

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.00991

## 水稻 *yg198* 黄绿叶突变基因的精细定位与遗传分析

孙小秋<sup>1</sup> 王 兵<sup>1</sup> 肖云华<sup>1</sup> 万春美<sup>1</sup> 邓晓建<sup>2</sup> 王平荣<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>四川农业大学水稻研究所, 四川成都 611130; <sup>2</sup>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 EMS 诱变获得 1 份遗传稳定的水稻黄绿叶突变体 *yg198*, 该突变体整个生育期呈黄绿色。与野生型相比, 突变体的叶绿素和类胡萝卜素含量分别下降 45.3% 和 45.6%, 有效穗数和结实率分别减少 14.4% 和 10.7%, 株高降低 7.4%。透射电镜观察表明, *yg198* 突变体的叶绿体形状不规则, 叶绿体中有许多空的囊泡状结构, 类囊体数目减少, 每个基粒仅由少数几个类囊体垛叠而成。遗传分析表明, *yg198* 的突变性状由 1 对隐性核基因控制。利用(*yg198*/浙辐 802) F<sub>2</sub> 作为定位群体, 将突变基因定位在第 3 染色体长臂 InDel 标记 I3 和 I4 之间, 遗传距离分别为 0.07 cM 和 0.19 cM, 两标记之间的物理距离约为 44.2 kb, 此区间内包含 8 个预测基因。基因组序列分析发现, *yg198* 突变体在编码镁离子螯合酶 ChlD 亚基的 *OsChlD* 基因编码区第 1 522 碱基处(位于第 10 外显子), 碱基 G 突变为碱基 A, 从而造成编码蛋白序列第 508 位的丙氨酸(Ala)突变成苏氨酸(Thr)。该基因是已报道的水稻黄绿叶基因 *Chlorina-1* 的等位基因, 但突变体表型有明显区别, *Chlorina-1* 突变体在 2~3 周龄幼苗时开始出现黄绿叶, 且该黄绿叶性状仅在苗期表现, 而 *yg198* 突变体整个生育期都表现为黄绿叶, 这可能是 *OsChlD* 基因组序列的突变位点不同造成的。

**关键词:** 水稻; 黄绿叶突变体; *OsChlD*; 遗传分析; 精细定位

## Genetic Analysis and Fine-mapping of *yg198* Yellow-green Leaf Gene in Rice

SUN Xiao-Qiu<sup>1</sup>, WANG Bing<sup>1</sup>, XIAO Yun-Hua<sup>1</sup>, WAN Chun-Mei<sup>1</sup>, DENG Xiao-Jian<sup>2</sup>, and WANG Ping-Rong<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Southwest Crop Genetic Resources and Improvement, Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

**Abstract:** A yellow-green leaf mutant *yg198* was isolated by chemistry mutagenesis. The whole plant of the mutant exhibited yellow-green trait throughout the growing period. Compared to its wild-type parent 10079, the contents of chlorophyll and carotenoid decreased by 45.3% and 45.6%; and at maturity, the number of productive panicles per plant, seed setting rate and plant height reduced by 14.4%, 10.7%, and 7.4%, respectively. The result of electron microscopic observation revealed that the chloroplasts in the *yg198* mutant were out-of-shape. A lot of cystic structures and poor thylakoids were observed in the chloroplasts of the *yg198* mutant, and grana stacks appeared to be less dense compared to those of the wild type. Genetic analysis showed that the yellow-green leaf trait of the *yg198* mutant was controlled by one pair of recessive nuclear genes. Genetic mapping of the mutant gene was conducted using 771 yellow-green leaf individuals from the F<sub>2</sub> mapping population of *yg198*/Zhifu 802. Finally, the mutant gene was mapped between InDel markers I3 and I4 on the long arm of chromosome 3, with genetic distances of 0.07 and 0.19 cM, respectively, and with physical distance of 44.2 kb, in which eight predicted genes had been annotated. Sequencing analysis of these candidate genes between the mutant and its wild-type revealed the single base change (G1522A) of the gene for magnesium-chelatase ChlD subunit resulted in a missense mutation (A508T) in the encoded product. The same gene mutation caused by *OsChlD* (*Chlorina-1*) was documented previously. The *Chlorina-1* mutant displays a severe yellowish-green leaf phenotype only at the seedling stage, and the abnormal leaf color is first observed on the leaves of 2- to 3-week-old seedlings, while the *yg198* mutant exhibits yellow-green trait throughout the growing period. The different phenotypes of the two mutants may be caused by different mutational sites of *OsChlD* genomic sequence.

