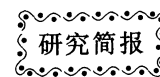


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.01050



一个新的水稻黄绿叶突变体的遗传分析与基因定位

李秀兰^{1,2} 孙小秋² 王平荣² 周 慧² 邓晓建^{2,3,*}

¹ 曲阜师范大学生命科学学院, 山东曲阜 273165; ² 四川农业大学水稻研究所, 四川成都 611130; ³ 四川农业大学西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 四川成都 611130

摘 要: 通过化学诱变获得一份稳定遗传的水稻黄绿叶突变体 D83。该突变体苗期植株呈黄绿色, 分蘖期开始逐渐转为淡绿色。与野生型相比, 突变体苗期叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量分别下降 45.03%、53.93% 和 39.56%, 成熟期每穗着粒数减少 9.45%, 千粒重下降 10.76%。对 D83 与正常绿色品种杂交 F₁、F₂ 代的遗传分析表明, D83 的突变性状由一对隐性核基因控制。以 D83/浙福 802 F₂ 代作定位群体, 应用分子标记将 D83 所携带的突变基因定位于水稻第 2 染色体短臂的 SSR 标记 RM110 附近, InDel 标记 Ch2-27 和 Ch2-32 之间, 该基因与这 2 个 InDel 标记的遗传距离分别为 1.2 cM 和 2.3 cM。认为 D83 所携带的突变基因是一个新的水稻黄绿叶突变基因, 暂命名为 *chl13(t)*。

关键词: 水稻; 黄绿叶突变体; 遗传分析; 基因定位

Genetic Analysis and Gene Mapping of a Novel Yellow-Green Leaf Mutant in Rice

LI Xiu-Lan^{1,2}, SUN Xiao-Qiu², WANG Ping-Rong², ZHOU Hui², and DENG Xiao-Jian^{2,3,*}

¹ College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China; ² Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; ³ Key Laboratory of Southwest Crop Genetic Resources and Improvement, Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: An inherited stably yellow-green leaf mutant D83 was isolated by chemistry mutagenesis. Its whole plant exhibited yellow-green trait at the seedling stage, and gradually changed into pea green from the tillering stage. Compared with its wild-type parent 10079, at the seedling stage, the contents of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoid decreased by 45.03%, 53.93%, and 39.56%, at the maturation period, the number of spikelets per panicle reduced by 9.45%, the 1000-grain weight decreased by 10.76%, respectively. Genetic analysis of F₁ and F₂ generations of D83 crossed with green rice varieties showed that the yellow-green leaf trait was controlled by one pair of recessive nuclear genes. Genetic mapping of the mutant gene was conducted by using molecular marker and F₂ mapping population of D83/Zhefu802. The results suggested that the mutant gene of D83 was mapped on the short arm of rice chromosome 2, nearby SSR marker RM110, between InDel markers Ch2-27 and Ch2-32. The genetic distances from the target gene to two InDel markers were 1.2 cM and 2.3 cM, respectively. The mutant gene of D83 was considered to be a new yellow-green leaf gene in rice and designated tentatively as *chl13(t)*.

Keywords: *Oryza sativa* L.; Yellow-green leaf mutant; Genetic analysis; Gene mapping

叶绿素缺乏突变在植物界较为常见, 突变基因往往直接或间接影响叶绿素的生物合成或降解, 叶绿素含量不同程度下降, 叶色出现黄化、白化、苍绿色、斑马纹、条纹等不同症状。已从玉米^[1]、豌豆^[2]、烟草^[3]、大豆^[4]、大麦^[5]、拟南芥^[6]和水稻^[7]等作物中获得了叶绿素缺乏突变体。近年来, 大量研究结果显示叶绿素缺乏突变体是植物光合作用机制、叶绿素生物合成途径、叶绿体的结构功能和遗传发育调控机理、作物标记性状等研究的理想材料^[8-9]。因此, 发掘和鉴定植物叶绿素缺乏突变基因, 开展

叶绿素缺乏突变基因的定位、克隆以及作用机理等方面的研究具有重要的理论意义和应用价值。

水稻的叶绿素缺乏突变一般受隐性核基因控制, 而由显性基因或细胞质基因控制的报道相对较少^[10-11]。水稻叶绿素缺乏突变类型丰富, 除第 12 染色体外, 在其他染色体上均发现了叶绿素缺乏突变基因(<http://www.gra-mene.org/newsletters/rice-genetics/rgn12/v12p93.html>)。目前, 利用分子标记定位了 10 多个水稻叶绿素缺乏突变基因, 其中 6 个已被克隆, 它们参与叶绿素的生物合成^[7,12-14]。

本研究由国家自然科学基金项目(30770145, 30771314)和曲阜师范大学科研基金项目(XJ0706)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 邓晓建, E-mail: xjdeng2006@yahoo.com.cn

第一作者联系方式: 李秀兰, E-mail: lxljewel@163.com

Received(收稿日期): 2010-01-06; Accepted(接受日期): 2010-03-01.

