

刘立龙, 李允振, 谢旭阳, 等. 1 个水稻紫叶基因 *pl41* 的遗传分析与定位[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(3): 25-30.

1 个水稻紫叶基因 *pl41* 的遗传分析与定位

刘立龙¹, 李允振¹, 谢旭阳¹, 徐一博¹, 李容柏^{1,2}, 覃宝祥^{1,2}

(1 广西大学农学院, 广西 南宁 530005; 2 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530005)

摘要:【目的】对水稻材料 *pl41* 的紫叶性状进行遗传分析和基因定位, 为 *pl41* 基因的图位克隆、功能研究及其育种利用奠定基础。【方法】在紫叶籼稻品种‘Z3474’与绿叶粳稻品种‘日本晴’的杂交后代中, 获得 1 个紫叶性状稳定遗传的材料 *pl41*。观察 *pl41* 表型特征; 配制 *pl41*/日本晴杂交组合, 利用 F₁ 及 F₂ 分离群体进行紫叶基因的遗传分析和基因定位研究。【结果】*pl41* 紫色性状首先出现在苗期的叶鞘、叶尖和叶缘处, 在抽穗期, *pl41* 植株地上部分组织均呈现较深的紫色。与‘日本晴’相比, *pl41* 叶绿素含量在苗期显著高于‘日本晴’, 在抽穗期显著低于‘日本晴’, 在灌浆期无显著差异; *pl41* 花青素含量在苗期、抽穗期和灌浆期均极显著高于‘日本晴’。*pl41* 紫叶性状受 1 对隐性核基因控制, 定位在第 12 号染色体短臂 289 kb 范围内, 对该区域 5 个预测基因的编码区序列进行了测序比对分析, 发现其编码区序列在 *pl41* 与‘日本晴’之间无差异。【结论】初步定位了水稻 *pl41* 紫叶基因的范围, 其最终确定还需要候选基因的精细定位、序列比对分析和转录水平分析。

关键词: 水稻; 紫叶性状; 遗传分析; 基因定位; *pl41* 基因
中图分类号: S511; Q311.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)03-0025-06

Genetic analysis and mapping of a rice purple leaf gene *pl41*

LIU Lilong¹, LI Yunzhen¹, XIE Xuyang¹, XU Yibo¹, LI Rongbo^{1,2}, QIN Baoxiang^{1,2}

(1 College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning 530005, China)

Abstract: 【Objective】To carry out genetic analysis and gene mapping of purple leaf character in the rice material *pl41*, and provide a foundation for *pl41* gene map-based cloning, function research and application in rice breeding. 【Method】The genetically stable purple leaf germplasm *pl41* was derived from the hybrids of a purple leaf indica cultivar ‘Z3474’ and a green leaf japonica cultivar ‘Nipponbare’. The phenotypic characteristics of *pl41* were surveyed. *pl41* was crossed with ‘Nipponbare’, then F₁ and F₂ segregation progenies were used for genetic analysis and preliminary mapping of *pl41* gene. 【Result】The purple character of *pl41* firstly appeared in leaf sheath, leaf apex and leaf margin at seedling stage, then the aboveground parts of *pl41* plant presented dark purple at heading stage. Compared to ‘Nipponbare’, chlorophyll content of *pl41* was significantly higher at seedling stage, significantly lower at heading stage and there was no significant difference at filling stage. Anthocyanin contents of *pl41* were all significantly higher than those of ‘Nipponbare’ at seedling, heading and filling stages. The purple leaf character of *pl41* was controlled by a pair of recessive nuclear genes, which was mapped to a 289 kb region on the short arm of chromosome 12. By sequencing for coding sequences of five genes

收稿日期: 2017-12-08 优先出版日期: 2018-04-16
优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20180416.1031.010.html>
作者简介: 刘立龙 (1985—), 男, 博士研究生, E-mail: 419093053@qq.com; 通信作者: 李容柏 (1957—), 男, 研究员, 博士, E-mail: lirongbai@126.com; 覃宝祥 (1979—), 男, 副研究员, 博士, E-mail: bxqin@gxu.edu.cn
基金项目: 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题 (SKLCUSA-b201607); 广西研究生教育创新计划项目 (YCSW2017043); 广西大学博士启动项目 (XBZ160070)

within this mapped region, no difference was found in coding sequences of these genes between *Pl41* and ‘Nipponbare’.

