

水稻淡绿叶突变体 *HM133* 的遗传分析与基因定位

施勇烽^{1, #} 贺彦^{1, #} 郭丹¹ 吕向光^{1, 2} 黄奇娜¹ 吴建利^{1, *}

(¹中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室/国家水稻改良中心, 杭州 310006; ²中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081; # 共同第一作者; * 通讯联系人, E-mail: beshangd@163.com)

Genetic Analysis and Gene Mapping of a Pale Green Leaf Mutant *HM133* in Rice

SHI Yong-feng^{1, #}, HE Yan^{1, #}, GUO Dan¹, LV Xiang-guang^{1, 2}, HUANG Qi-na¹, WU Jian-li^{1, *}

(¹ State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; ² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; # These authors contributed equally to this work;

* Corresponding author, E-mail: beshangd@163.com)

SHI Yongfeng, HE Yan, GUO Dan, et al. Genetic analysis and gene mapping of a pale green leaf mutant *HM133* in rice. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(6): 603–610.

Abstract: The pale green leaf mutant *HM133* was identified from an EMS-induced IR64 mutant bank. The contents of photosynthetic pigments including chlorophyll and carotenoid of *HM133* were reduced significantly at 6 weeks and 15 weeks after sowing when compared with IR64. The net photosynthetic rate of *HM133* was considerably lower than that of the wild-type IR64 at heading stage while the stomatal conductance was apparently increased. The agronomic traits including plant height, number of filled grain per panicle and seed-setting rate decreased significantly in the mutant compared with the wild-type. In addition, the mutant exhibited a less number of grana, irregular arrangement of thylakoid layer in the chloroplast at the tillering stage. Genetic and mapping analysis showed that the pale green phenotype was controlled by a single recessive gene located in the long arm of chromosome 3 between SSR markers RM143 and RM3684. The interval contains an ORF *O_sChlD* encoding magnesium-chelatase D subunit. Sequence analysis revealed that the mutant allele carried a nucleotide substitution from G to A in the tenth exon of *O_sChlD*, which led to the substitution of glutamic acid for arginine acid. Therefore, it is deduced that *O_sChlD* is the candidate gene controlling the pale green leaf phenotype of *HM133*.

Key words: *Oryza sativa*; pale green leaf; gene mapping; magnesium-chelatase; photosynthesis

施勇烽, 贺彦, 郭丹, 等. 水稻淡绿叶突变体 *HM133* 的遗传分析与基因定位. 中国水稻科学, 2016, 30(6): 603–610.

摘要: EMS诱导籼稻品种 IR64 获得淡绿叶突变体 *HM133*。与野生型 IR64 相比, *HM133* 播种后的第 6 周和第 15 周的光合色素含量以及抽穗期的净光合速率显著降低, 气孔导度则明显上升; 此外, 突变体株高、每穗实粒数和结实率等农艺性状也较野生型显著下降。叶绿体超微结构分析表明, 分蘖期 *HM133* 类囊体基粒片层形状不规则, 堆叠凌乱、排列疏松。遗传分析表明 *HM133* 淡绿叶性状受单隐性核基因控制。通过分子标记将该基因定位于第 3 染色体长臂 RM143 和 RM3684 之间。该区间内包含编码镁螯合酶 D 亚基的基因 *O_sCHLD*。序列分析表明 *HM133* 中该基因第 10 外显子上有一个从 G 突变为 A 的单碱基变异, 导致编码的氨基酸由精氨酸变成谷氨酸, 推测 *O_sCHLD* 基因即为控制 *HM133* 淡绿叶表型的候选基因。

关键词: 水稻; 淡绿叶; 基因定位; 镁螯合酶; 光合作用

中图分类号: Q343.5; S511.032

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2016)06-0603-08

叶片是植物进行光合作用的主要场所。叶绿体是进行光合作用的重要细胞器, 叶绿体发育异常、光合色素含量改变以及光合作用复合体的稳定性等都会影响植物的光合作用效率。常见的叶色变异大多与光合色素合成与降解, 叶绿体的结构、组成和生理状态异常有关, 通常会导致叶片出现白化、黄

化、淡绿、黄绿和条纹等突变表型。在水稻^[1, 2]、玉米^[3, 4]、大麦^[5]、拟南芥^[6]和油菜^[7]等植物中均有叶色突变体的报道。

目前水稻中已经鉴定了大量的叶色突变体(<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/>), 分别涉及叶绿素代谢、光敏色素代谢以及叶绿体发育异

收稿日期: 2015-12-29; 修改稿收到日期: 2016-03-12。

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2014AA10A603); 浙江省超级稻研究重点实验室项目(2013E10021)。

常。其中,影响叶绿素生物合成途径相关基因的突变是研究报道最为深入的一类。对拟南芥的研究发现叶绿素生物合成途径共包括15步反应,涉及15种酶,并分离了27个编码这些酶的基因^[8]。水稻中目前已克隆多个叶绿素合成途径中相关酶的基因,如 *OsCHLH*、*OsCHLD*、*OsCHLI*、*DVR*、*CAOI*、*CAO2*、*YGL1* 和 *PORB* ^[2,9-14]。另外,四吡咯代谢分支途径即光敏色素合成途径中相关基因的突变也能造成叶色突变,例如水稻亚铁血红素加氧酶基因的变异能反馈作用于叶绿素合成途径,从而使叶绿素的合成发生异常^[15,16]。除了约100个叶绿体基因组自身编码的蛋白外,叶绿体中含有大约3000个由核基因编码的蛋白,相关蛋白的突变会影响叶绿体的正常发育,导致叶色变异、植株发育迟缓等症状,如编码类囊体结合蛋白基因 *ZN* 突变可导致水稻产生斑马叶表型^[17],编码 PPR 蛋白的基因 *YSA* 的突变致使水稻产生白化表型^[18],编码叶绿体 SRP43 蛋白^[19] 和 SRP54 蛋白^[20] 基因的变异均导致水稻叶色变成淡绿色。