我们通过 EMS 诱变获得一份黄绿叶突变体 D83, 该突变体表现叶绿素缺乏特征, 本文对其形态生理特征、主要农艺性状等进行了观察和分析, 并利用分子标记对其突变基因进行定位, 以期为该基因的克隆及作用机理的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料和田间试验

10079 是来自粳稻品种日本晴(Nipponbare)的一个迟熟突变品系, 由中科院遗传与发育生物学研究所储成才研究员和方军博士提供。用化学诱变剂 EMS 处理 10079 获得一份黄绿叶突变体, 经多代自交, 其黄绿叶性状已稳定遗传, 暂定名为“D83”。将 D83 分别与正常绿色的野生型亲本 10079 及籼稻品种浙福 802、9311 等杂交, 在四川成都分别播种亲本、F₁ 及 F₂ 代, 从苗期开始观察叶色表现, 成熟期调查主要农艺性状。

1.2 光合色素含量的测定

参照 Arnon 等^[15]的方法测定光合色素含量。苗期取 D83 突变株及其野生型亲本 10079 相同部位的叶片, 称取 2 g, 剪成 2~3 mm 细丝, 在 4℃、避光条件下用 80%丙酮浸提 48 h, 然后用日立 UV-1700 型分光光度计进行叶绿素、类胡萝卜素含量的测定。

1.3 定位群体的构建和总 DNA 的提取

根据叶色调查与分析结果, 从 D83/浙福 802 的 F₂ 代

中选取 30 株显性正常绿苗和 158 株黄化苗构成定位群体, 分单株取叶片提取总 DNA。在此基础上随机选取正常绿苗和黄化苗各 10 株, 每单株取等量叶片, 将正常绿苗和黄化苗单株叶片分别混合, 提取总 DNA 作为绿苗和黄化苗近等基因池。参照 McCouch 等^[16]的方法提取总 DNA。

1.4 分子标记分析和遗传图谱的构建

根据 McCouch 等^[17]构建的 SSR 连锁图(<http://www.gramene.org/microsat/>)获得简单序列重复(SSR)标记, 运用 Primer5.0 软件自行设计插入缺失(InDel)标记。由上海英骏生物技术有限公司合成 SSR 和 InDel 引物。参照 Panaud 等^[18]的 PCR 反应体系, 扩增产物经 3.0%~3.5%琼脂糖凝胶电泳及溴化乙锭染色后在紫外灯下观察拍照。根据定位群体叶色和标记的分离数据, 用 MAPMAKER3.0 软件进行遗传作图, 用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传距离(cM)。

2 结果与分析

2.1 突变体的形态特征及主要农艺性状表现

D83 突变体植株苗期为黄绿色, 可明显区别于其野生型, 从分蘖期开始逐渐转为淡绿色, 但仍可与其野生型明显区分(图 1)。与其野生型相比, 成熟期 D83 的株高降低 6.47%, 每穗着粒数减少 9.45%, 千粒重下降 10.76%, 穗长、有效穗数、结实率等农艺性状差异不显著(表 1)。

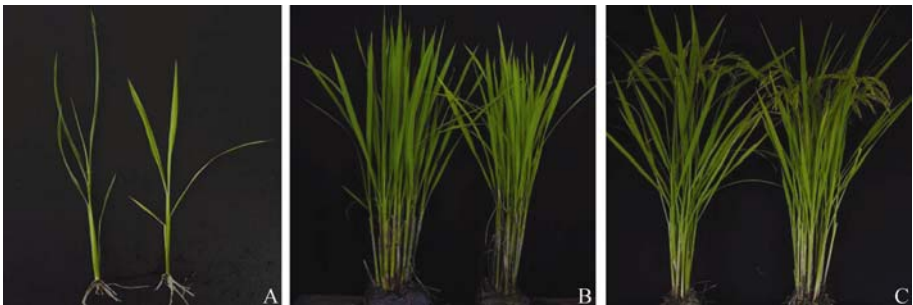


图 1 突变体 D83(右)与其野生型亲本 10079(左)在苗期(A)、拔节期(B)及抽穗期(C)的植株形态
Fig. 1 Plant phenotype of mutant D83 (right) and its wild-type parent 10079 (left) at the seedling (A), elongation (B), and heading (C) stages

