

水稻条纹窄叶突变体 *nsll* 的形态和生理分析及基因定位

赵芳明, 张永, 吴燕茹, 王通明, 马玲, 杨正林, 魏霞, 桑贤春, 凌英华, 王楠, 张长伟, 何光华*

西南大学水稻研究所转基因植物与安全控制重庆市市级重点实验室, 重庆 400716

* 联系人, E-mail: hegh@swu.edu.cn

2013-09-20 收稿, 2013-11-29 接受, 2014-04-15 网络版发表

重庆市科技重大攻关项目(CSTC2012ggC80002)资助

摘要 水稻(*Oryza sativa* L.)叶形和叶色直接影响光能利用, 最终影响其产量和品质, 是水稻重要的农艺性状. 通过甲基磺酸乙酯诱变籼稻缙恢 10号发现了1个遗传稳定的水稻条纹窄叶突变体, 暂命名为 *nsll*. *nsll* 在苗期叶片呈浅白色, 拔节期后出现平行于叶脉分布的白色条纹, 而且其叶片显著窄于野生型缙恢 10号. *nsll* 突变体的白色条纹部位细胞内部叶绿体严重解体, 叶绿素含量显著下降. 荧光参数 F_0 , F_v/F_m , Φ_{PSII} , qP 和 ETR 均显著低于野生型, 光合效率显著降低. *nsll* 的叶形叶色及生理的变化最终引起 *nsll* 突变体株型矮小和产量相关性状的明显减小. 该条纹窄叶性状受一对单隐性核基因控制, 被定位于第3染色体长臂 InDel 16 与 InDel 12 之间, 物理距离为 204 kb, 在该区域尚未发现与已报道的叶色或窄叶相类似的基因. 本研究为 *NSLI* 基因克隆和功能分析奠定了良好基础.

关键词

水稻
条纹
窄叶
基因定位

水稻(*Oryza sativa* L.)叶片是进行光合作用的主要器官, 其形状和颜色直接影响水稻的光合效率, 进而影响水稻的产量和品质. 对叶形的研究已受到育种家和遗传学家的共同关注. 窄叶作为叶形的一种, 直接影响光合产量, 鉴定窄叶突变体对研究叶片发育及适应育种需要都具有重要意义. 然而, 目前水稻窄叶突变研究较少, 分子定位的水稻窄叶基因仅有4个, 分别为 *NAL1*(*Narrow leaf 1*)^[1], *NAL3*^[2], *NAL7*^[3]和 *NUL1* (*narrow and upper-albino leaf 1*)^[4], 位于第4, 12, 7 和 3 染色体. 其中 *NAL1* 和 *NAL7* 已被克隆和进行了功能鉴定, 其编码基因都与生长素合成及运输有关, 使叶片中-边轴发育障碍, 导致叶片变细. *NAL2*, *NAL4*, *NAL5* 和 *NAL6* 只进行了经典遗传分析 (<http://www.gramene.org/>). 然而, 叶形发育机理相当复杂, 鉴定新的窄叶基因对解析窄叶发育具有重要意义.

同时, 叶色突变也已引起足够重视, 不仅已成为研究植物光合作用机制的特殊材料, 而且在高光效育种和标记性状的利用上也具有重要的应用价值. 条斑叶是叶色变异的一种, 目前分子定位的条斑突变体仅报道了6个, 分别为第1染色体的 *wp(t)*^[5]、第3染色体的 *virescent-1(v1)*^[6]和 *virescent-2(v2)*^[7,8]、第4染色体的 *Oswm*^[9]以及第6染色体的 *st(t)*^[10]. 但仅 *virescent-1(v1)*和 *virescent-2(v2)*被克隆和功能鉴定^[6-8]. *V1* 基因调控前质体向功能叶绿体的转化^[6], *V2* 则在叶绿体发育早期通过干扰叶绿体翻译机制抑制叶绿体的分化^[7]. 因而发掘和鉴定新的条斑叶基因对揭示条斑叶的形成机制有重要意义.