【Conclusion】The region of rice purple leaf gene *pl41* is mapped preliminarily. The exact determination of *pl41* depends on fine mapping, sequence alignment analysis and transcription analysis of candidate genes.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); purple leaf trait; genetic analysis; gene mapping; *pl41* gene

水稻 *Oryza sativa* L. 是人类最重要的粮食作物之一，杂交水稻的推广极大地提高了水稻单产，为我国粮食安全提供了强有力的保障。但是杂交稻尤其是两系杂交稻在种子生产过程中，光温敏核雄性不育系在低温条件下育性容易恢复，导致杂交种亲本混淆和杂交种纯度下降。例如‘培矮 64S’在 1989、2001 和 2002 年夏季的低温条件下，出现了严重的育性恢复，致使其组配的 F₁ 杂交种出现了较大比率的假杂交种^[1]。如何在低温条件下确保不育系和杂交种的纯度一直以来是困惑育种学家们的一个难题。为了解决这一问题，人们尝试使用了不同的方法，例如人工除杂技术和紫叶标记技术。比较而言，人工除杂技术有明显的缺陷，使用该技术进行人工筛选去除假不育系，不仅成本高周期长，而且许多性状受栽培技术及环境因素的影响而不易辨别，影响筛选效果。而紫叶标记技术具有明显的优势，导入了隐性紫叶性状的不育系在苗期表现紫色，如果繁种时该隐性紫叶不育系与其他正常绿叶的水稻串粉结实，其杂交种表现为绿色，那么在苗期的制种田里就能轻易剔除掉混杂的不育系，保证不育系纯度。为此，育种学家们将紫叶标记技术与不育系的选育相结合，先后育出‘中紫 S’、‘明紫-2S’、‘明紫-3S’、‘99H114 紫 S’、‘紫 IIA’和‘先红 A’^[2-7]等一批具有较高应用价值的紫叶不育系，极大减少了杂交稻因种子纯度下降而造成的损失。

水稻的紫色性状与花青素含量的累积相关。花青素是一种黄酮类植物色素，它的合成既受结构基因编码蛋白的调控，也受调节因子，如 MYB(v-Myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog) 家族的 bHLH(Helix-helix-turn-helix) 蛋白等的控制^[8]。花青素的转运与积累可能受 GST(Glutathione S-transferase) 和 MATE(Multidrug and toxin efflux) 蛋白家族基因等的调控^[9-10]。截至 2018 年 3 月，通过图位克隆已克隆出 *OsCI* 和 *Pl^u2* 个水稻紫叶性状基因，其中，*OsCI* 位于第 6 号染色体上编码 1 个 MYB 类转录因子，*Pl^u* 位于第 4 号染色体上，由 *OsBI* 和 *OsB2* 共同组成，编码 1 个 bHLH 转录因子^[11-12]，

这些基因的克隆促进了对水稻花青素分子调控机制的理解。但是，水稻紫叶性状受合成基因、调节基因和转运基因等多个基因控制。因此，深入挖掘水稻紫叶新基因，对增进对水稻花青素分子调控机制的理解并促进其在水稻遗传改良中的应用具有重要意义。

本研究从紫叶籼稻品种‘Z3474’与绿叶粳稻品种‘日本晴’的杂交后代中选育得到紫叶纯系材料 *pl41*，并对其进行表型分析、遗传分析和基因初步定位研究，以期对 *pl41* 的图位克隆、花青素分子调控路径解析和 *pl41* 在水稻遗传改良中的应用奠定坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻紫叶材料 *pl41* 是从紫叶籼稻品种‘Z3474’与绿叶粳稻品种‘日本晴’的杂交后代中筛选得到的 1 份紫叶性状稳定遗传的材料。*pl41* 与‘日本晴’杂交后代 F₁ 及分离群体 F₂ 用于紫叶性状的遗传分析和基因初步定位研究。

1.2 田间种植和性状调查

田间试验分别于 2015 和 2016 年在广西大学农学院试验田进行，分早晚 2 季：早季 3 月 1 日播种，4 月 7 日移栽；晚季 7 月 21 日播种，8 月 9 日移栽。株行距 15 cm×25 cm，单株种植，每行 10 株，常规水肥管理。苗期、抽穗期和灌浆期分别观察 *pl41*、‘日本晴’和 F₁ 植株的叶色，并统计分析 F₂ 群体中紫叶和绿叶单株的分离情况，挑选 F₂ 群体中紫叶单株进行目标基因定位研究。