本研究利用籼稻 IR64 经 EMS 诱导后筛选获得一份叶色突变体 *HM133*,对其开展表型性状、生理特性等方面的研究,同时对突变基因开展了遗传分析和基因定位,结合测序分析结果推测水稻镁螯合酶 D 亚基基因(*OsCHLD*)是控制 *HM133* 淡绿叶性状的候选基因。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究采用的淡绿叶突变体 *HM133* 是由籼稻品种 IR64 经过 EMS 诱变得到的。经过连续多代自交,该叶色突变性状无论种植于海南陵水或浙江富阳,在温室条件或大田环境下均能稳定遗传。2015 年将该突变体种植于中国水稻研究所富阳实验基地,在成熟期随机选取野生型和突变体各 3 株考查株高、穗长、有效穗数、结实率和千粒重等农艺性状,取平均值进行分析。

1.2 群体构建及遗传分析

以突变体 *HM133* 为母本,分别与正常叶色品种 IR24 和热研 1 号配制杂交组合,观察 F_1 的表型并收获 F_1 单株种子,观察并统计 *HM133*/IR24 的 F_2 群体中正常叶和淡绿叶水稻的株数,用于遗传分析。*HM133*/热研 1 号的 F_2 群体中淡绿叶表型单株用于 DNA 提取和基因定位。

1.3 光合色素含量和光合参数测定

播种后第 6 周和第 15 周分别取野生型和突变体 *HM133* 倒 2 叶样品,称取约 0.3 g,剪成 0.3~0.5 cm 长度的片段,在常温黑暗条件下用 95% 乙醇浸提 48 h,然后用 PerkinElmer 分光光度计分别测定在 470 nm、649 nm 和 665 nm 三个波长处的光吸收值。播种后第 6 周和第 15 周各取 3 株设定生物学重复,参照 Arnon 和 Wellburn 等^[21,22] 的方法计算叶绿素和类胡萝卜素的含量。

于水稻抽穗期利用便携式光合测定仪 LI-6400 (LI-COR, USA) 在晴好天气上午 9:00-11:00,田间测定野生型和突变体 *HM133* 剑叶光合作用指标,光合参数设定参照 Huang 等^[23] 的方法。每株重复 3 次测定,取平均值。

1.4 叶绿体超微结构观察

选取野生型和突变体 *HM133* 分蘖期倒 2 叶叶片切成 1 mm 片段,在 2.5% 戊二醛溶液中抽真空固定。参照 Lv 等^[19] 的方法进行样品制备,于浙江大学农业与生物技术学院用 Tecnai G² F20 S-TWIN 型透射电子显微镜(FEI, USA)观察叶绿体超微结构。

1.5 基因定位

采用简易法提取亲本和单株 DNA^[24],分别取 *HM133*/热研 1 号 F_2 群体正常叶和淡绿叶叶单株各 10 株,以等量叶片构建野生型 DNA 池和突变体 DNA 池。利用水稻 12 条染色体上 172 对 SSR 标记,对亲本 *HM133* 和热研 1 号间进行多态性标记筛选,再将筛选到的标记用于野生型池和突变体池间的多态性分析,找到两池间有多态的标记,用于 F_2 群体中淡绿叶单株的基因型分析,初步确定突变基因的位置。从 Gramene 数据库(<http://www.gramene.org/>)下载 SSR 标记引物序列,由上海生工生物工程有限公司进行合成。参照 Shi 等^[25] 的方法进行 PCR 和产物检测。

1.6 候选基因 *OsChlD* 的测序和验证

利用水稻基因组信息注释系统(<http://rice.plantbiology.msu.edu>),查询目标区间内的基因。根据 *OsChlD* 基因的 cDNA 序列设计引物(正向引物 5'-TCTCTCCCTCCCCTCCCATG-3',反向引物 5'-GCTCTCCAGGATCACGAAGTCT-3'),并对 *HM133*、IR64 和 IR24 进行 PCR,由铂尚生物技术(上海)有限公司进行测序。

根据测序结果的比对,找到突变位点,在突变位

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1. Primers used in real-time PCR.