通过甲基磺酸乙酯(ethylmethane sulfonate, EMS)诱变籼稻恢复系缙恢 10号, 获得了1个遗传稳定的叶片呈白色条纹和显著变窄的新水稻叶色叶形双重突变体, 暂命名为 *nsll*(*narrow and stripe leaf 1*). 本研

引用格式: 赵芳明, 张永, 吴燕茹, 等. 水稻条纹窄叶突变体 *nsll* 的形态和生理分析及基因定位. 科学通报, 2014, 59: 1508-1515

英文版见: Zhao F M, Zhang Y, Wu Y R, et al. Morphological and physiological analysis of narrow and striped leaf 1 (*nsll*) mutant of rice (*Oryza Sativa* L.) and the gene mapping. Chin Sci Bull, 2014, 59: 840-848, doi: 10.1007/s11434-013-0064-x

究将对该突变体进行详细报道,为更好地了解水稻叶片的叶形和叶色发育分子机制奠定基础。

1 材料与方 法

(i) 实验材料. 水稻条纹窄叶突变体 *nsll* 由西南大学水稻研究所经 EMS 化学诱变籼稻恢复系缙恢 10 号种子获得,通过连续多代培育,条纹窄叶突变性状稳定遗传.用于形态分析和细胞学分析的对照亲本为缙恢 10 号.用于构建遗传分析和基因定位群体的另一亲本为日本晴。

(ii) 突变体表型与农艺性状调查. 在苗期、分蘖期和抽穗期选取 *nsll* 突变体和野生型缙恢 10 号的中间行各 10 株,对其叶长和叶宽进行测量,叶片宽度取叶片长度 1/2 处测量。

在抽穗期分别取缙恢 10 号和 *nsll* 突变体的剑叶、倒二叶和倒三叶各 5 片,用福尔马林-醋酸-酒精 (formalin-acetic acid-alcohol, FAA) 固定液 (70% 无水乙醇 90 mL, 40% 甲醛 5 mL, 冰醋酸 5 mL) 固定,抽真空,无水乙醇脱水,石蜡包埋,切成 8~10 μm 厚度的薄片,番红固绿对染制作石蜡切片,并在 NIKON SMZ1500 体视显微镜 (日本) 下统计大、小维管束数, *t* 测验统计分析。

成熟后对野生型和突变体各 10 株进行株高、有效穗、每穗总粒数、千粒重、结实率等测定,并作 *t* 测验统计分析。

(iii) 叶绿素和类胡萝卜素含量测定. 在苗期、分蘖期、抽穗期和灌浆期分别测定野生型缙恢 10 号和 *nsll* 叶片的叶绿素和类胡萝卜素含量,野生型和突变体各取 5 株测定,采样部位为剑叶中部.具体参照 Lichtenthaler^[11] 的方法进行。

(iv) 叶片叶绿体荧光动力学参数和净光合速率测定. 利用 LI-6400 便携式荧光仪 (LI-COR, 美国) 测定叶片净光合速率和叶绿体荧光动力学参数. 在 8:30~10:00, 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别测定 *nsll* 和缙恢 10 号的叶片. 测定前暗处理 30 min, 测定重复 3 次, 最后取平均值统计分析。

(v) 叶绿体透射电子显微镜观察. 参照何瑞锋等人^[12] 的方法在抽穗期用电子显微镜观察 *nsll* 和野生型叶片细胞结构. 戊二醛和锇酸双重固定后,利用不同梯度的乙醇逐级脱水,然后进行置换和包埋,超薄切片后,以醋酸双氧铀和柠檬酸铅液双重染色, H600 型透射电子显微镜 (HITACHI, 日本) 观察并照相。

(vi) 定位群体构建. 2010 年夏季在重庆以粳稻日本晴为母本、*nsll* 为父本在西南大学水稻研究所实验基地配置杂交组合,2010 年秋季于海南种植 F_1 , 分单株收获 F_1 代种子. 2011 年春季在重庆种植 F_2 群体,并对 F_2 群体中各单株叶片表型进行观察,并选取条纹窄叶单株作为定位群体。

(vii) 水稻 DNA 的提取. 水稻正常株和突变体的基因池 DNA 采用十六烷基三甲基溴化铵 (cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB) 法提取,参照 McCouch 等人^[13] 方法稍加改进. 用于连锁分析和基因定位的 F_2 分离群体 DNA 采用简易碱煮法提取^[14]。

(viii) SSR 扩增. 简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR) 引物序列参照 <http://www.gramene.org/microsat>. PCR 反应总体积 12.5 μL , 包括 1.25 μL 的 10 \times PCR 缓冲液, 0.75 μL 的 25 mmol L^{-1} MgCl_2 , 0.5 μL 的 2.5 mmol L^{-1} dNTPs, 8.0 μL 的双蒸水 (ddH₂O), 1.0 μL 的 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 引物, 1.0 μL 的模板 DNA 和 0.1 μL 的 5 U μL^{-1} Taq DNA 聚合酶. PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min. 对 PCR 产物经 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和快速银染后进行观察^[15]。