1.3 叶绿素及花青素含量测定

在苗期、抽穗期和灌浆期分别取 *pl41* 和‘日本晴’的倒 2 叶进行叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素、类胡萝卜素和花青素含量的测定，每个时期每个亲本分别重复 3 次。

叶绿素含量测定：样品表面用蒸馏水冲洗，并用吸水纸吸干表面水分，将叶片剪成直径为 1~3 mm 的碎片，混匀后称取碎片 0.05 g，放入 25 mL 棕色试剂瓶中，重复 3 次。用 *V*(丙酮)：*V*(乙

醇)=1:1 的混合液定容至 25 mL, 室温下置于摇床上振荡 24 h, 使碎片与试剂充分接触。以 $V(\text{丙酮}):V(\text{乙醇})=1:1$ 的混合液为空白对照, 使用 INESA L5S 紫外可见分光光度计测定浸提液在波长 470、645 和 663 nm 下的吸光度 (D)。

按照以下公式分别计算叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素含量:

$$w(\text{叶绿素 a})=(12.7D_{663\text{ nm}}-2.69D_{645\text{ nm}})V/(1\ 000m),$$

$$w(\text{叶绿素 b})=(22.9D_{645\text{ nm}}-4.68D_{663\text{ nm}})V/(1\ 000m),$$

$$w(\text{总叶绿素})=(20.2D_{645\text{ nm}}+8.02D_{663\text{ nm}})V/(1\ 000m),$$

$$w(\text{类胡萝卜素})=4.7D_{470\text{ nm}}-0.27w_{\text{总}}。$$

式中, V 为提取液总体积 (25 mL); m 为样品质量 (0.05 g)。

花青素含量测定: 样品表面用蒸馏水冲洗, 并用吸水纸吸干表面水分, 将叶片剪成直径为 1~3 mm 的碎片, 混匀后称取碎片 0.1 g, 放入 10 mL 离心管中, 重复 3 次。加入 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液, 定容至 10 mL。室温下置于摇床上振荡 4 h, 使碎片与试剂充分接触。以 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液为空白对照, 使用 INESA L5S 紫外可见分光光度计在 530 nm 下测定浸提液的吸光度。假设吸光度 $D_{530\text{ nm}}=0.1$ 时的花青素浓度为 1 个单位, 用以比较花青素的相对含量, 计算公式为:

$$\text{花青素的相对含量}=10D_{530\text{ nm}}。$$

1.4 统计分析方法

采用 SPSS11.0 和 Excel 软件对试验数据进行统计分析, 差异显著性分析采用 t 检验法。

1.5 DNA 提取、PCR 体系及电泳

参照 Monna 等^[13]的方法提取叶片基因组 DNA。用于基因定位的 PCR 扩增体系为 10 μL : DNA 模板 1 μL 、上下游引物各 0.4 μL 、PCR Mix 5 μL 和 ddH₂O 3.2 μL 。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。扩增产物经 $70\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。用于候选基因测序的 PCR 扩增体系为 40 μL , 包括 DNA 模板 4 μL 、上下游引物各 1.6 μL 、 $2\times\text{EasyPfu}$ PCR SuperMix 20 μL 、ddH₂O 12.8 μL 。扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、56 $^{\circ}\text{C}$ 35 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增产物经 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳检测, 目标条带回收后由深圳华大基因公司测序。PCR Mix 和 *EasyPfu* PCR SuperMix <http://xuebao.scau.edu.cn>

均购自全式金生物技术公司。

1.6 多态性分子标记的开发

基因连锁分析及定位的分子标记包括 STS 和 SSR 标记, 其中 SSR 标记引物序列来自数据库 <http://www.gramene.org>, STS 标记基于粳稻品种‘日本晴’和籼稻品种‘9311’的序列差异, 在差异序列两端开发设计引物, SSR 和 STS 标记引物均由深圳华大基因公司合成。

1.7 候选基因的预测分析

利用 RAP-DB(<http://rapdb.dna.affrc.go.jp>) 和 GRAMENE(<http://ensembl.gramene.org>) 水稻基因组注释信息, 对定位区间内的所有基因进行预测, 结合候选基因编码区序列的测序比对, 分析候选基因。