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

植物叶色是叶绿体中各种色素的综合表现, 正常叶片中叶绿素占优势, 通常表现为绿色<sup>[1]</sup>。叶色变异是高等植物中突变频率较高且易于鉴定的突变性状, 早在 20 世纪 30 年代就有报道<sup>[2]</sup>, 迄今已经在水

本研究由国家自然科学基金项目(31071402)和国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08009-072B)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 王平荣, E-mail: pingrong\_wang@yahoo.com.cn

第一作者联系方式: E-mail: haikuba2@163.com

Received(收稿日期): 2010-12-09; Accepted(接受日期): 2011-03-06.

稻<sup>[3]</sup>、大豆<sup>[4]</sup>、玉米<sup>[5]</sup>、大麦<sup>[6]</sup>、小麦<sup>[7]</sup>、番茄<sup>[8]</sup>、油菜<sup>[9]</sup>、拟南芥<sup>[10]</sup>等几乎所有高等植物中发现了叶色突变体。叶色突变体主要表现出白化、黄化、浅绿、条纹、斑点等症状,其光合效率降低,生长迟缓,有的甚至会导致植株死亡<sup>[11-13]</sup>。近年来,叶色突变体的利用价值越来越受到关注,已广泛应用于植物光合作用机制、叶绿素生物合成途径、叶绿体的结构和遗传发育调控机制、作物标记性状等基础研究<sup>[14-15]</sup>和生产应用。

水稻叶色突变类型丰富,除第12染色体外,在其他染色体上均发现了能引起叶色突变的基因,累计已有80余个(<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/genes/traitGeneClasses.jsp>)。叶色突变的机制主要包括叶绿素生物合成途径相关基因突变、血红素生物合成途径中的基因突变、编码其他叶绿体蛋白的基因突变及与光合系统无直接关系的基因突变等。其中,叶绿素生物合成从谷氨酰-tRNA到叶绿素a,叶绿素a再经叶绿素酸酯a加氧酶氧化形成叶绿素b,整个生物合成过程需要15步反应<sup>[16]</sup>。目前,在以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为代表的被子植物中,控制叶绿素生物合成所有15步反应的酶基因都已成功克隆<sup>[17-18]</sup>。拟南芥全基因组分析表明,其叶绿素生物合成从谷氨酰-tRNA到Chl b需要15种酶,编码这些酶的基因有27个<sup>[17]</sup>。水稻作为单子叶模式植物,迄今已克隆了编码参与叶绿素生物合成的4个酶的7个基因,分别是编码Mg<sup>2+</sup>-螯合酶3个亚基的*OsChlH*、*OsChlD*和*OsChlI*基因<sup>[11,13]</sup>,编码叶绿素合酶的*YGL1*基因<sup>[19]</sup>,编码叶绿素酸酯a加氧酶的*OsCAO1*和*OsCAO2*基因<sup>[20]</sup>,以及编码联乙炔还原酶的*OsDVR*基因<sup>[21]</sup>。Mg<sup>2+</sup>-螯合酶催化Mg<sup>2+</sup>插入原卟啉IX, Jung等<sup>[11]</sup>利用T-DNA插入突变克隆了位于水稻第3染色体上的编码ChlH亚基的*OsChlH*基因, Zhang等<sup>[13]</sup>通过图位克隆方法克隆了位于水稻第3染色体上分别编码ChlD和ChlI亚基的*OsChlD*和*OsChlI*基因。叶绿素合酶催化叶绿素酸酯酯化形成叶绿素a, Wu等<sup>[19]</sup>采用图位克隆方法从水稻黄化突变体*yg11*分离了位于第5染色体的叶绿素合酶基因*YGL1*。叶绿素酸酯a加氧酶氧化叶绿素a形成叶绿素b, Lee等<sup>[20]</sup>利用T-DNA插入突变克隆了位于第10染色体同一BAC上编码叶绿素酸酯a加氧酶的*OsCAO1*和*OsCAO2*基因,这2个基因的功能是独立的,*OsCAO1*受光诱导,对叶绿素b合成起主要作用,而*OsCAO2*则在黑暗条件下起作用。联乙炔还原酶