(ix) 遗传图谱的构建. 参照 Luo 等人^[14] 方法进行。

2 结果与分析

2.1 条纹窄叶突变体 *nsll* 的形态分析

与野生型缙恢 10 号相比, *nsll* 突变体的叶片呈现平行于叶脉分布的白色条纹 (图 1(a), (b)), 同时, 全生育期叶片显著变窄, 在苗期、分蘖期和抽穗期分别只占野生型的 72%, 68% 和 77%; 叶片长度分别占野生型的 68%, 82% 和 76% (表 1). 通过细胞学分析, *nsll* 突变体叶片大维管束数与野生型没有显著差异, 但小维管束总数以及相邻大维管束间的小维管束数显著减少, 仅为对照的 61.5% 和 60.9% (表 1). 从图 1 中可明显看出, 在该叶片的侧脉中, 2 个大维管束之间, 野生型分布有 6 个小维管束, 而在 *nsll* 中, 仅有 3 个 (图 1(c), (d)). 可见, 小维管束数目的减少与叶片变窄有直接关系. 然而究竟是由于小维管束数目的减少导致 *nsll* 突变体叶片变窄, 还是由于叶片的某些发育受阻导致叶片变窄进而引起小维管束数目减少, 有待进一步研究。

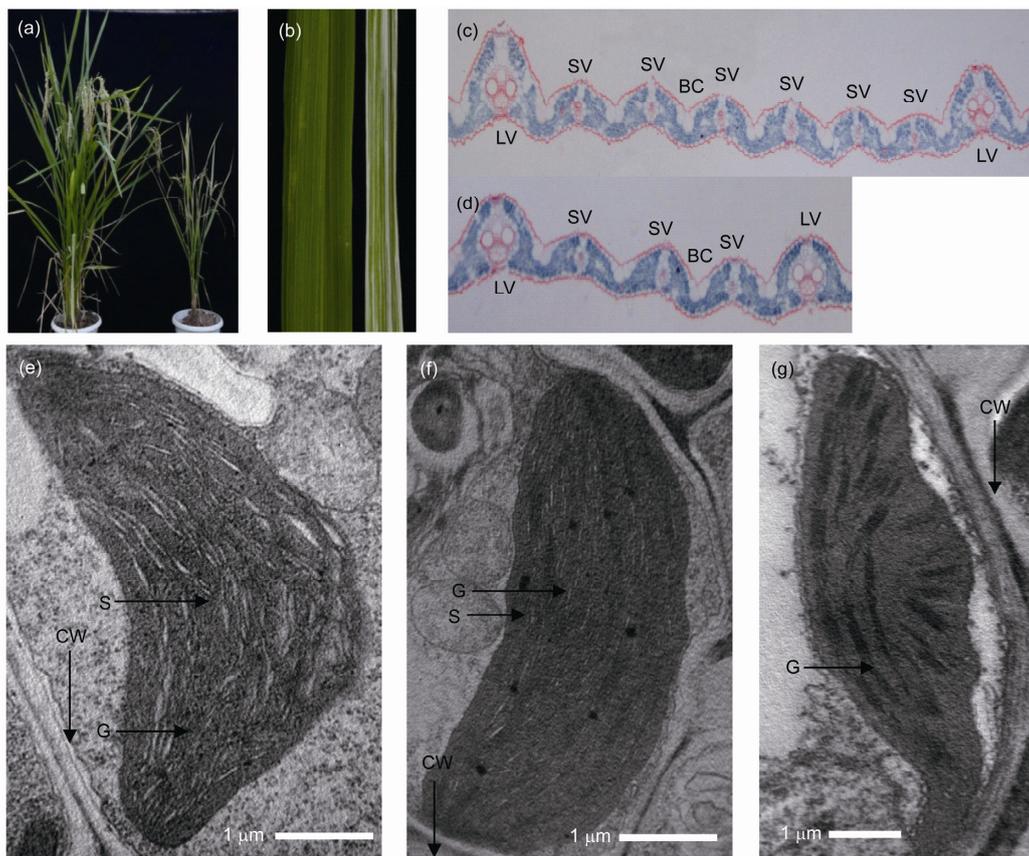


图1 *nsII* 突变体和野生型的株叶形态、叶片石蜡切片及叶绿体超微结构

(a) *nsII* 突变体和野生型的灌浆期株型; (b) *nsII* 和野生型的灌浆期剑叶; (c) 野生型的剑叶 2 个大维管束间石蜡切片; (d) *nsII* 的剑叶 2 个大维管束间石蜡切片; (e) 野生型的叶片叶绿体超微结构; (f) *nsII* 的叶片绿色部位叶绿体超微结构; (g) *nsII* 的叶片白色条纹部位叶绿体超微结构。LV 为大维管束; SV 为小维管束; BC 为泡状细胞; CW 为细胞壁; S 为淀粉粒; G 为基粒片层