2 结果与分析

2.1 *pl41* 植株表型特征

pl41 株型与‘日本晴’无明显差异, 但植株颜色有明显差别。在苗期, *pl41* 叶鞘、叶尖和叶缘处呈现紫色, 颜色较浅 (图 1A); 从苗期开始, 植株紫色逐渐变深, 抽穗期地上部分组织呈现较深的紫色 (图 1B)。“日本晴”植株在各个时期均表现为绿色 (图 1A、1B)。*pl41* 叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素含量在苗期显著高于‘日本晴’, 在抽穗期显著低于‘日本晴’, 在灌浆期无显著差异;*pl41* 花青素含量在苗期、抽穗期和灌浆期均极显著高于‘日本晴’ (表 1)。花青素含量与叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量的相关系数分别为 -0.936 、 -0.958 和 -0.941 , 均达极显著负相关 ($P<0.01$)。在抽穗期, *pl41* 叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量均低于苗期, 花青素含量高于苗期; 在灌浆期, *pl41* 叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量高于抽穗期, 花青素含量低于抽穗期 (表 1)。

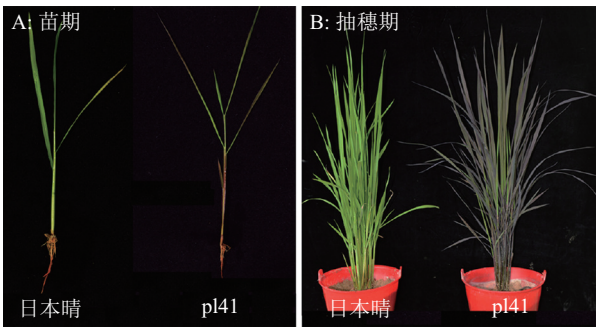


图 1 ‘日本晴’和 *pl41* 植株的表型分析

Fig. 1 Phenotypic analyses of ‘Nipponbare’ and *pl41*

表 1 *pl41* 和 ‘日本晴’ 在 3 个不同发育时期叶绿素、类胡萝卜素及花青素含量比较¹⁾

Tab. 1 Comparisons of chlorophyll, carotenoid and anthocyanin contents between *pl41* and ‘Nipponbare’ at three different developmental stages

生长期	材料	w(mg·g ⁻¹)				花青素相对含量
		叶绿素a	叶绿素b	总叶绿素	类胡萝卜素	
苗期	<i>pl41</i>	5.37±0.52**	1.13±0.10**	6.50±0.62**	2.07±0.19**	2.73±0.07***
	日本晴	4.05±0.06	0.82±0.01	4.87±0.07	1.54±0.02	0.07±0.01
抽穗期	<i>pl41</i>	2.68±0.18**	0.47±0.07**	3.15±0.24**	1.03±0.04**	17.00±0.35***
	日本晴	4.78±0.33	1.30±0.14	6.08±0.47	1.94±0.12	0.08±0.44
灌浆期	<i>pl41</i>	3.20±0.18	0.65±0.04	3.85±0.22	1.65±0.08	10.88±0.43***
	日本晴	3.44±0.19	0.65±0.04	4.09±0.23	1.66±0.08	0.02±0.01

1) “***”和“**”分别表示*pl41*和‘日本晴’相同时期的相同指标在 0.01 和 0.001 水平差异显著(*t* 检验法)

2.2 *pl41* 紫叶性状遗传分析

为了明确 *pl41* 紫叶性状的遗传基础, 本研究对 *pl41* 与 ‘日本晴’ 杂交后代 F₁ 及分离群体 F₂ 的紫叶性状进行了遗传分析。结果表明, F₁ 代植株均表现为绿叶, F₂ 代植株叶片颜色呈现明显的紫色和绿色分离, 绿叶和紫叶单株数分别为 254 和 79 株, 符合 3:1 的分离比 ($\chi^2=0.26, P>0.05$), 表明 *pl41* 紫叶性状受 1 对隐性主效核基因控制。

