

水稻白穗突变体 *wp6* 的发现及研究

从夕汉^{1,2,3}, 阮新民^{1,2,3}, 罗志祥^{1,2,3}, 白一松^{1,2,3}, 杨联松^{1,2,3}, 罗玉祥^{1,2,3}, 施伏芝^{1,2,3*}

(1.安徽省农业科学院水稻研究所, 安徽合肥 230031; 2.国家水稻改良中心合肥分中心, 安徽合肥 230031; 3.安徽省水稻遗传育种重点实验室, 安徽合肥 230031)

摘要 [目的]研究水稻穗部叶绿体发育的分子机制。[方法]本文以籼型恢复系 RH003 的自然突变体 *wp6* 为研究材料, 从农艺性状、稻米品质和叶绿素含量比较了突变体和野生型, 并以突变体与日本晴、9311 杂交构建 F₂ 群体来研究 *wp6* 的遗传模式。[结果]突变体整株叶片呈绿色, 抽穗期至成熟期, 穗部白色, 穗轴和小梗为绿色。与野生型相比, *wp6* 的生育期、株高、有效穗数、每穗总粒以及每穗实粒略高, 而 *wp6* 的结实率 (66.85%) 则远低于野生型 RH003 的 82.40%。成熟期米质分析表明, 突变体的外观品质和蒸煮食味比野生型略差。苗期突变体和野生型叶片叶绿素含量差异不大, 抽穗期时突变体白穗性状是由于叶绿素 a 含量低所致。对 *wp6* 与正常叶色品种杂交 F₁、F₂ 代的遗传分析表明, 该性状受 1 对隐性核基因调控。[结论] 该研究为 *wp6* 基因的定位、克隆和功能研究奠定基础, 也为水稻标记性状育种提供新的资源。

关键词 水稻 (*Oryza sativa* L.); 白穗突变体; 叶绿体; 遗传分析

中图分类号 S511 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)36-0029-03

Discovery and Study of White Panicle Mutant *wp6* in Rice

CONG Xi-han^{1,2,3}, RUAN Xin-min^{1,2,3}, LUO Zhi-xiang^{1,2,3} et al (1. Institute of Rice Research, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031; 2. Key Laboratory of Rice Genetics and Breeding of Anhui Province, Hefei, Anhui 230031; 3. Key Laboratory of Rice Genetics and Breeding of Anhui Province, Hefei, Anhui 230031)

Abstract [Objective] To clear the mechanism of chloroplast development of panicle in rice (*Oryza sativa* L.). [Method] A novel white panicle mutant from the indica restorer line RH003 with natural mutation was discovered and termed it as *wp6*, the mutant and wild type were compared in terms of agronomic trait, rice quality and chlorophyll content. F₂ population (*wp6* × Nipponbare, *wp6* × 9311) were constructed to study the genetic model of mutant. [Result] The *wp6* displayed green leaves and spike stalks, white hulls after the heading stage. Compared with the wild type, the growth period, plant height, number of effective panicles, grain number per panicle and filled grain number per panicle of *wp6* were slightly higher, while the seed setting rate of *wp6* (66.85%) was far lower than that of RH003 (82.40%). Appearance quality and cooking quality of *wp6* were slightly worse than those of RH003. There was little difference in Chlorophyll content of leaves between *wp6* and RH003 at seedling stage, and the white panicle of *wp6* was caused by low chlorophyll a content at heading stage. Genetic analysis indicated that the white panicle of *wp6* was controlled by a recessive nuclear gene. [Conclusion] This research provides a foundation for gene mapping and cloning and function analysis of the *wp6*, the phenotype of *wp6* could also be favorable for rice breeding as a morphological marker.