表 1 *nsII* 突变体与野生型的叶片形态分析^{a)}

性状	<i>nsII</i> 突变体	野生型
苗期叶长(cm)	6.24±0.42**	9.13±0.63
苗期叶宽(cm)	0.45±0.02**	0.62±0.04
分蘖期叶长(cm)	25.8±1.24**	31.29±1.53
分蘖期叶宽(cm)	0.93±0.05**	1.35±0.11
抽穗期叶长(cm)	36.2±1.82**	47.37±1.52
抽穗期叶宽(cm)	1.65±0.11**	2.14±0.15
叶片大维管束数	8.43±0.62	8.67±0.53
叶片小维管束数	28.42±1.33**	46.21±1.52
相邻大维管束间小维管束数	3.62±0.41**	5.94±0.56

a) **表示在 0.01 水平上差异显著

nsII 突变体的叶片变窄和条纹化后, 对农艺性状也产生了较大影响。(i) 株高显著矮化(图 1(a)), 仅为野生型株高的 76%(表 2)。其倒一节、倒二节、倒三节长度及主穗长均显著小于野生型, 分别只占野生型的 66%,

56%, 74%和 71%(表 2)。说明 *nsII* 矮化是各节间和穗长减小的共同结果;(ii) 有效穗数、结实率、每穗总粒数、每穗实粒数及千粒重等产量相关性状均显著减小(表 2)。

2.2 水稻 *nsII* 突变体叶绿体超微结构观察

通过对叶片的透射电子显微镜观察, 野生型和 *nsII* 的绿色部位在细胞结构上没有明显差异, 叶绿体发育正常, 叶绿体内部基质片层垛叠规则, 淀粉粒数量和嗜饿小体相对较多, 而且分布比较均匀(图 1(e), (f))。 *nsII* 的白化部位细胞结构异常, 细胞内部结构严重解体, 叶绿体内部大部分基质片层已成线状, 不均匀分布在叶绿体内, 淀粉粒和嗜饿小体明显减少(图 1(g)), 表明该区域叶绿体结构已经严重退化。

2.3 水稻 *nsII* 叶绿素和类胡萝卜素含量

在苗期、分蘖期、抽穗期和灌浆期对野生型和

表 2 *nsll* 突变体与野生型的重要农艺性状比较^{a)}

性状	<i>nsll</i> 突变体	野生型
株高(cm)	90.32±1.46**	118.17±1.62
倒一节长(cm)	28.16±1.23**	42.15±1.52
倒一节宽(cm)	0.23±0.02**	0.52±0.03
倒二节长(cm)	14.43±1.12**	25.41±1.24
倒二节宽(cm)	0.16±0.01**	0.34±0.02
倒三节长(cm)	10.45±0.98**	14.03±1.11
倒三节宽(cm)	0.10±0.01**	0.23±0.02
主穗长(cm)	19.17±1.56**	26.64±1.79
有效穗数	6.73±0.46**	12.62±0.61
每穗粒数	83.20±6.57**	135.21±9.46
每穗实粒数	53.62±7.61**	120.87±9.65
千粒重(g)	24.08±0.24**	26.53±0.27
结实率(%)	64.42±0.52**	89.34±0.74

a) **表示在 0.01 水平上差异显著

nsll 的叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素含量及类胡萝卜素含量进行测定, 结果表明, 各时期 *nsll* 的叶绿素含量(叶绿素 a、叶绿素 b 和叶绿素总含量)及类胡萝卜素含量均极显著低于野生型对照(图 2). 表明 *nsll* 比野生型缺乏较多的光合作用物质基础, 暗示了 *nsll* 的光合一定程度上受阻, 尤其对光能的吸收和转化.

此外, 不论是野生型还是突变体, 各色素含量在不同发育阶段不同, 均呈现苗期较少, 分蘖期、抽穗期、开花灌浆期逐渐增强的规律(图 2). 这一变化反映了随着生育进程的推移, 水稻光合效率不断增强, 以满足穗和花的分化及籽粒灌浆充实等需求, 为能量的最终贮存奠定基础.

2.4 水稻 *nsll* 叶片叶绿体荧光动力学参数和光合特性分析

与野生型相比, 水稻 *nsll* 的最小荧光(F_0)、PS II 原初光化学效率(F_v/F_m)、PS II 光量子效率(Φ_{PSII})、光化学淬灭系数(photochemical quenching, qP)和光合电子传递(electron transport, ETR)效率极显著下降(表 3), 表明 *nsll* 相比于野生型有较低的原初光能转换率, 不利于光能的转换和为暗反应光合碳同化提供更多的能量, 同时 PS II 电子传递活性下降, 阻碍了正常光能吸收、电子传递及光能转化的顺利进行.