2.3 *pl41* 的初步定位

为了分离控制 *pl41* 紫叶性状的目标基因

pl41, 我们在 F₂ 代分离群体中选取了 480 株紫叶单株用于 *pl41* 的初步定位研究。利用 127 对在 *pl41* 和 ‘日本晴’ 之间存在多态性的 STS 和 SSR 分子标记引物对 480 株紫叶单株进行连锁分析, 结果表明目标基因 *pl41* 与第 12 号染色体上的分子标记引物 P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7 (表 2) 的序列存在不同程度的连锁, 并且被初步定位于 P3 和 P4 之间 289 kb 的范围内 (图 2)。在此定位区间内, 存在 53 个注释的预测基因, 这些基因编码的蛋白详见表 3。其中, 有 5 个基因可

表 2 *pl41* 初步定位所用引物
Tab. 2 Primers used in preliminary mapping of *pl41*

名称	分子标记类型	正向序列 (5'→3')	反向序列 (5'→3')
P1	SSR	GCTTCCCTTGATACTCTATCT	CCTCTTATCAGACGCACAA
P2	SSR	CTTCTTCCCGTTGTTCCCAA	GTTTGGAGGTGAGCTGGACA
P3	STS	TGGTAAGTAGTACTCTCCCTT	CTTCTGTAAGTCCATTCTGA
P4	STS	TTTAAACATCTCCATTCTCG	GACGAATAGTCAAACAGTGC
P5	STS	TGTTGAATATGCACAAAGAG	TGGTTCATTGGCTTAGGA
P6	STS	TTATCCCCGACCAATCAAC	CAAATTCGCTTGGTATTGAC
P7	STS	TCCAATCATGGAAATACTT	TTGTTTCTTAGAAGCAGAGG

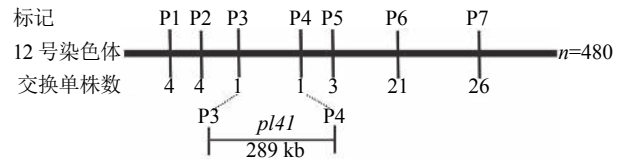


图 2 水稻紫叶基因 *pl41* 在第 12 号染色体上的初步定位
Fig. 2 Preliminary mapping of rice purple leaf gene *pl41* on chromosome 12

能与花青素的合成与转运相关: 1 个 GST 蛋白编码基因 (编号 25)、1 个 MYB 类转录因子蛋白编码基因 (编号 44) 和 3 个 MATE 转运蛋白编码基因 (编号 49、52、53)。对 *pl41* 这 5 个基因的编码区序列进行测序, 并分别与 ‘日本晴’ 序列比对, 发现这 5 个基因的编码区序列与 ‘日本晴’ 无差异。

表 3 定位区间内的基因注释
Tab. 3 Gene annotation in the preliminary mapped region

编号	基因功能注释	基因 ID	编号	基因功能注释	基因 ID
1	DUF567 结构域包含蛋白	LOC_Os12g02720	28	反转座子蛋白	LOC_Os12g03000
2	组氨酸三聚体家族蛋白	LOC_Os12g02730	29	反转座子蛋白	LOC_Os12g03010
3	表达蛋白	LOC_Os12g02750	30	转座子蛋白	LOC_Os12g03020
4	DUF567 结构域包含蛋白	LOC_Os12g02760	31	保守的假定蛋白	LOC_Os12g03030
5	反转座子蛋白	LOC_Os12g02770	32	无顶端分生组织蛋白	LOC_Os12g03040
6	反转座子蛋白	LOC_Os12g02780	33	无顶端分生组织蛋白	LOC_Os12g03050
7	表达蛋白	LOC_Os12g02790	34	表达蛋白	LOC_Os12g03060
8	CRP11-富含半胱氨酸蛋白前体	LOC_Os12g02800	35	FHA 结构域包含蛋白	LOC_Os12g03070
9	蛋白激酶结构域包含蛋白	LOC_Os12g02810	36	rp3 蛋白	LOC_Os12g03080
10	反转座子蛋白	LOC_Os12g02814	37	核糖体蛋白	LOC_Os12g03090
11	胞苷酰基转移酶结构域包含蛋白	LOC_Os12g02820	38	表达蛋白	LOC_Os12g03094
12	SNF7 结构域包含蛋白	LOC_Os12g02830	39	结构域包含蛋白	LOC_Os12g03100
13	ATCHX 蛋白	LOC_Os12g02840	40	ZF-HD 蛋白二聚化结构域包含蛋白	LOC_Os12g03110
14	表达蛋白	LOC_Os12g02850	41	表达蛋白	LOC_Os12g03120
15	反转座子蛋白	LOC_Os12g02860	42	CDC45A-假定的DNA复制起始蛋白	LOC_Os12g03130
16	GRAS 家族转录因子结构域包含蛋白	LOC_Os12g02870	43	表达蛋白	LOC_Os12g03140
17	E2F 相关蛋白	LOC_Os12g02880	44	MYB 类转录因子蛋白	LOC_Os12g03150
18	反转座子蛋白	LOC_Os12g02890	45	转座子蛋白	LOC_Os12g03160
19	反转座子蛋白	LOC_Os12g02900	46	表达蛋白	LOC_Os12g03170
20	糖基转移酶	LOC_Os12g02910	47	Mad3/BUB1 同源蛋白	LOC_Os12g03180
21	表达蛋白	LOC_Os12g02920	48	高丝氨酸脱氢酶	LOC_Os12g03190
22	表达蛋白	LOC_Os12g02930	49	MATE 转运蛋白	LOC_Os12g03200
23	EMB2748 蛋白	LOC_Os12g02950	50	转座子蛋白	LOC_Os12g03210
24	表达蛋白	LOC_Os12g02940	51	表达蛋白	LOC_Os12g03220
25	谷胱甘肽-S-转移酶	LOC_Os12g02960	52	MATE 转运蛋白	LOC_Os12g03230
26	RNA 结合蛋白	LOC_Os12g02970	53	MATE 转运蛋白	LOC_Os12g03240
27	核苷三磷酸酶	LOC_Os12g02980			