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
Gene	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
<i>OsChlD</i>	GGAAAGAGAGGGCATTAG	CAATACGATCAAGTAAGTGTT
<i>OsChlI</i>	AGTAACCTTGGTGCTGTG	AATCCATCAACATTCAACTCTG
<i>OsChlH</i>	CTATACATTCGCCACACT	TATCACACAACCTCCCAAG
<i>HEMA1</i>	CGCTATTTCTGATGCTATGGGT	TCTTGGGTGATGATTGTTTGG
<i>PORA</i>	TGTACTGGAGCTGGAACAACAA	GAGCACAGCAAAATCCTAGACG
<i>CAOI</i>	GATCCATACCCGATCGACAT	CGAGAGACATCCGGTAGAGC
<i>Cab1R</i>	AGATGGGTTTAGTGCGACGAG	TTTGGGATCGAGGGAGTATTT
<i>Cab2R</i>	TGTTCTCCATGTTTCGGCTTCT	GCTACGGTCCCCACTTCACT
<i>psaA</i>	GCGAGCAAATAAAACACCTTTC	GTACCAGCTTAACGTGGGGAG
<i>psbA</i>	CCCTCATTAGCAGATTCGTTTT	ATGATTGTATTCCAGGCAGAGC
<i>rbcL</i>	CTTGCGCAGATTCCGAGTAA	ACAACGGGCTCGATGTGATA
<i>rbcS</i>	TCCGCTGAGTTTTGGCTATTT	GGACTTGAGCCCTGGAAGG
<i>YGL1</i>	CAGTCTCCAATGGCCACCT	TGCTTTCATCAGTGGCTGG
<i>SPP</i>	CGGAGAGGAAACATAATGAC	ATAGGCATTTGTCTTTGTCTC
<i>PPR1</i>	CTAAGACCGAATGACAAATGC	GCACTGCCAACAAGAATACC
<i>DVR</i>	CGAGCCCAGGTTTCATCAAGGTGC	CCTCCCATCTTGCCGAACCTCC
<i>Ubiquitin</i>	GCTCCGTGGCGGTATCAT	CGGCAGTTGACAGCCCTAG

点附近根据 *OsChlD* 基因组序列设计引物(正向引物 5'-TGCTTGGCACCTTTATCACA-3', 反向引物 5'-GCCATTCTTTTGGCTCTCAT-3'), 对 HM133、IR24 及其 F₂ 单株进行 DNA 扩增, 扩增产物用限制性内切酶 *Taq* I 进行酶切验证。

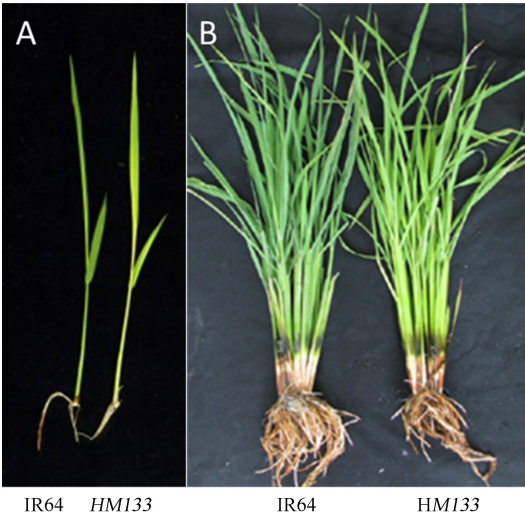
1.7 RNA 提取和 RT-PCR

采用 Trizol 法提取 IR64 与淡绿叶突变体 HM133 分蘖期倒 2 叶的总 RNA, 利用 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 试剂盒(TOYOBO, 日本)将 RNA 反转录为 cDNA。采用 SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (TliRNaseH Plus) 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 和 Thermal Cycle Dice® Real Time System(TaKaRa, 日本)进行实时定量 PCR, 分析叶绿素合成与代谢途径中相关基因的表达情况。以水稻 *Ubiquitin* 为内参基因, 相关基因的特异性引物见表 1。

2 结果与分析

2.1 HM133 的表型及主要农艺性状

突变体 HM133 叶色在苗期、分蘖期均表现为淡绿色(图 1), 该表型伴随整个生育期。突变体 HM133 的主要农艺性状如有效穗数、穗长和千粒重与野生型相比未发生明显变化, 但结实率、株高和每穗实粒数均显著低于野生型(表 2)。



A—野生型 IR64 和突变体 HM133 幼苗表型; B—野生型 IR64 和突变体 HM133 分蘖期的表型。

A, Phenotype of the wide type IR64 and the mutant HM133 at the seedling stage; B, Phenotype of the wide type IR64 and the mutant HM133 at the tillering stage.

图 1 野生型 IR64 和突变体 HM133 的不同时期植株表型
Fig. 1. Phenotype of the wide-type IR64 and the mutant HM133 at different growth stages.

2.2 HM133 的光合色素含量和光合参数

在播种后第 6 周和第 15 周分别测定了突变体和野生型叶绿素和类胡萝卜素含量。第 6 周和第

表 2 野生型 IR64 和突变体 HMI33 的主要农艺性状

Table 2. Agronomic traits of the wild-type IR64 and mutant HMI33.

材料 Material	株高 Plant height /cm	有效穗数 No. of productive panicles	穗长 Panicle length /cm	每穗实粒数 Number of filled grains per panicle	结实率 Seed-setting rate/%	千粒重 1000-grain weight/g
IR64	113.0±1.7	14.0±1.0	25.0±1.4	81.2±7.1	74.6±1.6	27.52±0.38
HMI33	108.7±0.6*	12.7±2.1	24.9±0.3	62.9±7.3*	68.8±2.1*	28.35±0.35

* HMI33 与 IR64 在 0.05 水平上差异显著。
* Significant difference between IR64 and HMI33 at 0.05 level.