表 4 结果进一步显示, *nsll* 净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、蒸腾速率(T_r)均显著低于野生型, 而胞间 CO_2 浓度(C_i)却显著高于野生型, 表明 *nsll* 突变体光合作用、蒸腾作用等生理特征显著下降. 这些结果暗示了 *nsll* 的植株矮小, 有效穗数、穗粒数、千粒重等重要农艺性状显著下降正是由于这一系列生理特征

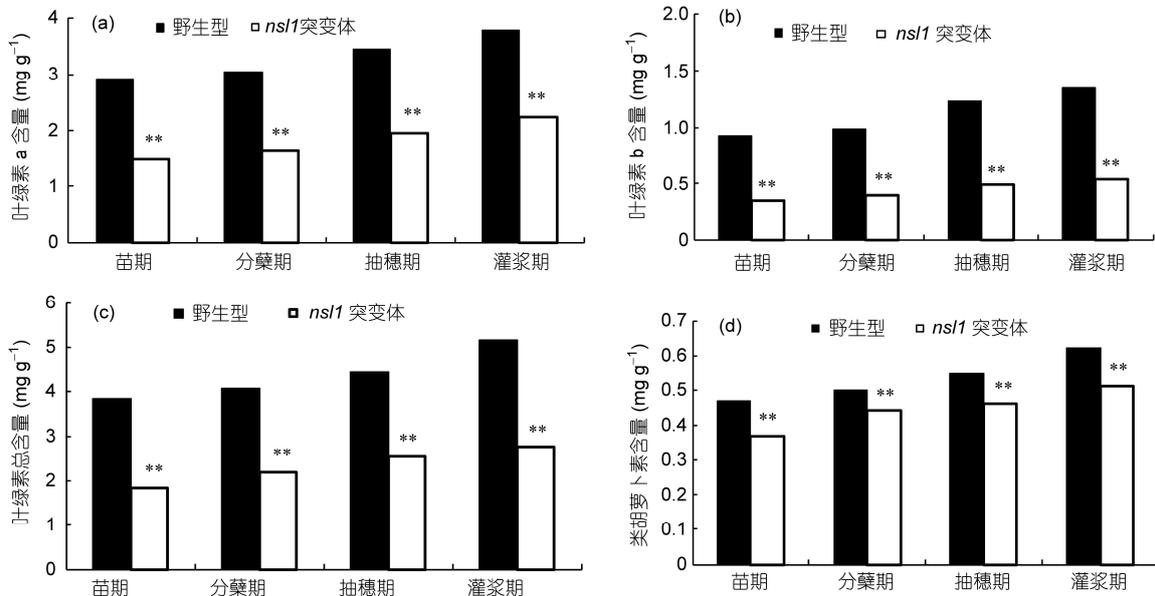


图 2 不同时期野生型和 *nsll* 突变体的叶绿素和类胡萝卜素含量

**表示在 0.01 水平上差异显著

表3 *nsII* 突变体的叶绿素荧光参数^{a)}

材料	F_0	F_v/F_m	Φ_{PSII}	qP	ETR
野生型	94.35±3.58	0.79±0.03	0.47±0.03	0.84±0.03	94.38±4.12
<i>nsII</i> 突变体	62.31±2.57**	0.54±0.02**	0.31±0.02**	0.72±0.02*	78.82±2.51**

a) *表示在 0.05 水平上差异显著; **表示在 0.01 水平上差异显著

的显著弱化所致.

2.5 突变体的遗传分析

以日本晴和 *nsII* 杂交配置的 F₁ 代植株叶色和叶形均表现正常, F₂ 群体中出现分离, 表现正常叶和窄叶且条纹 2 种植株类型, 其中正常株 642 株, 突变植株 195 株, 经 χ^2 测验, 正常株与突变植株数符合 3:1 的分离比例($\chi^2=1.21 < \chi^2_{0.05}=3.84$), 表明该条纹窄叶性状, 受一对隐性核基因控制.

2.6 *nsII* 的分子定位

以日本晴/*nsII* 配制的 F₂ 群体中的 195 株隐性变异株作为定位群体, 采用分离体分组混合分析法(bulk segregant analysis, BSA)进行基因定位. (i) 以 SSR 引物对正常叶基因池和突变体基因池进行分析, 发现位于第 3 染色体的标记 RM6297 和 RM3131 在基因池间表现连锁, 进一步用 10 株正常株和 10 株突变株进行验证; (ii) 利用 F₂ 中的 68 株条纹窄叶株进行初步定位, 结果将 *NSLI* 基因初步定位在第 3 染色体 RM6297 和 RM3131 之间, 遗传距离分别为 8.08 和 10.26 cM(图 3).