Key words Rice (*Oryza sativa* L.); White panicle; Chloroplast; Genetic analysis

随着世界人口的持续增长, 特别是随着气候干旱和自然灾害的频繁发生, 提高光合效率已经成为作物育种的重要目标^[1]。叶绿素 (Chlorophyll, Chl) 是植物叶绿体内参与光合作用的重要色素, 叶绿素合成缺陷突变是一类明显的性状突变。高等植物中叶绿素包括叶绿素 a (chlorophyll a) 和叶绿素 b (chlorophyll b) 2 种, 叶绿素生物合成从 L-谷氨酰-tRNA 到叶绿素 a, 叶绿素 a 再经叶绿素酸酯 a 加氧酶氧化即形成叶绿素 b, 整个生物合成过程需要 15 步反应, 涉及 15 种酶, 在拟南芥中已分离了 27 个编码这些酶的基因^[2-3], 水稻中有 17 个编码这些酶的基因。整个合成过程主要分为 2 个部分: 从 L-谷氨酰-tRNA 到原卟啉 IX (proto IX) 的生物合成和原卟啉 IX (proto IX) 到叶绿素的生物合成^[4]。叶绿素合成途径中, 任何一个基因的突变都可能会导致叶绿素合成受阻, 改变其含量, 从而形成不同程度和不同表型的叶色变化^[5-7]。目前, 水稻中已发现和鉴定了 160 多个关于叶色的突变体,

包括黄花、浅绿、白化及紫色等性状^[8-10]。与叶片相比, 尽管水稻穗部叶绿体色素含量相对要少, 光合效率低, 但穗部光合作用对水稻产量和品质的影响程度及穗部叶绿体发育的分子机理尚不清晰。有研究表明, 在抽穗期对水稻穗部分别套不透明和透明袋, 套不透明袋的水稻千粒重和结实率都明显低于套透明袋^[11]。另外, 在育种方面, 标记性状的应用越来越受到重视, 穗部突变体的穗部颜色可有效应用于不育系和杂交水稻的品种纯度鉴定, 有效降低了机械化制种的成本^[12]。

笔者从优良籼型两系恢复系 RH003 获得 1 个新的白穗突变体 *wp6*, 暂命名为 *wp6* (white panicles 6), 对该新白穗突变体的表型特征、主要农艺性状和稻米品质以及遗传模式进行了观察和分析, 旨在为水稻白穗突变体 *wp6* 的基因定位、克隆和功能研究以及在育种上的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料 白穗突变体 *wp6* 系从优良两系恢复系育种材料 RH003 中获得, 已种植多个世代, 穗部白化表型等农艺性状在合肥、海南两地都能稳定遗传。突变体整株叶片呈绿色, 抽穗期至成熟期穗部白色, 穗轴和小梗为绿色, 以野生型品种 RH003 为对照。

1.2 *wp6* 表型特征观察及主要农艺性状调查 试验于 2016 年在安徽省农业科学院水稻研究所国家水稻育种改良分中

基金项目 安徽省自然科学基金 (1608085QC67); 国家重点研发计划课题 (2017YFD0100304, 2017YFD0301304); 安徽省科技攻关计划项目 (1604a0702008); 安徽省国际科技合作计划 (1704e1002232); 安徽省农业科学院种子工程项目 (17D0101)。

作者简介 从夕汉 (1981—), 男, 安徽芜湖人, 助理研究员, 硕士, 从事水稻遗传育种及农业生物技术研究。* 通讯作者, 研究员, 从事水稻遗传育种研究。

收稿日期 2018-11-27; **修回日期** 2018-12-03

心(合肥)的网室进行。5月1日播种,5月30日移栽,单本种植,株行距20 cm×20 cm,采用随机区组设计,田间种植,3次重复,每个小区10行,每行11株,按正常田间肥水管理,及时防治水稻病虫害。根据叶龄,全生育期观察供试材料叶色变化情况,抽穗期之后每隔1 d记载穗部颜色。

供试水稻品种成熟后,排除边际效应,分别从每行第3株开始连续取5株叶突变体和野生型晾干考种,测定对照及各处理品种产量及其构成因素,调查生育期、株高、有效穗数、每穗总粒数、每穗实粒数、结实率、千粒重等主要农艺性状。

1.3 稻米品质的测定 测定前剔除空秕粒,根据中华人民共和国农业部颁布的标准 NY/T 593—2013^[13]测定米粒的长宽比、垩白率、垩白度和透明度以及稻米的胶稠度和碱消值;直链淀粉含量采用瑞典 FOSS 流动注射分析仪测定。