催化联乙炔叶绿素a转化为单乙炔叶绿素a, Wang等<sup>[21]</sup>通过图位克隆方法从水稻自然黄化突变体824ys中分离了位于第3染色体短臂上的编码联乙炔还原酶的*OsDVR*基因。

本研究通过EMS诱变获得1份黄绿叶突变体*yg198*,其整个生育期均表现黄绿叶,通过构建(*yg198*/浙辐802)F<sub>2</sub>作图群体,实现了黄绿叶突变基因的分子标记定位。精细定位和测序结果发现,*Os03g59640*基因(编码镁离子螯合酶ChlD亚基)在编码区1522碱基处(位于第10外显子),碱基G突变为碱基A,从而造成编码蛋白序列第508位的丙氨酸(Ala)突变成苏氨酸(Thr),推测该基因是造成*yg198*黄绿叶突变的候选基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料及田间试验

10079来自粳稻品种日本晴(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*, cv. Nipponbare)的一个迟熟突变品系,由中国科学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1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“*yg198*”。将*yg198*分别与叶色正常的野生型亲本10079及籼稻品种浙辐802杂交,在四川成都分别播种亲本、F<sub>1</sub>及F<sub>2</sub>,从苗期开始观察叶色表现,成熟期调查突变体*yg198*和野生型亲本10079的株高、剑叶长、剑叶宽、单株有效穗数、穗长、穗平均着粒数、结实率、千粒重等主要农艺性状。

### 1.2 光合色素含量的测定

于拔节期取*yg198*突变株及其野生型亲本10079相同部位的叶片,称取0.2 g,剪成2~3 mm细丝,在4℃、避光条件下用80%丙酮浸提48 h,参照Lichtenthaler<sup>[22]</sup>的方法,测定叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素的含量。

### 1.3 透射电子显微镜分析

用透射电镜观察突变体和野生型叶肉细胞结构,叶片样品取自自然条件下生长4周的水稻幼苗。叶片样品经3%戊二醛预固定,1%四氧化锇再固定,丙酮逐级脱水,Epont812包埋,半薄片光学定位,超薄切片,醋酸铀及枸橼酸铅双重染色,最后在日立H-600IV型透射电子显微镜下观察(四川大学电镜室)。

### 1.4 定位群体的构建及总DNA的提取

根据叶色调查与分析结果,从*yg198*与浙辐802

杂交所得到的 F<sub>2</sub> 群体中, 选取 20 株正常绿苗和 771 株黄绿苗构成定位群体, 分单株取叶片提取总 DNA。同时, 随机选取正常绿苗和黄绿苗各 10 株, 每个单株取等量叶片, 将正常绿苗和黄绿苗单株叶片分别混合, 提取总 DNA 作为绿苗和黄绿苗近等基因池。参照 McCouch 等<sup>[23]</sup>的方法提取水稻叶片总 DNA。

1.5 分子标记分析和遗传图谱的构建

根据 McCouch 等<sup>[24]</sup>构建的 SSR 连锁图(<http://www.gramene.org/microsat/>)获得简单序列重复(SSR)标记, 并运用 Primer5.0 软件自行设计插入缺失(InDel)标记。SSR 和 InDel 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 反应体系参照 Panaud 等<sup>[25]</sup>的方法, 扩增产物经 3.0%~4.0%琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色后, 用凝胶扫描成像系统记录电泳分离结果。然后, 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), 进而构建目标基因所在区域的分子标记连锁图。