表 3 不同生长时期 HMI33 与 IR64 叶片光合色素含量的比较

Table 3. Comparison of photosynthetic pigment contents between HMI33 and IR64 at different growth stages. mg/g

取样时间 Sampling time	材料 Material	叶绿素 a Chlorophyll a content	叶绿素 b Chlorophyll b content	总叶绿素 Total chlorophyll content	类胡萝卜素 Carotenoid content
播种后 6 周 6 weeks after sowing	IR64	3.76±0.57	1.00±0.14	4.78±0.67	0.85±0.19
	HMI33	2.11±0.06**	0.46±0.04**	2.58±0.03**	0.52±0.10*
播种后 15 周 15 weeks after sowing	IR64	2.86±0.29	0.88±0.13	3.77±0.42	0.63±0.04
	HMI33	1.54±0.08**	0.42±0.03**	1.97±0.12**	0.33±0.01**

* HMI33 与 IR64 在 0.05 水平上差异显著; ** HMI33 与 IR64 在 0.01 水平上差异显著。
* Significant difference between IR64 and HMI33 at 0.05 level; ** Significant difference between IR64 and HMI33 at 0.01 level.

表 4 抽穗期野生型 IR64 和突变体 HMI33 的剑叶光合特性

Table 4. Photosynthetic parameters of flag leaf of IR64 and HMI33 at the heading stage.

材料 Material	净光合速率 $P_n/(\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$	气孔导度 $G_s/(\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$	胞间 CO ₂ 浓度 $C_i/(\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1})$	蒸腾速率 $T_r/(\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$
IR64	14.45±1.78	0.57±0.13	309.13±7.30	4.12±0.64
HMI33	12.74±1.38*	0.73±0.09*	313.75±6.41	4.26±0.25

* HMI33 与 IR64 在 0.05 水平上差异显著。
* Difference between IR64 and HMI33 was significant at 0.05 level.

15 周时突变体的总叶绿素含量与野生型相比分别下降了 46.0% 和 47.7%，胡萝卜素含量下降了 38.8% 和 47.6%，两个时期 HMI33 的总叶绿素含量、叶绿素 a 和叶绿素 b 含量与野生型相比均存在极显著差异(表 3)。

为分析突变体光合色素含量的降低对光合作用的影响,抽穗期对 IR64 和 HMI33 的光合参数进行测定,发现突变体的净光合速率降低了 11.8%，气孔导度上升了 26.3%，而胞间 CO₂ 浓度和蒸腾速率没有显著差异(表 4)。

2.3 叶绿体超微结构观察

分蘖期分别对野生型和淡绿叶突变体 HMI33 叶片进行叶绿体结构的电镜观察。结果显示野生型 IR64 的叶绿体基质浓密、基粒片层堆叠较厚、排列紧密(图 2-A、B),而 HMI33 的基粒数量明显减少,基粒片层形状不规则,片层堆叠较少、排列疏松(图

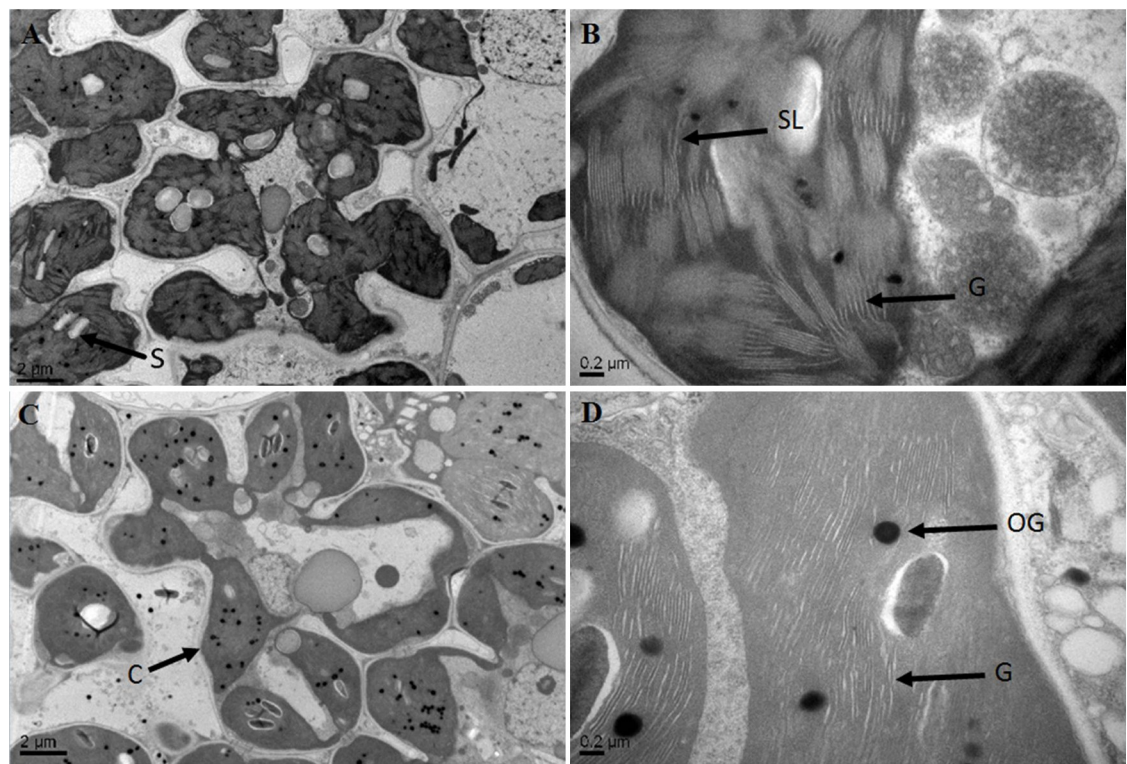
2-C、D)。结果表明 HMI33 叶绿体的发育受到了严重影响。

2.4 HMI33 的遗传分析

以 HMI33 为母本, IR24 为父本构建了 HMI33/IR24 群体进行遗传分析,考查 F₁ 植株和 F₂ 群体的叶片性状。F₁ 植株表现为正常叶色, F₂ 群体共 2382 株, 其中 1787 株表现为正常绿叶表型, 595 株表现为淡绿叶表型, 分离比符合 3 : 1 ($\chi^2 < \chi^2_{0.05} = 3.84$)。遗传分析结果表明 HMI33 淡绿叶性状受单隐性核基因控制, 将该基因暂时命名为 *pgl^{HMI33}*。

