*)<sup>[13]</sup>、*virescent-2* (*v2*)<sup>[14-15]</sup>、*virescent-3* (*v3*) 和 *stripe-1* (*stl*)<sup>[5]</sup> 的研究较为详细,但在众多叶绿素缺失突变体中只有少数表现出温敏感性,如 7436S<sup>[16-17]</sup>, *W*<sub>4</sub>、*W*<sub>11</sub>、*W*<sub>17</sub>、*W*<sub>25</sub><sup>[18]</sup>, *Fan 5*<sup>[19-20]</sup>, *W1*<sup>[21]</sup>, *all2*<sup>[22]</sup>, *Cdel* (*t*)<sup>[23]</sup>,并且对相关基因进行定位的还不多。本研究中的 *tw*s 突变体在低温条件下(<28℃)5 叶期之前表现为白色条斑叶色,电镜观察表明白色区域的叶绿体发育缺陷严重,是低温敏感型,其低温敏感性与叶龄相关。有趣的是,过去报道的与温度相关的叶绿素突变体 *virescent-3* (*v3*) 和 *stripe-1* (*stl*)<sup>[5]</sup> 在 20℃ 或 30℃ 恒定温度培养时,表现出全白的叶片,但在 30℃/20℃ 昼夜温度交替的条件下培养时,表现出几乎正常的叶片。*v3* 和

*stl* 基因在叶片早期发育叶绿体生物合成过程中分别编码核苷酸还原酶的大小亚基;而突变基因定位在第 2 染色体上的 *Cdel* (t) 突变体只有在高于 26℃ 时才表现叶绿素缺失,是高温敏感型;另与 *tws* 突变体表型相类似的 7436S 突变体的 *tsc-1* 基因定位在第 11 染色体上,其余温敏感突变体表型的表达均未见与叶龄相关的报道。因此,*tws* 突变体是一个新的叶绿素缺失突变体。

本研究将 *tws* 基因定位在水稻第 4 染色体上的微卫星标记 MM3907 和 MM3928 之间,物理距离约为 86 kb,跨越 AL606641 和 AL606651 两个 BAC 克隆群。利用 RiceGAAS (<http://www.ricegaas.rgp.dna.affrc.go.jp>) 进行基因预测的结果显示,该区域内共有 17 个预测基因,其中 7 个为预测有功能的基因,其余为假定蛋白或未知蛋白,但发现在所有预测的基因中没有与叶绿素合成或叶绿体发育相关的基因,说明 *tws* 可能是一个新的受温度调节控制的早期叶绿体发育相关基因。对 *tws* 基因的克隆及功能研究将有助于加深我们对水稻叶片叶绿体发育温敏感调控分子机理的理解。另外,通过基因组位置比较发现 *tws* 基因的定位区域与一个已初定位的水稻白色中脉突变体 *Oswm* 基因<sup>[24]</sup> 的定位区域存在部分重叠。更有趣的是,我们也观察到 *tws* 突变体的生长后期的叶片中脉也出现白色,但至于 *tws* 基因与 *Oswm* 基因是否为等位基因,或者 *tws* 基因有着一因多效的现象还有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Han B, Xue Y B, Li J Y, et al. Rice functional genomics research in China. *Phil Trans R Soc B*, 2007, 362 (1482): 1009-1021.
- [2] Alberte R S, Hesketh J D, Hofstra G, et al. Composition and activity of the photosynthetic apparatus in temperature sensitive mutants of higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71: 2414-2418.
- [3] Markwell J, Osterman J C. Occurrence of temperature-sensitive phenotypic plasticity in chlorophyll-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1992, 98: 392-394.
- [4] Gálová E, Böhmová B, Sevcovicová A. Analysis of some barley chlorophyll mutants and their response to temperature stress. *Photosynthetica*, 2000, 38: 29-35.
- [5] Soo C Y, Sung H C, Hiroki S, et al. 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] Pasini L, Bruschini S, Bertoli A, et al. Photosynthetic performance of cold-sensitive mutants of maize at low temperature. *Physiol Plant*, 2005, 124: 362-370.
- [7] Dwyer L M, Tollenaar M, Houwing L. A nondestructive method to monitor leaf greenness in corn. *Can J Plant Sci*, 1991, 71: 505-509.
- [8] Watanabe S, Hatanaka Y, Inada K. Development of a digital chlorophyll meter: I. Structure and performance. *Jpn J Crop Sci*, 1980, 49(special issue): 89-90.
- [9] Muray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [10] Lincoln S, Daly M, Lander E. Constructing genetics maps with MAPMAKER/EXP 3.0. Whitehead Institute Technical Report. 3rd ed. Cambridge, Massachusetts: Whitehead Institute, 1992.
- [11] Kurata N, Miyoshi K, Nonomura K, et al. Rice mutants and genes related to organ development, morphogenesis and physiological traits. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46: 48-62.
- [12] 黄晓群, 赵海新, 董春林, 等. 水稻叶绿素合成缺陷突变体及其生物学研究进展. 西北植物学报, 2005, 25(8): 1685-1691.
- [13] Kusumi K, Mizutani A, Nishimura M, et al. 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.
- [14] Sugimoto H, Kusumi K, Tozawa Y, et al. 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(8): 985-996.
- [15] Hiroki S, Kensuke K, Ko N, et al. 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.
- [16] 董文其, 董彦君, 石守璠, 等. 两用核不育水稻 7436S 的温敏感白苗标志性状的遗传及其育性研究. 作物品种资源, 1995 (1): 19-21.
- [17] Dong Y J, Dong W Q, Shi S Y, et al. Identification and genetic analysis of a thermo-sensitive seedling-colour mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Sci*, 2001, 51: 1-4.
- [18] 舒庆尧, 刘贵付, 夏英武. 温敏水稻叶色突变体的研究. 核农学报, 1996, 10(1): 6-10.
- [19] Dong Y J, Shi S Y, Zhang H D, et al. Temperature response and inheritance of a thermo-sensitive seedling colour mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *J Genet & Breeding*, 1994, 48: 423-426.
- [20] 董彦君, 董文其, 张小明, 等. 突变体 Fan 5 苗色低温敏感性状的遗传分析. 中国水稻科学, 1995, 9(4): 249-250.
- [21] 崔海瑞, 夏英武, 高明尉. 温度对水稻突变体 W1 叶色及叶绿素生物合成的影响. 核农学报, 2001, 15(5): 269-273.
- [22] Xia J C, Wang Y P, Ma B T, et al. Ultrastructure and gene mapping of the albino mutant *all2* in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Genet Sin*, 2006, 33(12): 1112-1119.
- [23] Liu W Z, Fu Y P, Hu G C, et al. Identification and fine mapping of a thermo-sensitive chlorophyll deficient mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 2007, 226: 785-795.
- [24] 李 娜, 储黄伟, 文铁桥, 等. 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.