1.4 光合色素含量测定 采用丙酮浸提的方法提取色素,抽穗期时,取抽穗期 RH003 和 *wp6* 材料的剑叶(完全伸展开)叶片和幼穗,称量约 30~200 mg 后剪碎,置于相应体积的 80%丙酮中,室温避光放置 24 h,中间多次混匀。5 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,用紫外可见分光光度计(Spectrum-lab 752Pro)分别测定 663、645 和 470 nm 处的吸光值,参照 Lichtenthaler^[13]的方法计算叶片单位质量叶绿素 a (Chl a)、叶绿素 b (Chl b) 和类胡萝卜素 x (Chl x) 的含量,公式如下:

$$\text{Chl a} = 12.21A_{663} - 2.81A_{645}$$

$$\text{Chl b} = 20.13A_{645} - 5.03A_{663}$$

$\text{Chl x} = (1\,000A_{470} - 2.05\text{Chl a} - 114\text{Chl b})/245$,测定叶绿素含量,重复 3 次。

1.5 *wp6* 的遗传分析 于 2015 年 3 月在海南三亚用白穗突变体 *wp6* 分别与正常穗部颜色水稻品种日本晴和 9311 正反交得到 4 个 F_1 (*wp6*/日本晴,日本晴/*wp6*; *wp6*/93-11,93-11/*wp6*),种植 F_1 获得 F_2 。于 2016 年 5 月 2 日在安徽省农业科学院水稻研究所国家水稻育种改良分中心进行播种,6 月 1 日移栽,单本种植。抽穗期时,观察和统计 F_2 群体中突变表型和正常表型的植株数,计算分离比,应用孟德尔遗传规律进行遗传分析,通过 χ^2 测验,推断 *wp6* 的遗传模式。

1.6 数据处理 数据处理采用 Microsoft Excel 2007 软件和 SPSS 19.0 统计分析软件进行统计分析。图表中数据均为 3 次重复的平均值。

2 结果与分析

2.1 *wp6* 的表型特征及主要农艺性状 通过田间观察,野生型的叶片全生育期都为绿色,抽穗期穗部颖壳为绿色,成熟期颖壳为金黄色。突变体 *wp6* 全生育期叶片均为绿色,穗部颖壳颜色从抽穗期到成熟期一直为白色。与野生型 RH003 相比,*wp6* 的生育期、株高、有效穗数、每穗总粒以及每穗实粒略高,*wp6* 的穗长和千粒重略低,而 *wp6* 的结实率(66.85%)明显低于野生型 RH003 的 82.40%(表 1)。

表 1 突变体 *wp6* 和野生型(WT)的主要农艺性状比较

Table 1 Comparison of major agronomic traits between the *wp6* and the wild type (WT)

材料名称 Name of material	生育期 Growth period//d	株高 Plant height cm	有效穗数 Number of effective panicles	穗长 Panicle length cm	每穗总粒 Grain number per panicle	每穗实粒 Filled grain number per panicle	结实率 Seed setting rate//%	千粒重 1 000-grain weight//g
<i>wp6</i>	125.40±1.22	115.60±2.25	7.00±0.67	22.88±1.89	272.80±4.54	182.37±4.11	66.85±1.33	19.35±0.14
RH003	118.60±1.17	110.50±1.66	6.60±0.43	24.11±1.34	176.65±3.22	145.56±3.12	82.40±1.56	19.69±0.13

2.2 稻米品质比较 成熟期对突变体和野生型的稻米外观品质和蒸煮食味进行比较(表 2),与野生型 RH003 相比,突变体 *wp6* 的长宽比、胶稠度明显低。而 *wp6* 的垩白度、透明