2.5 *pgl^{HMI33}* 基因定位及其候选基因预测

HMI33/热研 1 号的 F₂ 群体中 85 株淡绿叶单株作为定位群体, 并采用分池法构建了淡绿叶和正常叶色 DNA 池各 1 个。选用分布于 12 条染色体上的 172 对 SSR 标记, 对 HMI33 和热研 1 号进行



A 和 B—野生型 IR64；C 和 D—突变体 HM133。S—淀粉粒；C—叶绿体；G—基粒；SL—基质片层；OG—嗜饿颗粒。
A and B, IR64；C and D, HM133. S, Starch granule；C, Chloroplast；G, Granum；SL, Stroma lamella；OG, Osmiophilic granule.

图 2 野生型 IR64 和突变体 HM133 的叶绿体超微结构
Fig. 2. Chloroplast ultrastructure of IR64 and HM133.

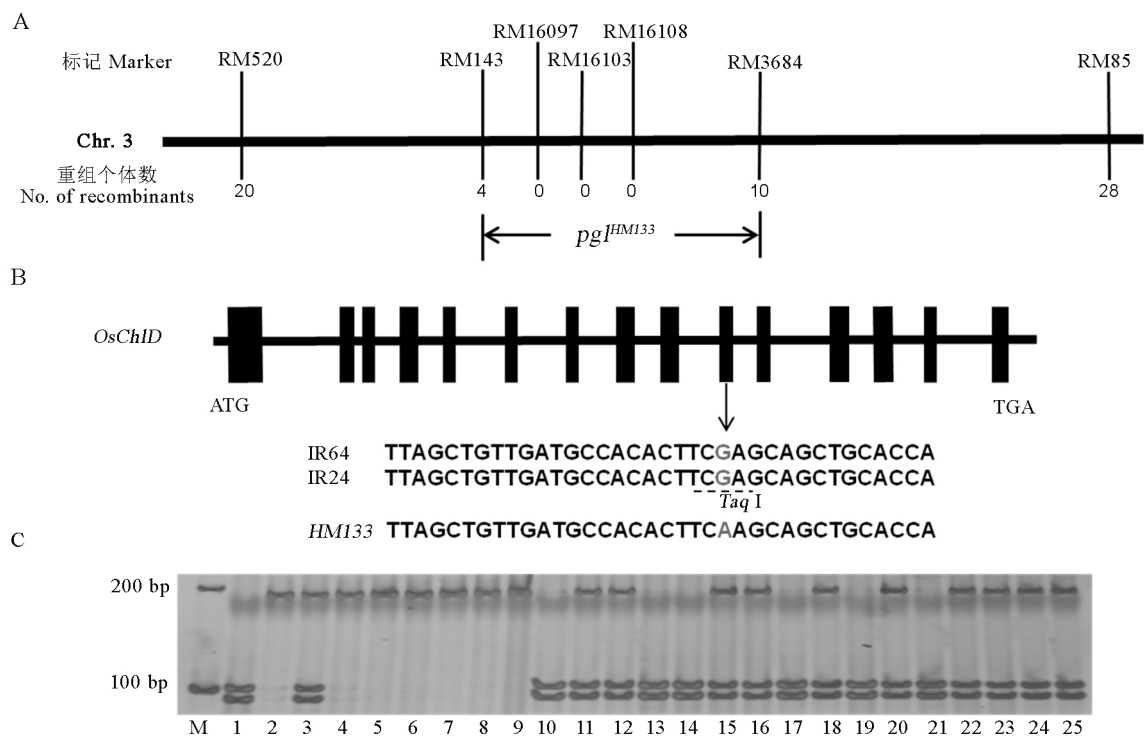
多态性标记的筛选,获得的 128 对多态性标记用于淡绿叶与正常绿叶 DNA 池的多态性分析,其中第 3 条染色体上 RM520、RM85 和 RM143 表现 DNA 池的多态。进一步用这 3 个标记分析 F₂ 群体的 85 株淡绿叶单株,分别检测到 20 株、28 株和 4 株重组个体,其中 RM143 与标记基因紧密连锁。为更准确定位该基因,根据已经公布的 SSR 引物在 RM143 附近找到 RM16108、RM16103、RM16097 和 RM3684 在亲本间有多态的标记,进一步分析发现仅标记 RM3684 检测到 10 株重组个体,其他 3 个标记均无交换发生,最终将该基因定位于第 3 染色体的长臂 RM3684 和 RM143 之间,物理距离约为 3.1 Mb(图 3-A)。

通过水稻基因组信息注释系统 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 查询 *pgl*^{HM133} 目标区间内有超过 200 个候选基因,区间中包含已被 Zhang 等^[10] 注释为 *OsChlD* 基因(登录号为 LOC_Os03g59640)。*OsChlD* 编码镁螯合酶 D 亚基,参