1.6 候选基因的遴选与测序

在突变基因精细定位的染色体区段, 根据水稻基因组注释数据库数据([http://rice.plantbiology.msu.edu/pseudomolecules/ordered\\_bac\\_3.shtml](http://rice.plantbiology.msu.edu/pseudomolecules/ordered_bac_3.shtml)), 以及分子标记与目标基因的交流植株数, 遴选候选基因。依据目标区段预测基因的序列设计引物, 分别对野生型和突变体的基因组进行 PCR 扩增并测序, 通过测序结果的比对与分析, 确定突变位点及对应的候选基因。

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

*yg198* 突变体植株整个生育期为黄绿色, 明显区

别于其野生型亲本 10079 (图 1)。与其野生型亲本相比, *yg198* 的剑叶宽增加 11.7%, 有效穗数和结实率分别减少 14.4%和 10.7%, 株高降低 7.4%, 剑叶长、穗长、每穗平均着粒数和千粒重等农艺性状差异不显著(表 1)。

2.2 突变体的光合色素含量

为了解突变体叶片光合色素含量的变化, 于拔节期对叶绿素 a、b 和类胡萝卜素的含量进行了测定(表 2)。结果显示, *yg198* 突变体叶绿素 a、叶绿素 b 及类胡萝卜素含量分别为 1.28、0.18 和 0.37 mg g<sup>-1</sup>, 比野生型亲本 10079 分别下降 39.6%、67.3%和 45.6%, 差异极显著( $P<0.01$ ), 表明 *yg198* 的突变性状主要是由光合色素含量下降引起的。此外, *yg198* 叶绿素 a/b 值较 10079 提高了 3.25, 说明该突变体叶绿素 b 的降幅大于叶绿素 a。

2.3 透射电子显微镜分析

为进一步了解突变体的形态特征, 对突变体 *yg198* 和野生型 10079 的叶肉细胞结构进行了透射电

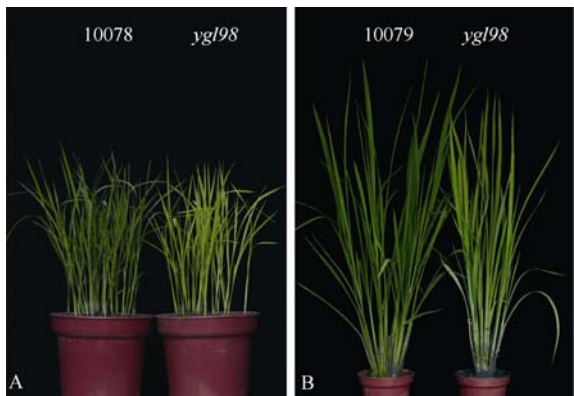


图 1 突变体 *yg198* 与其野生型亲本 10079 在苗期(A)及拔节期(B)的植株形态

Fig. 1 Plant phenotype of the *yg198* mutant and its wild-type parent 10079 at the seedling (A) and elongation (B) stages

表 1 突变体 *yg198* 与其野生型亲本 10079 主要农艺性状的比较  
Table 1 Comparison of major agronomic traits between the *yg198* mutant and its wild-type parent 10079

性状 Trait	10079 (control)	<i>yg198</i>	比对照增减 Compared with control (%)
株高 Plant height (cm)	111.3±3.5	103.1±2.4	-7.4*
剑叶长 Flag leaf length (cm)	32.8±2.8	32.7±5.0	-0.3
剑叶宽 Flag leaf width (cm)	1.28±0.07	1.43±0.08	11.7*
单株有效穗数 No. of productive panicles per plant	9.7±1.5	8.3±1.7	-14.4*
穗长 Panicle length (cm)	19.9±1.9	20.2±1.0	1.5
穗平均着粒数 No. of spikelets per panicle	91.2±1.5	94.7±1.3	3.8
结实率 Seed setting rate (%)	92.0±1.2	81.3±1.9	-10.7*
千粒重 1000-grain weight (g)	24.0±0.3	23.6±0.6	-1.7

\* 表示在  $P=0.05$  水平上差异显著。\* Significantly different at  $P=0.05$ .