3 讨论与结论

水稻紫色性状为明显的标记性状, 在不育系和杂交稻种子纯度的鉴定上具有重要的应用价值, 其性状表现与花青素的合成、转运和累积相关。花青素分布的多样性使得水稻紫色性状表现多样化, 例如有些水稻品种在叶鞘和茎基部表现紫色, 而有些水稻品种只在叶缘、柱头和稃尖等部位呈现紫色。本研究鉴定出来的 *pl41* 植株大部分组织均表现紫色, 带紫色性状的植株与绿色植株区别明显, 而且紫色性状稳定, 不易受季节和环境因素影响, 由此可见, *pl41* 具有较大的应用潜力。

目前, 虽然关于水稻紫色性状已有较深入研究, 但已报道的紫色性状基因多为显性基因, 例如 *OsCl* 和 *PSHI(t)*^[11, 14]。由于显性基因无法区分纯合子和杂合子, 使得无法剔除掉混杂的不育系和假杂种, 所以这类基因一般不能应用于生产实践。因此, 挖掘隐性紫色性状基因, 对于促进其在生产实践上的成功应用具有重要意义。本研究鉴定的 *pl41* 为隐性基因, 定位于第 12 号染色体短臂 289 kb 范围内, 在目前报道的水稻紫叶基因中没有 1 个基因位于该区域, 这表明 *pl41* 可能是 1 个新的隐性紫叶基因。在该定位区间内发现有 5 个基因可能与花青素的合成与转运相关, 包括 1 个 MYB 类转录因子蛋

白编码基因、1 个 GST 蛋白编码基因和 3 个 MATE 蛋白编码基因。在植物中, MYB 类转录因子蛋白调控花青素结构基因的时空表达和花青素的组织分布^[8], 水稻第 6 号染色体上的 1 个 MYB 类转录因子蛋白编码基因 *OsCI* 被发现与叶鞘花青素的累积相关^[11]; GST 和 MATE 蛋白家族基因被发现可能参与花青素向液泡的转运, 例如拟南芥的 *TT19* 基因^[15]、玉米的 *Bronze-2* 基因^[9]和拟南芥的 *TT12* 基因^[16], 就已被证明与花青素的累积相关。通过测序比对分析, 发现这 5 个基因的编码区序列在 *pl41* 与 ‘日本晴’ 之间无差异, 表明它们可能不是 *pl41* 紫叶性状的候选基因, 但也不能完全排除这种可能, 因为导致表型变异的因素除了基因编码区序列差异以外, 基因启动子和增强子区序列的差异也能导致表型变异。因此, 下一步拟检测这 5 个基因在启动子和增强子区的序列差异和转录水平上的表达差异, 预测可能的候选基因。同时也配制了 *pl41* 的大分离群体, 以期通过精细定位为 *pl41* 最终的图位克隆奠定基础。