表 1 突变体 D83 与其野生型亲本 10079 主要农艺性状的比较
Table 1 Comparison of primary agronomic traits between mutant D83 and its wild-type parent 10079

性状 Trait	10079 (CK)	D83	比对照增减 Compared with CK (%)
抽穗期 Days to heading (d)	125.1±2.62	127.2±2.50	1.68
株高 Plant height (cm)	106.6±2.31	99.7±3.48	-6.47*
穗长 Panicle length (cm)	19.9±1.17	18.9±0.57	-5.03
单株有效穗数 No. of productive panicles per plant	10.8±2.81	10.2±1.87	-5.56
每穗着粒数 No. of spikelets per panicle	95.2±2.06	86.2±3.10	-9.45*
结实率 Seed setting rate (%)	91.7±1.49	88.6±2.09	-3.38
千粒重 1000-grain weight (g)	25.1±1.77	22.4±2.31	-10.76*

* 在 P = 0.05 水平上差异显著。

* significantly different at P = 0.05.

2.2 突变体的光合色素

D83 突变体在苗期时黄绿叶特征十分明显, 表 2 表明, 苗期 D83 叶绿素 a、叶绿素 b 及类胡萝卜素含量分别为 1.77 mg g⁻¹、0.41 mg g⁻¹ 和 0.55 mg g⁻¹, 较对照 10079 分别下降 45.03%、53.93%和 39.56%, 差异极显著(P<0.01), 表明 D83 的突变性状主要是由叶绿素含量下降引起的。同时, D83 叶绿素 a/b 值较 10079 提高了 0.66, 说明 D83 突变体叶绿素 b 的降幅大于叶绿素 a, 叶绿素 b 可能在突变体的叶片黄化性状表现中起更重要的作用。

2.3 突变性状的遗传分析

D83 分别与正常绿色的野生型亲本 10079 及籼稻品种浙福 802、9311 杂交 F₁ 代的叶色均表现为正常绿色, F₂ 代植株可区分为叶色差异明显的正常绿苗和黄化苗两组, 经卡方(χ²)测验, 其分离比例均符合 3:1 (表 3), 表明 D83

表 2 苗期 D83 与其野生型亲本 10079 叶片光合色素含量的比较
Table 2 Comparison of photosynthetic pigment contents between mutant D83 and its wild-type parent 10079 at the seedling stage

光合色素 Pigment	叶绿素 Chl (mg g ⁻¹)	叶绿素 a Chl a (mg g ⁻¹)	叶绿素 b Chl b (mg g ⁻¹)	叶绿素 a/b Chl a/b	类胡萝卜素 Caro (mg g ⁻¹)
10079 (CK)	4.11±1.30	3.22±0.72	0.89±0.58	3.63±0.94	0.91±1.02
D83	2.18±1.04	1.77±0.42	0.41±0.60	4.29±0.82	0.55±0.76
比对照增减 Compared with CK	-46.96%**	-45.03%**	-53.93%**	0.66%**	-39.56%**

**在 $P = 0.01$ 水平上差异显著。 ** significantly different at $P = 0.01$.

表 3 突变体 D83 与正常绿色品种杂交 F₂ 代的叶色分离
Table 3 Segregation of leaf color in F₂ population of the crosses between D83 and green rice varieties

F ₂ 组合 F ₂ combination	总株数 Total No. of plants	绿苗株数 No. of green plants	黄化苗株数 No. of etiolation plants	理论比 Expect ratio	χ^2	P
D83/10079	560	426	134	3:1	0.24	0.50–0.75
D83/浙福 802 D83/ Zhefu 802	690	532	158	3:1	1.63	0.10–0.25
D83/9311	544	426	118	3:1	3.18	0.05–0.10