度、碱消值以及直链淀粉含量均高于野生型 RH003。野生型和突变体稻米的胶稠度和直链淀粉含量相差较大。以上结果表明,突变体的外观品质和蒸煮食味比野生型略差。

表 2 突变体 *wp6* 和野生型(WT)的稻米外观品质和蒸煮食味比较

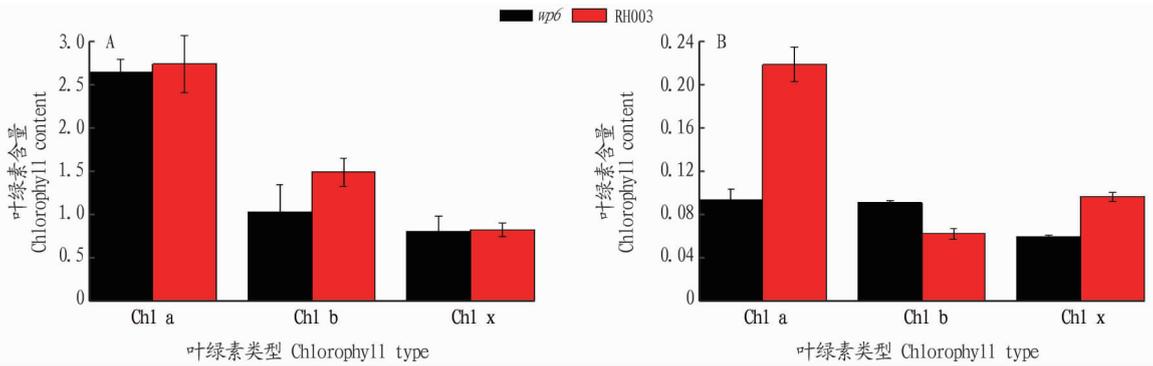
Table 2 Comparison of the appearance quality and cooking quality of the *wp6* and the wild type (WT)

材料名称 Material name	长宽比 Long-breadth ratio	垩白度 Chalkiness//%	透明度 Transparency	胶稠度 Gel consistency//mm	碱消值 Alkali digestion value	直链淀粉含量 Amylose content//%
<i>wp6</i>	3.696	2.2	0.631	31.0	7.0	23.3
RH003	4.316	0.7	0.528	59.5	6.7	15.3

2.3 叶绿素含量比较 突变体和野生型在田间种植时,对苗期(4 叶期)叶片的叶绿素 a (Chl a)、叶绿素 b (Chl b) 和类胡萝卜素(Chl x)进行了检测(图 1 A),突变体和野生型叶片中的叶绿素 a 的含量均明显大于叶绿素 b 和类胡萝卜素,叶绿素 a 和类胡萝卜素的含量相近,而突变体叶片中的叶绿素 b 则低于野生型。突变体和野生型穗部抽出一半时,对穗部颖壳中的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素进行了检测(图 1

B),结果显示与野生型相比,突变体穗部颖壳中的叶绿素 b 含量略高,类胡萝卜素含量略低,而叶绿素 a 的含量则远低于野生型 RH003。以上结果表明,突变体和野生型苗期叶片叶绿素含量差异不大,抽穗期时突变体白穗性状是由于叶绿素 a 含量低所致。

2.4 遗传分析 突变体 *wp6* 分别与正常穗部颜色的水稻品种日本晴和 9311 进行正反交并种植,整个生育期,4 个 F_1 杂



注:A.突变体和野生型苗期叶片叶绿素含量;B.突变体和野生型抽穗期达 1/2 时穗部颖壳中叶绿素含量

Note:A.Chlorophyll contents in leaves of the *wp6* and the wild type (WT) at the seedling stage;B.Chlorophyll contents in hulls of the *wp6* and the wild type (WT) at the half of heading stage

图 1 突变体和野生型叶绿素含量比较

Fig.1 Comparison of chlorophyll contents of the *wp6* and the wild type

交种植株叶片均为绿色,抽穗期 F_1 的穗部颜色均为绿色。抽穗期杂交组合 *wp6*/日本晴和 *wp6*/93-11 的 F_2 群体中正常穗部颜色植株与白穗植株分离十分明显,经 χ^2 检验均符合 3:1 的分离比(表 4),表明 *wp6* 的白穗性状由 1 对隐性核基因控制。

表 4 白穗突变体 *wp6* 的遗传分析

Table 4 Genetic analysis of white panicle mutant *wp6*

杂交组合 Cross	F_1 表型 F_1 phenotype	F_2 群体 F_2 population			$\chi^2(3:1)$
		正常植株数 Normal plants	白穗植株数 White panicle plants	总株数 Total plants	
<i>wp6</i> /日本晴	正常型	240	66	306	1.922
<i>wp6</i> /Nipponbare					
<i>wp6</i> /9311	正常型	385	116	501	0.911