研究表明, 叶色标记一般全生育期表达, 在影响不育系本身农艺性状的同时, 对繁种和制种产量也有一定负效应。本研究发现, *pl41* 花青素的累积与叶绿素含量的变化呈显著负相关, 这表明 *pl41* 可能对农艺性状尤其是水稻产量性状有一定的影响。由于近等基因系的遗传背景基本一致, 可以最大限度降低遗传背景对目标基因的影响, 因此它是准确分析目标基因对产量性状影响的理想材料。为了更准确地分析 *pl41* 对水稻产量性状的影响、更详细地评估 *pl41* 的应用潜力, 目前正在构建 *pl41* 的近等基因系, 拟利用 *pl41* 的近等基因系来分析 *pl41* 对农艺性状的影响。这些工作将为阐明 *pl41* 对水稻产量性状的影响和评价 *pl41* 的应用潜力奠定坚实的基础。

参考文献:

[1] WU D, SHU Q, XIA Y. *In vitro* mutagenesis induced novel thermo/photoperiod-sensitive genic male sterile indica rice with green-revertible xanthan leaf color marker[J]. Euphytica, 2002, 123(2): 195-202.

[2] 曹立勇, 钱前, 朱旭东, 等. 紫色标记籼型光-温敏核不育系中紫 S 的选育及其配组的杂种优势[J]. 作物学报, 1999, 25(1): 44-49.

[3] 杨腾帮, 许旭明, 张受刚. 具有隐性紫叶标记性状的籼型光敏核不育系明紫 02S 的选育[J]. 福建农业科技,

2005(1): 3-5.

[4] 杨腾帮, 许旭明, 张受刚, 等. 隐性紫叶光温敏核不育水稻明紫 03S 的选育[J]. 福建农业科技, 2005(5): 54-56.

[5] 余显权, 吴平理, 赵福胜, 等. 隐性紫叶水稻的改良及其应用探讨[J]. 贵州农业科学, 2003, 31(3): 3-6.

[6] 向关伦, 黄宗洪, 杨占烈, 等. 水稻不育系紫 IIA 的选育[J]. 种子, 2007, 26(1): 93-95.

[7] 邓国富, 梁世荣, 周萌, 等. 水稻紫红叶标记不育系先红 A 的选育及应用[J]. 中国稻米, 2008(5): 26-28.

[8] XIE D Y, SHARMA S B, WRIGHT E, et al. Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expression of anthocyanidin reductase and the PAP1 MYB transcription factor[J]. Plant J, 2006, 45(6): 895-907.

[9] MARRS K A, ALFENITO M R, LLOYD A M, et al. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*[J]. Nature, 1995, 375(6530): 397-400.

[10] GOODMAN C D, CASATI P, WALBOT V. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*[J]. Plant Cell, 2004, 16(7): 1812-1826.

[11] SAITOH K, ONISHI K, MIKAMI I, et al. Allelic diversification at the *C* (*OsCI*) locus of wild and cultivated rice: Nucleotide changes associated with phenotypes[J]. Genetics, 2004, 168(2): 997-1007.

[12] SAKAMOTO W, OHMORI T, KAGEYAMA K, et al. The *purple leaf* (*pl*) locus of rice: *pl^u* allele has a complex organization and includes two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis[J]. Plant Cell Physiol, 2001, 42(9): 982-991.

[13] MONNA L, LIN H, KOJIMA S, et al. Genetic dissection of a genomic region for a quantitative trait locus, *Hd3*, into two loci, *Hd3a* and *Hd3b*, controlling heading date in rice[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104(5): 772-778.

[14] WANG W Y, DING H F, LI G X, et al. Delimitation of the *PSH1*(t) gene for rice purple leaf sheath to a 23.5 kb DNA fragment[J]. Genome, 2009, 52: 268-274.

[15] KITAMURA S, SHIKAZONO N, TANAKA A. *TRANSPARENT TESTA 19* is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*[J]. Plant J, 2004, 37(1): 104-114.

[16] DEBEAUJON I, PEETERS A J M, LÉON-KLOOSTERZIEL K M, et al. The *TRANSPARENT TESTA12* gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium[J]. Plant Cell, 2001, 13: 853-871.

【责任编辑 李庆玲】