的突变性状由 1 对隐性核基因控制。

2.4 突变基因的分子标记定位

以 D83/浙福 802 的 F₂ 群体作为定位群体, 用 240 对较均匀分布于水稻 12 条染色体上的微卫星引物扩增亲本浙福 802 和 D83 的 DNA, 然后在两亲本间表现出多态的引物扩增绿苗和黄化苗近等基因池, 再用在池中检测到多态的引物扩增 F₂ 群体, 结果发现位于水稻第 2 染色体上的微卫星标记 RM110、RM423 与 D83 所携带的突变基因有连锁关系。为了进一步定位目标位点, 新开发了 3 个具有

亲本多态性的插入/缺失(InDel)标记 Ch2-27、Ch2-32 和 Ch2-41 (表 4)。用这 3 个 InDel 标记对 F₂ 定位群体进行扩增, 结果表明它们也与 D83 所携带的突变基因连锁(图 2)。

根据 F₂ 定位群体的叶色和微卫星标记的分离数据构建局部分子连锁图(图 3), 可知 D83 所携带的突变基因位于水稻第 2 染色体短臂 RM110、Ch2-27 和 Ch2-32、Ch2-41、RM423 之间, 与它们的遗传距离分别为 9.0、1.2、2.3、11.9 和 12.8 cM。因该基因可能是一个新的水稻黄绿叶突变基因, 暂命名为 *chl13(t)*。

表 4 本研究开发的多态性 InDel 标记
Table 4 Polymorphic InDel markers developed in this study

标记 Marker	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')	所在 BAC Originated BAC
Ch2-27	CCTTGAGGTAAAGCATC	GGGACGGAGGGAGTAGTT	AP005412
Ch2-32	CCAGCAAGCAAGCAACC	GCTGATGAACGCCGTGAAG	AP004843
Ch2-41	TTAGGGAGTTAGGGTGCG	TGAACATGGAGCCGTGT	AP003992

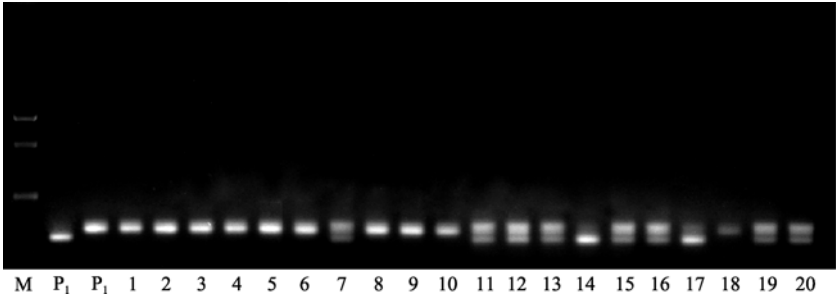


图 2 InDel 标记 Ch2-32 在 D83/浙福 802 F₂ 群体中的分离
Fig. 2 Segregation of InDel marker Ch2-32 in the F₂ population of D83/Zhefu 802
M: DL-2000 marker; P₁: 浙福 802; P₂: D83; 1~10: F₂ 黄化植株; 11~20: F₂ 绿色植株。
P₁: Zhefu802; P₂: D83; 1–10: yellow-green plants in F₂; 11–20: green plants in F₂.

3 讨论

迄今, 国内外报道了位于水稻第 1~11 染色体上的 80 多个叶绿素缺乏突变基因(<http://www.gramene.org/news-letters/rice-genetics/rgn12/v12p93.html>)。目前, 在水稻第 2

染色体定位了 3 个叶绿素缺乏突变基因(http://www.gramene.org/rice_mutant), 即 *z11*、*z12* 和 *chl10*, 其中 *z11* 和 *z12* 为水稻“斑马叶”的控制基因, 突变体性状主要表现为叶片及叶鞘部位出现有规律的褪绿横带, 整个叶片呈现淡绿、绿相间条段; *chl10* 为控制水稻黄化的叶绿素缺乏突

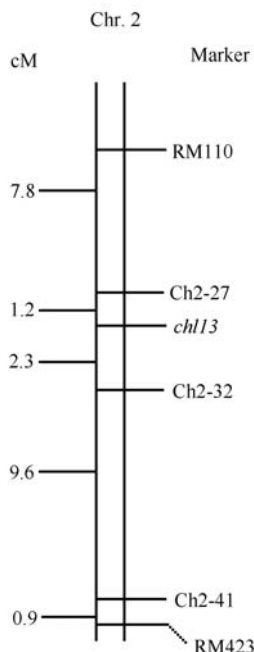


图 3 黄绿叶基因 *chl13(t)* 在水稻第 2 染色体短臂上的分子连锁图
Fig. 3 Linkage map of a yellow-green leaf gene, *chl13(t)*, on the short arm of rice chromosome 2