为了进一步精细定位, 在 2 标记之间设计了 19 对新的 SSR 引物和插入缺失(insertion-deletion, InDel) 标记, 其中 8 对在亲本间表现多态性(表 5), 利用多态性标记对 195 株 F₂ 隐性单株进行连锁分析, 最终将 *NSLI* 定位于标记 InDel 16 和标记 InDel 12 之间 204 kb 的范围(图 3).

根据 Gramene(http://www.gramene.org/Oryza_sativa) 网站对该 204 kb 区域进行候选基因预测, 在定位区间内存在 33 个预测基因(表 6). 其中有 2 个与叶绿体合成或发育相关的基因, 1 个为 PPR(pentatricopeptide

repeat)蛋白, 但经测序, 并未发现差异; 另 1 个为甘油-3-磷酸酰基转移酶, 经测序, 也没有差异. 表明这 2 个基因非 *NSLI* 的候选基因. 其他 31 个基因见表 6.

3 讨论和结论

叶片是水稻进行光合作用和蒸腾作用的主要场所, 对同化产物的积累有着重要作用. 叶片器官的突变对植物的光合作用乃至生长发育都会产生重要影响, 其突变体是研究植物光合作用机制^[16]、激素生理^[3]等一系列生理代谢过程的理想材料. 往往叶色突变是生理和遗传共同作用的结果, 遗传机理相当复杂. 本实验室发现了一个水稻叶片呈现平行于叶脉分布的白色条纹且显著变窄的叶色和叶形同时发生变异的双重突变体 *nsII(t)*. *nsII(t)* 的叶绿体发育异常, 在生理上表现出严重缺陷, 如光合色素、叶绿体荧光参数、净光合速率、气孔导度、蒸腾速率均显著降低, 导致光合作用减弱, 生长量减小, 从而表现出株高、有效穗数、穗粒数、结实率、千粒重等其他重要农艺性状都显著减小. 水稻卷叶白化突变体 *null* 在叶色表现白化和叶形表现卷曲后, 其光合色素含量同样表现出显著下降, 有效穗数、结实率和千粒重等重要农艺性状也显著下降^[4]. 水稻花斑叶突变体 *St(t)* 也表现出叶绿素显著下降, 进而导致株高降低和主穗实粒数和结实率显著降低^[10]. 这些结果反映了作为光合作用主要器官的叶片发生突变后, 由于生理机能的下降, 用于光合作用的源不足(变窄导致叶面积下降)且效率低下(部分叶色变白), 从而向库中输送的产物减少, 造成花器官形成减少, 灌浆不足, 最终表现出结实率下降, 粒重减小. 因而 *nsII(t)* 的遗传机理

表4 *nsII* 突变体的光合特性^{a)}

材料	$P_n(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})$	$G_s(\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1})$	$C_i(\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1})$	$T_r(\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1})$
野生型	22.15±0.36	0.56±0.02	345.29±0.54	8.64±0.28
<i>nsII</i> 突变体	15.78±0.32**	0.29±0.01**	361.76±0.36**	7.56±0.21**