与叶绿素合成过程,对叶绿体发育具有重要作用。序列分析表明,IR64 与 IR24 的 *OsChlD* 基因 cDNA 序列一致,而突变体 HM133 的第 10 外显子上存在一个单碱基突变,由 G 突变为 A(图 3-B),对应的氨基酸由精氨酸变为谷氨酸。该位点突变影响了限制性内切酶 *Taq* I 的特异性识别,用 IR24/HM133 的亲本、F₁ 和 F₂ 群体进行验证,通过 DNA 扩增获得包含突变位点约 193 bp 大小片段,用 *Taq* I 酶切后发现 F₂ 中淡绿叶单株和 HM133 的扩增片段不能被 *Taq* I 酶切,而 IR24 能被 *Taq* I 完全酶切,F₁ 则被部分酶切,F₂ 中正常叶单株有部分酶切和完全酶切两种情况(图 3-C)。这一结果表明突变体 HM133 的淡绿叶表型可能是由 *OsChlD* 基因的单碱基替换导致。

2.6 叶绿素合成和叶绿体发育相关基因的表达

利用实时荧光定量 PCR 比较 HM133 及其野生型 IR64 中 *OsChlD* 基因和其他叶绿素合成、叶绿体发育相关基因的表达情况。结果表明,与野生型



A— pgl^{HMI33} 初步定位；B—候选基因 *OsChlD* 序列分析。灰色部分表示 *HMI33* 的 1541 位碱基 G 突变为 A；C—IR24/*HMI33* F_2 群体的 *Taq* I 酶切验证。M—分子量标记；1—IR24；2—*HMI33*；3— F_1 ；4—9— F_2 中淡绿叶单株；10—25— F_2 群体中正常叶单株。

A, Primary mapping of ygI^{HMI33} on chromosome 3; B, Sequence analysis of the candidate gene *OsChlD*. The gray letters indicate single base substitution from G to A at position 1541; C, Mutation base of *OsChlD* confirmed with *Taq* I restriction enzyme digestion. M, Molecular marker; 1, IR24; 2, *HMI33*; 3, F_1 ; 4–9, Pale green plant of F_2 ; 10–25, Normal plant of F_2 .

图 3 pgl^{HMI33} 定位及候选基因预测

Fig. 3. Location of pgl^{HMI33} and candidate gene prediction.

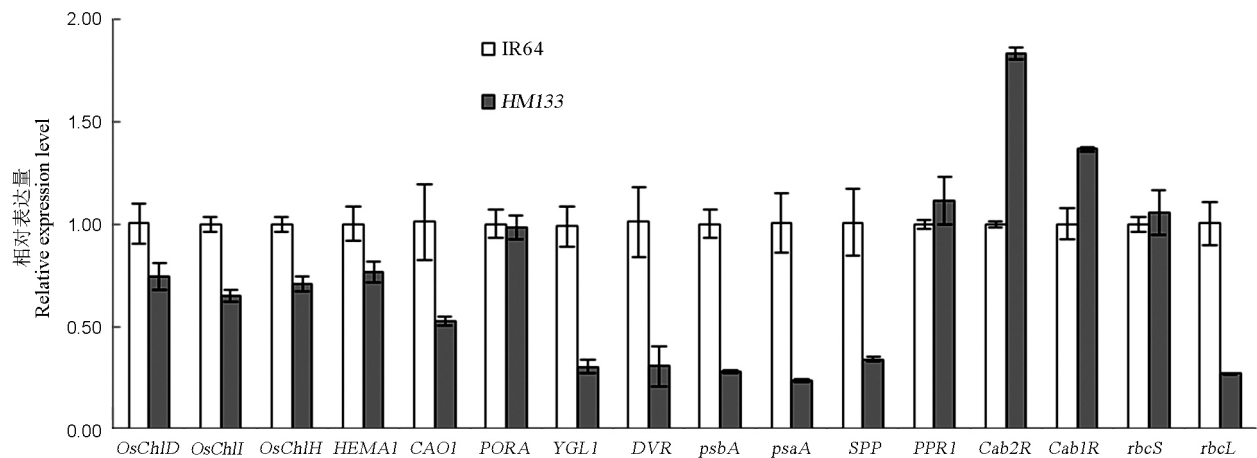


图 4 RT-PCR 分析野生型 IR64 与 *HMI33* 中叶绿素合成、叶绿体发育相关基因的表达

Fig. 4. Expression of genes associated with chlorophyll biosynthesis and chloroplast development in IR64 and *HMI33* by real-time PCR.

相比,突变体中编码镁螯合酶亚基的 *OsChlD*、*OsChlI* 和 *OsChlH* 的表达量明显下降,叶绿素合成相关基因 *HEMA1* (谷氨酰 t-RNA 还原酶)、*YGL1* (叶绿素合成酶)、*DVR* (联乙烯还原酶)和 *CAO1* (叶绿素酸酯氧化酶)的表达量也显著下降;叶绿体发育相关的 *psbA* (D1 蛋白)、*psaA* (光合系统 I 叶绿素脱辅基蛋白)、*rbcL* (RUBP 羧化酶大亚基)、*SPP* (基质加工肽酶)表达显著下调,而 *Cab1R* 和 *Cab2R* (捕

光叶绿素 a/b 结合蛋白)表达量显著上升; *PORA* (原叶绿素酸酯氧化还原酶)、*rbcS* (RUBP 羧化酶小亚基)、*PPR1* (三角状五肽重复蛋白)的表达并没有显著变化(图 4)。上述结果表明, *OsChlD* 的变异导致与叶绿素合成以及叶绿体发育相关的众多基因的表达发生明显改变。