表 2 拔节期 *yg198* 突变体与其野生型亲本 10079 叶片光合色素含量的比较

材料 Material	叶绿素 Chl (mg g <sup>-1</sup> )	叶绿素 a Chl a (mg g <sup>-1</sup> )	叶绿素 b Chl b (mg g <sup>-1</sup> )	叶绿素 a/b Chl a/b	类胡萝卜素 Carotenoid (mg g <sup>-1</sup> )
10079 (control)	2.67±0.16	2.12±0.11	0.55±0.05	3.86±0.12	0.68±0.05
<i>yg198</i>	1.46±0.09	1.28±0.09	0.18±0.01	7.11±0.28	0.37±0.01
比对照增减 Compared with CK	-45.3%**	-39.6%**	-67.3%**	3.25%**	-45.6%**

\*\* 表示在  $P=0.01$  水平上差异显著。 \*\* Significantly different at  $P=0.01$ .

镜观察。结果发现,野生型 10079 叶肉细胞中的叶绿体形态规则(图 2-A),叶绿体内部的类囊体和基粒丰富(图 2-C);而 *yg198* 突变体的叶绿体形状不规则(图 2-B),叶绿体中有许多空的囊泡状结构,类囊体数目减少,每个基粒仅由少数几个类囊体垛叠而成(图 2-D)。这说明 *yg198* 突变体的叶绿体发育受到抑制。

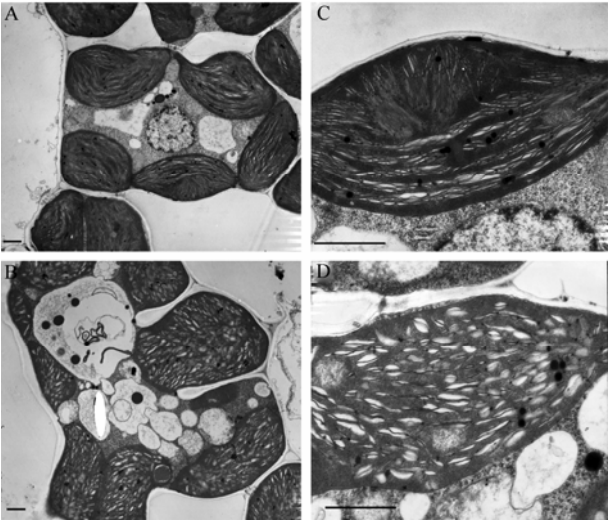


图 2 *yg198* 突变体与野生型叶肉细胞结构  
Fig. 2 Mesophyll cell structure of the mutant *yg198* and the wild type 10079

A: 野生型 10079 的叶肉细胞结构; B: 突变体 *yg198* 的叶肉细胞结构; C: 野生型的叶绿体结构; D: 突变体的叶绿体结构。

标尺=1 μm

A: mesophyll cell of the wild type 10079; B: mesophyll cell of the *yg198* mutant; C: chloroplast structure of the wild type 10079; D: chloroplast structure of the *yg198* mutant. Bar = 1 μm

2.4 突变性状的遗传分析

*yg198* 分别与正常绿色的野生型亲本 10079 及粳

稻品种浙辐 802 杂交,  $F_1$  植株均表现为正常绿叶,  $F_2$  群体中正常绿苗与黄绿苗分离十分明显, 分离比例经卡方( $\chi^2$ )测验符合 3:1 (表 3), 表明 *yg198* 的突变性状由 1 对隐性核基因控制。