a) **表示在 0.01 水平上差异显著

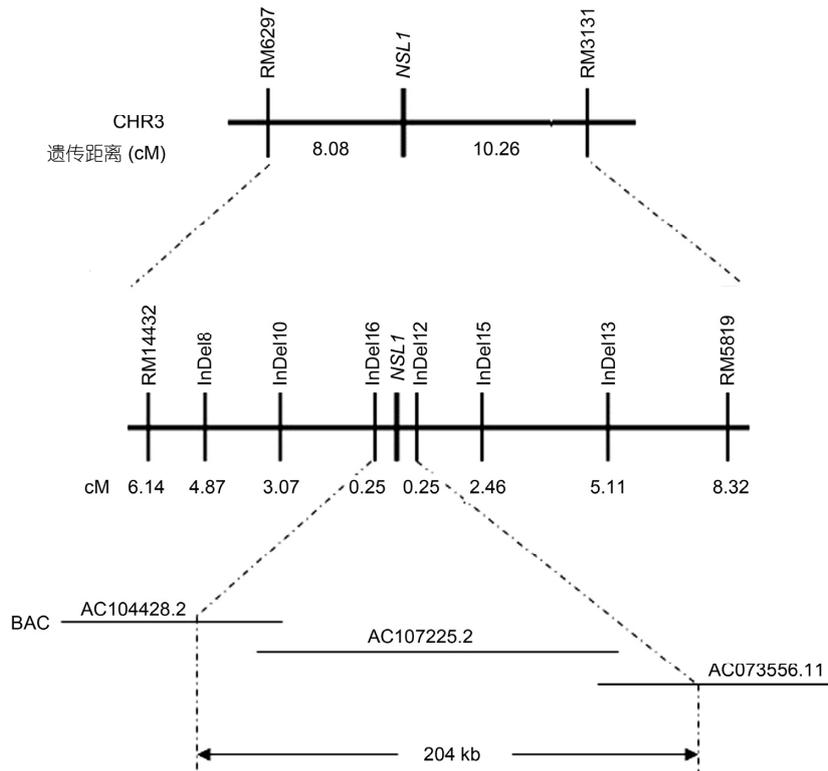


图3 *NSLI* 的分子定位

表5 与 *NSLI* 基因连锁的分子标记引物序列

分子标记	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
InDel 12	GCCGCCTCTATCATGCC	GCTGTTTCGTCGAGGAGGG
InDel 16	CCTATGTGCAACACATAGAGACTC	GCGTATTGGTAACCGTGTGC
RM5819	TACGCCTAACGGCCTAAGTACC	AATCACTCCAGAACCCAGTAGTGC
RM3131	TCTCTGCACCCTGTTACATGC	GCCTTTCCCAATGGAATATCAGG

值得深入研究.

*nsli(t)*与已报道的条斑叶或窄叶突变体表型及基因位置有明显不同. *wp(t)*是一个白穗突变体,少数叶片中脉呈现白色;*wp(t)*基因被定位在第1染色体上^[5]. *v1*和*v2*是温敏型叶色突变体;*v1*和*v2*基因已被克隆,均定位于第3染色体^[6-8]. *Oswm*突变体表现为白色中脉;*Oswm*基因对其他性状没有影响,定位在第4染色体^[9]. 白色条斑花叶突变体的*st(t)*和温度敏感的水稻白条纹突变体的*Gws*基因均被定位于第6染色体^[10,17]. 分子定位的窄叶基因*nal1*,*nal3(t)*,*nal7*和*NULL1*,分别位于第4,12,7和3染色体^[1-4]. 本实验室发现的*nsli*不仅叶片呈现平行于主叶脉的白色条纹,而且同时显著变窄,定位于第3染色体

RM6297和RM3131之间,与定位在第3染色体的窄叶基因*NULI*及条斑叶基因*v2*不在同一区间,*NULI*位于RM6394和RM21637之间^[4],*v2*位于限制性片段长度多态性(restricted fragment length polymorphisms, RFLP)标记R1862和R3126之间^[8],因而*NSLI(t)*可能是一个新基因.

已克隆的2个窄叶基因中,*NALI*编码一种特定的未知生物学功能的蛋白,该基因经检测在维管组织中表达丰富,使得维管组织发育不全,从而降低生长素在植物体内的极性运输能力,最终形成了窄叶的表型性状^[1]. *NAL7*基因编码一个黄素单氧化酶,是*YUCCA*家族中一员,参与生长素的合成来调控植物的叶形发育^[3]. 已克隆的水稻条纹叶基因*VI*调控前

表6 定位区域内预测基因

英文名称	中文名称	数量
PPR repeat containing protein	PPR(三角状五肽重复蛋白)	1
B3 DNA binding domain containing protein	B3 DNA 结合结构域蛋白质	1
Kinase, pfkB family	pfkB 家族激酶	1
Homeodomain protein	同源异型结构域蛋白	1
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase domain containing protein	泛素羧基末端水解酶结构域蛋白	2
Vesicle-associated membrane protein	囊泡相关膜蛋白	1
Tetratricopeptide repeat domain containing protein	四环重复肽结构域蛋白	1
Oxidoreductase	氧化还原酶	2
Glycerol-3-phosphate acyltransferase	甘油-3-磷酸酰基转移酶	1
Endonuclease/exonuclease/phosphatase family domain containing protein	核酸内切酶/核酸外切酶/磷酸酶家族域	1
LTPL82-protease inhibitor	LTPL82 蛋白酶抑制剂	1
RING finger protein 13	环指蛋白 13	1
Male sterility protein	雄性不育蛋白	1
Retrotransposon protein	反转录转座子蛋白	5
Calmodulin-binding protein	钙调蛋白	1
OsPP2Ac-5-phosphatase 2A isoform 5	2A 亚型 PP2Ac5-磷酸酶	1
OsFBK11-F-box domain and kelch repeat containing protein	OsFBK11-F-box 区和 kelch 重复域蛋白	1
DNA topoisomerase 3 protein	DNA 拓扑异构酶 3 蛋白	1
Beta-galactosidase	β -半乳糖苷酶	1
Hypothetical protein	假定蛋白	2
Expressed protein	表达蛋白	2
Nucleic acid binding protein	核酸结合蛋白	1
DRD1	多巴胺 D1 受体	1
Transposon protein	转座子蛋白	1
DUF593 domain containing protein	DUF593 结构域蛋白	1