3 讨论

植物中叶绿素的累积使叶片呈现绿色,叶绿素的生物合成需要包括镁螯合酶在内的 15 种酶的参与。镁螯合酶是由 D、I 和 H 三亚基组成的复合体,四吡咯化合物原卟啉 IX 在镁螯合酶催化下与镁离子螯合形成镁原卟啉 IX^[26]。植物叶色突变体中已鉴定了一些镁螯合酶的突变体,大麦的突变体 *xantha-g*⁴⁴ 和 *xantha-g*⁴⁵ 是由于编码镁螯合酶 D 亚基突变造成叶绿素合成受阻,分别产生黄叶和黄绿叶表型^[5],拟南芥 T-DNA 插入突变体 *AtchlD-KO* 存在白化致死表型,水稻中突变体 *Chlorina-1* 和 *ysl7* 在 D 亚基基因的不同位点发生突变, *ysl7* 在整个生育期均表现为黄绿叶, *Chlorina-1* 仅幼苗期的前 2~3 周出现黄绿叶表型^[10,13]。玉米镁螯合酶 I 亚基突变体 *Oyl* 为半显性突变体,表现为黄化致死^[4],水稻和拟南芥的 I 亚基突变体则均表现为黄绿叶^[6,10]。拟南芥和水稻镁螯合酶 H 亚基的突变体分别产生浅绿和黄绿叶表型^[2,6]。

本研究中的淡绿叶突变体 *HM133* 是 EMS 诱变籼稻 IR64 获得,其叶绿素含量明显低于野生型 IR64,灌浆期净光合速率明显下降,类囊体发育异常,遗传分析表明 *HM133* 淡绿叶性状受单隐性核基因控制。通过分子标记将 *pgl*^{*HM133*} 基因定位于第 3 染色体长臂 RM143 和 RM3684 之间,区间内包含编码镁螯合酶 D 亚基基因 *OsChlD*,序列分析发现 *HM133* 中 *OsChlD* 基因第 10 外显子上存在 G 突变为 A 的单碱基变异,与已报道了另 4 个 *OsChlD* 等位基因 *ChlI*^[10]、*ysl98*^[27]、*ysl3*^[28] 和 *ysl7*^[13] 突变位点均不同,是一个新的 *OsChlD* 等位基因。这 5 个 *OsChlD* 突变体的表型不完全相同,可能由于不同的突变蛋白引起,也可能是受到遗传背景的影响。*ysl7* 在日本晴背景下产生黄化叶,而在 810S 背景下则表现为黄绿叶^[13],表明 *OsChlD* 控制叶色表型的机理非常复杂,受到遗传背景的影响。Deng 等^[13] 研究表明, *ysl7* 在 810S 遗传背景下, *OsChlD*、*OsChlI* 和 *OsChlH* 的表达显著上升,在日本

晴背景下的 *ysl7-NIL* 则与野生型的表达基本相同。本研究发现突变体中 *OsChlD*、*OsChlI* 和 *OsChlH* 的表达量较野生型显著下降,该结果与 Deng 等^[13] 的结果不同,可能与遗传背景的差异有关,也可能是突变位点的不同引起的。突变体 *HM133* 中核基因编码的 *HEMA1*、*YGL1*、*DVR*、*CAO1* 和叶绿体编码基因 *PsaA*、*PsbA*、*rbcL* 的表达量呈显著下降,而核基因编码的 *Cab1R* 和 *Cab2R* 的表达呈显著上升,表明 *OsChlD* 基因突变同样影响了其他叶绿素合成酶基因和叶绿体发育相关基因的表达。Deng 等^[13] 研究发现 *OsChlD* 突变蛋白 *ysl7*,能行使部分 *OsChlD* 功能,能促进光合作用和光能的高效利用,结实率等性状与野生型无明显差异。而本研究中突变体的净光合速率显著降低,株高、结实率和每穗实粒数也显著低于野生型,可能是由于 *OsChlD* 突变位点不同造成相应突变蛋白功能差异。另外,豌豆中 *ChlD* 亚基基因沉默植株中发现活性氧物质的积累^[29],水稻中 D 亚基突变体是否存在同样的现象仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李智强,朱丹,王志龙,等. 水稻黄绿叶突变体 *djyg* 的遗传分析与基因定位. 中国水稻科学, 2015, 29: 601-609.
Li Z Q, Zhu D, Wang Z L, et al. Genetic analysis and gene mapping of a yellow-green leaf mutant *djyg* in rice. *Chin J Rice Sci*, 2015, 29: 601-609. (in Chinese with English abstract)
- [2] Jung K H, Hur J, Ryu C H, et al. Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the T-DNA gene-trap system. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 463-472.
- [3] 韩帅,王立静,钟世宜,等. 一个新的玉米叶色突变体的遗传分析及基因定位. 玉米科学, 2012, 20: 26-28.
Han S, Wang L J, Zhong S Y, et al. Genetic analysis and gene mapping of a new leaf color mutant in maize. *J Maize Sci*, 2012, 20: 26-28. (in Chinese with English abstract)
- [4] Sawers R J, Viney J, Farmer P R, et al. The maize *Oil yellow1* (*Oyl*) gene encodes the I subunit of magnesium chelatase. *Plant Mol Biol*, 2006, 60: 95-106.
- [5] Axelsson E, Lundqvist J, Sawicki A, et al. Recessiveness and dominance in barley mutants deficient in Mg-chelatase subunit D, an AAA protein involved in chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell*, 2006, 18: 3606-3616.
- [6] Mochizuki N, Brusslan J A, Larkin R, et al. *Arabidopsis genomes uncoupled 5* (*GUN5*) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 2053-2058.
- [7] 肖华贵,杨焕文,饶勇,等. 甘蓝型油菜黄化突变体的叶绿体