3 结论与讨论

目前,关于水稻穗部失绿的突变体报道较少, Sanchez 等^[14]较早报道的白穗突变体 *wp1* 和 *wp2*, 主要特征大致相同,成熟植株穗表现为白色,植株基部 3 个叶片表现出白色条纹。不同的是 *wp1* 突变体的穗轴和小梗表现为绿色,*wp2* 则表现出白色的穗轴和小梗,2 个基因分别位于第 7 和第 1 染色体上。Song 等^[10]研究发现 *wlp1* 的表型受低温影响,在低温条件下,*wlp1* 幼苗和穗部表现叶绿素缺陷。该基因被定位在第 1 染色体长臂上,编码核糖体 L13 蛋白质。金怡等^[15]研究发现,*wslup* 的叶片苗期由白色转为条纹叶,随着植株的发育叶片颜色几乎恢复正常,至抽穗时颖壳颜色为白色,穗轴和小枝梗表现为绿色,穗粒成熟时变为黄色,叶绿素含量随叶色和颖壳颜色的变化发生了相应的变化,叶绿体发育表现出了明显的时间和组织特异性。该突变体被定位在第 7 染色体短臂上。Li 等^[16]鉴定了 *wp(t)* 是 1 个白穗突变体,少数叶片中脉呈现白色,控制该性状的基因已被定位在第 1 染色体上。王晓雯等^[11]研究发现 *wp4* 全生育期叶色黄绿,抽穗灌浆期内外颖呈乳白色,穗轴颜色不变。颖壳中,*wp4* 的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素的含量均极显著下降,细胞内无明显的叶绿体结构,该基因已被定位在第 8 染色体

上。该研究使用的穗部白化材料是优良籼型两系恢复系 RH003 的自然突变体,已种植多个世代,穗部白化表型等农艺性状表现稳定,突变体整株叶片呈绿色,抽穗期至成熟期穗部白色,穗轴和小梗为绿色,且性状不受温度影响。因此,推测突变体 *wp6* 是由新的位点突变引起。

参考文献

- [1] 牛丽芳,路铁刚,林浩.水稻高光效育种研究进展[J].生物技术进展,2014,4(3):153-157.
- [2] NAGATA N,TANAKA R,SATOH S,et al.Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of prochlorococcus species [J].The plant cell,2005,17(1):233-240.
- [3] NAGATA N,TANAKA R,TANAKA A.The major route for chlorophyll synthesis includes [3,8-divinyl]-chlorophyllide a reduction in *Arabidopsis thaliana* [J].Plant Cell Physiol,2007,48(12):1803-1808.
- [4] 王平荣,张帆涛,高家旭,等.高等植物叶绿素生物合成的研究进展[J].西北植物学报,2009,29(3):629-636.
- [5] HARPAZ-SAAD S,AZOULAY T,ARAZI T,et al.Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is posttranslationally regulated [J].Plant cell,2007,19(3):1007-1022.
- [6] MOULIN M,MCCORMAC A C,TERRY M J,et al.Tetrapyrrole profiling in *Arabidopsis* seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation [J].Proc Natl Acad Sci USA,2008,105(39):15178-15183.
- [7] LARKIN R M,ALONSO J M,ECKER J R,et al.GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling [J].Science,2003,299(5608):902-906.
- [8] 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[J].西北植物学报,2005,25(8):1685-1691.
- [9] 陈德西,李婷,曲广林,等.水稻条纹和颖花异常突变体 *st-fon* 的鉴定与遗传分析[J].中国水稻科学,2012,26(6):677-685.
- [10] SONG J,WEI X J,SHAO G N,et al.The rice nuclear gene *WLP1* encoding a chloroplast ribosome L13 protein is needed for chloroplast development in rice grown under low temperature conditions [J].Plant Mol Biol,2014,84(3):301-314.
- [11] 王晓雯,蒋钰东,廖红香,等.水稻白穗突变体 *wp4* 的鉴定与基因精细定位[J].作物学报,2015,41(6):838-844.
- [12] 周桂香,方玉,张从合,等.亲本具稀色差异两系杂交水稻新两优 106 混直播制种技术初探[J].杂交水稻,2014,29(3):30-32.
- [13] Ministry of Agriculture of the People's Republic of China.Cooking rice variety quality:NY/T 593—2013[S].Beijing:China Standards Press,2013.
- [14] SANCHEZ A C,KHUSH G S.Chromosomal location of some marker genes in rice using primary trisomics [J].J Hered,1994,85(4):297-300.
- [15] 金怡,刘合芹,汪得凯,等.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[J].中国水稻科学,2011,25(5):461-466.
- [16] LI H C,QIAN Q,WANG Y,et al.Characterization and mapping of a white panicle mutant gene in rice [J].Chin Sci Bull,2003,48(5):457-459.