质体向功能叶绿体的转化^[6], V2 编码鸟苷酸激酶, 在叶绿体发育早期通过干扰叶绿体翻译机制抑制叶绿体的分化^[7,8]. 本实验室在 *NSLI* 基因的定位区域尚未发现上述相类似的基因. 但含有一个三角状重复五肽蛋白(PPR), 已有研究发现, 该类蛋白参与叶绿体合成, 转反义 *OsPPRI* 的水稻叶片出现了白化, 叶绿体发育受阻, 在苗期死亡^[18]. 但本研究通过测序该基因, 并没有发现差异, 表明该基因非 *NSLI* 的候选基因. 另一个与叶绿体发育有关的是甘油-3-磷酸酰基转移酶, 研究表明, 拟南芥叶片质体甘油-3-磷酸酰基转移酶缺失突变体可改变叶绿体膜脂的成分, 进而引起类囊体膜数量的减少^[19]. 但经测序, 这一基因也没有差异. 其他基因的测序正在进行中. 因而

NSLI 可能是一个新基因, 值得深入研究.

综上所述, 本实验室发现了一个新水稻条纹窄叶突变体 *nsll*, 其光合色素显著降低, 白化部位叶绿体结构严重解体, 叶绿体荧光参数和净光合速率显著减小. 这一系列细胞结构和生理的变化, 抑制了植株的正常生长, 导致了株高、有效穗数、穗粒数、千粒重等其他重要农艺性状的显著减小. 该基因由一对隐性基因控制, 定位于第 3 染色体 InDel 16 和 InDel 12 标记之间, 物理距离约为 204 kb 的区域. 在该区域尚无已报道的条纹或窄叶基因, 可能是一个新基因. 深入研究该基因对揭示水稻叶片变窄及叶绿素缺失的分子形成机理有重要意义, 同时也可作为叶形标记应用于水稻新株型育种.

参考文献

- 1 Qi J, Qian Q, Bu Q, et al. Mutation of the rice *Narrow leaf 1* gene, which encodes a novel protein, affects vein patterning and polar auxin transport. *Plant Physiol*, 2008, 147: 1947–1959
- 2 汪得凯, 刘合芹, 李克磊, 等. 一个水稻窄叶突变体的鉴定和基因定位. *科学通报*, 2009, 54: 360–365
- 3 Fujino K, Matsuda Y, Ozawa K, et al. *NARROW LEAF7* controls leaf shape mediated by auxin in rice. *Mol Genet Genomics*, 2008, 279: 499–507
- 4 王峰, 唐彦强, 苗润隆, 等. 水稻窄叶白化突变体 *nul1* 的鉴定与基因定位. *科学通报*, 2012, 57: 2066–2071
- 5 李红昌, 钱前, 王赟, 等. 水稻白穗突变体基因的鉴定和染色体定位. *科学通报*, 2003, 48: 268–270
- 6 Kensuke K, Akiko M, Mitsuo N, 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: 1241–1250
- 7 Sugimoto H, Kusumi K, Noguchi K, 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
- 8 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: 985–996
- 9 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: 1–4
- 10 桑贤春, 徐芳芳, 凌英华, 等. 水稻条纹花叶突变体 *st(t)* 的鉴定与遗传定位. *作物学报*, 2010, 36: 211–216
- 11 Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzymol*, 1987, 48: 350–382
- 12 何瑞锋, 丁毅, 余金洪, 等. 水稻温敏叶绿素突变体叶片超微结构的研究. *武汉植物学研究*, 2001, 19: 1–5
- 13 McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1988, 76: 815–829
- 14 Luo Z K, Yang Z L, Zhong B Q, et al. Genetic analysis and fine mapping of a dynamic rolled leaf gene *RL10 (t)* in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome*, 2007, 50: 811–817
- 15 Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 1996, 259: 597–607
- 16 Fambrini C A, Vecchia F D, Degl'Innocenti E, et al. Characterization of a pigment-deficient mutant of sunflower (*Helianthus annuus* L.) with abnormal chloroplast biogenesis, reduced PS II activity and low endogenous level of abscisic acid. *Plant Sci*, 2004, 167: 79–89
- 17 许凤华, 程治军, 王久林, 等. 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: 713–720
- 18 Gothandam K M, Kim E S, Cho H, et al. OsPPR1, a pentatricopeptide repeat protein of rice is essential for the chloroplast biogenesis. *Plant Mol Biol*, 2005, 58: 421–433
- 19 Kunst L, Browse J, Somerville C. Altered chloroplast structure and function in a mutant of *Arabidopsis* deficient in plastid glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *Plant Physiol*, 1989, 90: 846–853