- 超微结构、气孔特征参数及光合特性. 中国农业科学, 2013, 46: 715-727.
- Xiao H G, Yang H W, Rao Y, et al. Analysis of chloroplast ultrastructure, stomatal characteristic parameters and photosynthetic characteristics of chlorophyll-reduced mutant in *Brassica napus* L. *Sci Agric Sin*, 2013, 46: 715-727. (in Chinese with English abstract)
- [8] Beale S I. Green genes gleaned. *Trends Plant Sci*, 2005, 10: 309-312.
- [9] Lee S, Kim J H, Yoo E S, et al. Differential regulation of chlorophyll a oxygenase genes in rice. *Plant Mol Biol*, 2005, 57: 805-818.
- [10] Zhang H, Li J, Yoo J H, et al. 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.
- [11] Wu Z, Zhang X, He B, et al. A chlorophyll-deficient rice mutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiol*, 2007, 145: 29-40.
- [12] Wang P, Gao J, Wan C, et al. Divinyl chlorophyll(ide) a can be converted to monovinyl chlorophyll(ide) a by a divinyl reductase in rice. *Plant Physiol*, 2010, 153: 994-1003.
- [13] Deng X J, Zhang H Q, Wang Y, et al. Mapped clone and functional analysis of leaf-color gene *Ygl7* in a rice hybrid (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *PLoS One*, 2014, 9(6): e99564.
- [14] Sakuraba Y, Rahman M L, Cho S H, et al. The rice faded green leaf locus encodes protochlorophyllide oxidoreductase B and is essential for chlorophyll synthesis under high light conditions. *Plant J*, 2013, 74: 122-133.
- [15] Li Q Z, Zhu F Y, Gao X, et al. Young Leaf Chlorosis 2 encodes the stroma-localized heme oxygenase 2 which is required for normal tetrapyrrole biosynthesis in rice. *Planta*, 2014, 240: 701-712.
- [16] Chen H, Cheng Z, Ma X, et al. A knockdown mutation of *YELLOW-GREEN LEAF2* blocks chlorophyll biosynthesis in rice. *Plant Cell Rep*, 2013, 32: 1855-1867.
- [17] Li J, Pandeya D, Nath K, et al. *ZEBRA-NECROSIS*, a thylakoid-bound protein, is critical for the photoprotection of developing chloroplasts during early leaf development. *Plant J*, 2010, 62: 713-725.
- [18] Su N, Hu M L, Wu D X, et al. Disruption of a rice pentatricopeptide repeat protein causes a seedling-specific albino phenotype and its utilization to enhance seed purity in hybrid rice production. *Plant Physiol*, 2012, 159: 227-238.
- [19] Lv X G, Shi Y F, Xu X, et al. *Oryza sativa* chloroplast signal recognition particle 43 (OscpSRP43) is required for chloroplast development and photosynthesis. *PLoS ONE*, 2015, 10(11): e143249.
- [20] Zhang F, Luo X, Hu B, et al. *YGL138(t)*, encoding a putative signal recognition particle 54 kDa protein, is involved in chloroplast development of rice. *Rice*, 2013, 6(1): 7.
- [21] Wellburn A R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol*, 1994, 144: 307-313.
- [22] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1-15.
- [23] Huang Q N, Shi Y F, Zhang X B, et al. Single base substitution in *OsCDC48* is responsible for premature senescence and death phenotype in rice. *J Integr Plant Biol*, 2016, 58: 12-28.
- [24] 卢扬江, 郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法. 中国水稻科学, 1992, 6(1): 47-48.
- Lu Y J, Zheng K L. A simple method for isolation of rice DNA. *Chin J Rice Sci*, 1992, 6(1): 47-48. (in Chinese with English abstract)
- [25] Shi Y F, Chen J, Liu W Q, et al. Genetic analysis and gene mapping of a new rolled-leaf mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Sci China C Life Sci*, 2009, 52: 885-890.
- [26] Masuda T. Recent overview of the Mg branch of the tetrapyrrole biosynthesis leading to chlorophylls. *Photosynth Res*, 2008, 96: 121-143.
- [27] 孙小秋, 王兵, 肖云华, 等. 水稻 *yg198* 黄绿叶突变基因的精细定位与遗传分析. 作物学报, 2011, 37(6): 991-997.
- Sun X Q, Wang B, Xiao Y H, et al. Genetic analysis and fine-mapping of *yg198* yellow-green leaf gene in rice. *Acta Agron Sin*, 2011, 37(6): 991-997. (in Chinese with English abstract).
- [28] Tian X Q, Ling Y H, Fang L K, et al. Gene cloning and functional analysis of yellow green leaf3 (*yg13*) gene during the whole-plant growth stage in rice. *Genes & Genom*, 2013, 35: 87-93.
- [29] Luo T, Luo S, Araujo W L, et al. Virus-induced gene silencing of pea CHLI and CHLD affects tetrapyrrole biosynthesis, chloroplast development and the primary metabolic network. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 65: 17-26.