变基因, 位于第 2 染色体长臂 142 cM 处, 突变体全生育期叶片呈黄色。我们获得的 D83 突变体植株苗期为黄绿色, 从分蘖期开始逐渐转为淡绿色, 并伴有株高变矮、每穗着粒数减少、千粒重下降等特征, 且分子标记分析表明 D83 所携带的突变基因位于水稻第 2 染色体短臂的 SSR 标记 RM110 附近, InDel 标记 Ch2-27 和 Ch2-32 之间。因此, 认为 D83 所携带的突变基因是一个新的水稻黄绿叶突变基因, 暂命名为 *chl13(t)*。

在水稻叶绿素缺乏突变体中, 叶绿素 b 显著减少突变最为常见, 已通过自然突变或诱变途径获得大量水稻叶绿素 b 减少突变体^[19-21]。Terao 等^[19]按照叶绿素 a/b 值将水稻叶绿素缺乏突变体划分为 3 类, 即不含叶绿素 b 或叶绿素 a/b 值接近或超过 20 的突变体、叶绿素 a/b 值介于 10.0~15.6 的突变体及叶绿素 a/b 值介于 6~10 的突变体。本研究中 D83 突变体叶绿素 a/b 值为 4.29, 与 Hsu 等^[20]、龚红兵等^[21]发现的水稻叶绿素 b 减少突变体的叶绿素 a/b 值 4.9、4.5 较接近, 可能属于同一类突变体。

叶色标记的应用可作为提高杂交水稻特别是两系杂交水稻的种子纯度的途径之一, 防范可能给大田生产造成的损失, 因而愈来愈受关注。舒庆尧等^[24]认为, 作为叶色标记必须具备以下 4 个条件: (1) 标记性状明显, 幼苗易鉴别; (2) 标记性状稳定, 不易受环境因素影响; (3) 标记性状对杂交种或不育系的产量无显著负效应; (4) 标记性状受隐性核基因控制。在迄今发现的水稻叶绿素缺乏突变体中, 绝大多数由于农艺性状欠佳而不能应用于生产, 通过导入叶色标记仅育成 3 个水稻不育系, 即 M2S^[9]、全龙 A^[22]和中紫 S^[23]。本研究中 D83 的突变性状由 1 对隐

性核基因控制, 幼苗为黄绿色, 易与正常绿苗区分, 且不受环境影响, 同时, 与其野生型相比, 抽穗期、穗长、有效穗、结实率等主要农艺性状差别不显著, 株高、每穗着粒数、千粒重等农艺性状虽差异显著 ($0.01 < P < 0.05$), 但绝对数值只下降 6.47%~10.76% (表 1)。因此, 认为 D83 所携带的 *chl13(t)* 突变基因在提高杂交水稻种子纯度上具有较好的应用前景。

References

- [1] Lonosky P M, Zhang X S, Honavar V G. A proteomic analysis of maize chloroplast biogenesis. *Plant Physiol*, 2004, 134: 560–574
- [2] Highkin H, Boardman N K, Goodchild D J. Photosynthetic studies on a pea mutant deficient in chlorophyll. *Plant Physiol*, 1969, 44: 1310–1320
- [3] Okabe K, Schmed G H, Straub J. Genetic characterization and high efficiency photosynthesis of an aurea mutant of tobacco. *Plant Physiol*, 1977, 60: 150–156
- [4] Eric J S, Linda L W. A chlorophyll a/b-binding protein gene from soybean. *Plant Physiol*, 1994, 104: 1475–1476
- [5] Preiss S, Thornber J P. Stability of the apoproteins of light-harvesting complex I and II during biogenesis of thylakoids in the chlorophyll b-less barley mutant *chlorian f2*. *Plant Physiol*, 1995, 107: 709–717
- [6] Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G, Kuntz M. Mutations in the arabidopsis gene IMMUTANTS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell*, 1999, 11: 57–68
- [7] Jung K H, Hur J, Ryu C H, Choi Y, Chung Y Y, Miyao A, Hirochika H, An G. Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the T-DNA gene-trap system. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 463–472
- [8] Larkin R M, Alonso J M, Ecker J R, Chory J. GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science*, 2003, 299: 902–906
- [9] Dong F-G(董凤高), Zhu X-D(朱旭东), Xiong Z-M(熊阵民), Cheng S-H(程式华), Sun Z-X(孙宗修), Min S-K(闵绍楷). Breeding of a photo-thermoperiod sensitive genic male sterile *indica* rice with a pale-green-leaf marker. *Chin Rice Sci* (中国水稻科学), 1995, 9(2): 65–70 (in Chinese with English abstract)
- [10] Li X-Y(李贤勇), Wang C-T(王楚桃), Li S-W(李顺武), He Y-X(何永歆), Chen S-Q(陈世全). The discovery of a high chlorophyll content gene in rice. *Southwest Chin J Agric Sci* (西南农业学报), 2002, 15(4): 122 (in Chinese with English abstract)
- [11] Qian Q(钱前), Zhu X-D(朱旭东), Zeng D-L(曾大力), Zhang X-H(张小惠), Yan X-Q(严学强), Xiong Z-M(熊振民). The study of a novel white-green material controlled by cytoplasmic gene. *Chin Seed* (作物品种资源), 1996, (4): 11–12 (in Chinese)

- [12] Zhang H T, Li J J, Yoo J H, Yoo S C, Cho S H, Koh H J, Seo H S, Paek N C. Rice *Chlorina-1* and *Chlorina-9* encode ChlD and ChlI subunits of Mg-chelatase, a key enzyme for chlorophyll synthesis and chloroplast development. *Plant Mol Biol*, 2006, 62: 325–337
- [13] Wu Z M, Zhang X, He B, Diao L P, Sheng S L, Wang J L, Guo X P, Su N, Wang L F, Jiang L, Wang C M, Zhai H Q, Wan J M. A chlorophyll-deficient rice mutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiol*, 2007, 145: 29–40
- [14] Lee S, Kim J H, Yoo E S, Lee C H, Hirochika H, An G. Differential regulation of chlorophyll a oxygenase genes in rice. *Plant Mol Biol*, 2005, 57: 805–818
- [15] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1–15
- [16] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H. Molecular mapping of rice chromosome. *Theor Appl Genet*, 1998, 76: 815–829
- [17] McCouch S R, Teytelman L, Xu Y B, Lobos K B, Clare K, Walton M, Fu B Y, Maghirang R, Stein L. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res*, 2002, 9: 257–279
- [18] Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice. *Mol Gen Genet*, 1996, 252: 597–607
- [19] Terao T, Yamashita A, Katoh S. Chlorophyll b-deficient mutants of rice I. absorption and fluorescence spectra and chlorophyll a/b ratios. *Plant Cell Physiol*, 1985, 26: 1361–1367
- [20] Hsu B D, Lee Y L. The photosystem II heterogeneity of chlorophyll b-deficient mutants of rice: a fluorescence induction study. *Aust J Plant Physiol*, 1995, 22: 195–200
- [21] Gong H-B(龚红兵), Chen L-M(陈黎明), Diao L-P(刁立平), Sheng S-L(盛生兰), Lin T-Z(林添资), Yang T-N(杨图南), Zhang R-X(张荣铎), Cao S-Q(曹树青), Zhai H-Q(翟虎渠), Dai X-B(戴新宾), Lu W(陆巍), Xu X-M(许晓明). Genetic analysis of chlorophyll-b less mutant in rice and its related characteristics. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2001, 34(6): 686–689 (in Chinese with English abstract)
- [22] Shu Q-Y(舒庆尧), Chen S-F(陈善福), Wu D-X(吴殿星), Shen S-Q(沈圣泉), Cui H-R(崔海瑞), Xia Y-W(夏英武). Studies on breeding of a new type of cytoplasmic male sterile rice line Quanlong A. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2001, 34(4): 349–354 (in Chinese with English abstract)
- [23] Cao L-Y(曹立勇), Qian Q(钱前), Zhu X-D(朱旭东), Zeng D-L(曾大力), Min S-K(闵绍楷), Xiong Z-M(熊振民). Breeding of a photo-thermo sensitive genic male sterile indica rice Zhongzi S with a purple-leaf marker and the heterosis of its hybrid rice produced with it. *Acta Agron Sin* (作物学报), 1999, 25(1): 44–49 (in Chinese with English abstract)