2.5 突变基因的分子标记定位和候选基因分析

以 *yg198* 与浙辐 802 杂交  $F_2$  群体为定位群体, 用 351 对较均匀分布于水稻 12 条染色体上的 SSR 引物扩增亲本浙辐 802 和 *yg198* 的 DNA, 然后用在两亲本间表现出多态的引物扩增正常绿苗和黄绿苗植株近等基因池, 再用在池中检测到多态的引物扩增  $F_2$  黄绿叶突变植株。结果发现, 位于水稻第 3 染色体长臂近端的 SSR 标记 RM85 与目标基因存在连锁关系, 遗传距离为 13.6 cM。为了进一步定位目标基因, 新开发了 6 个具有亲本多态性的插入/缺失(InDel)标记, 分别是 I1、I2、I3、I4、I5 和 I6 (表 4)。用这 6 个 InDel 标记对  $F_2$  定位群体进行扩增, 结果表明它们也与 *yg198* 所携带的突变基因连锁(图 3), 遗传距离分别为 1.95、0.26、0.07、0.19、2.01 和 10.1 cM。最终, 该黄绿叶基因被定位在标记 I3 和 I4 之间物理距离约 44.2 kb 的区域内(图 4), 该区域共有 8 个预测基因(表 5)。根据这 2 个 InDel 标记与 *yg198* 突变基因的重组植株数(图 4), 在该区域内发现了一个开放阅读框(ORF) *Os03g59640* 编码镁离子螯合酶 ChlD 亚基。分别从野生型和 *yg198* 突变体中克隆 *Os03g59640* 基因, DNA 测序结果显示, *yg198* 突变体中该基因在编码区第 1 522 碱基处(位于第 10 外显子), 碱基 G 突变为碱基 A, 造成其编码蛋白第 508 位的丙氨酸(Ala)到苏氨酸(Thr)的错义突变(A508T), 故认为该基因是造成黄绿叶突变性状的候选基因(图 4)。

表 3 突变体 *yg198* 与正常绿色品系杂交  $F_2$  的叶色分离

组合 Combination	总株数 Total number of plants	绿苗株数 No. of green plants	黄绿苗株数 No. of yellow-green plants	期望比 Expected ratio	$\chi^2$	$P$
<i>yg198</i> /10079	691	523	168	3:1	0.139	0.50–0.75
<i>yg198</i> /浙辐 802	677	511	166	3:1	0.060	0.75–0.90
<i>yg198</i> /Zhefu 802						

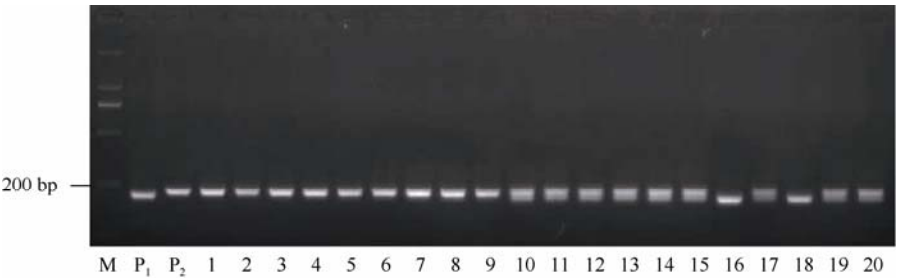


图 3 InDel 标记 15 在 *yg198*/浙辐 802  $F_2$  群体中的分离

**Fig. 3 Segregation of InDel marker 15 in the  $F_2$  population of *yg198*/Zhefu802**

M: DL-2000 marker; P<sub>1</sub>: 浙辐 802; P<sub>2</sub>: *yg198*; 1~10:  $F_2$  黄绿叶植株; 11~20:  $F_2$  绿色植株。  
P<sub>1</sub>: Zhefu 802; P<sub>2</sub>: *yg198*; 1~10: yellow-green plants in  $F_2$ ; 11~20: green plants in  $F_2$ .

表 4 本研究开发的多态性 InDel 标记

**Table 4 Developed polymorphic InDel markers 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
11	TCGTCCGTCATCAACTCC	CTCCACCAACAACCTCGTAT	AC084767
12	TTCTTGACCCTCTTACT	ATCTTGCGGATTATGTTG	AC084767
13	TGTGGCTATTAGGCTTGG	ACCGCTTATTCTATGTCTGC	AC135595
14	TTTAGATACGCAAAGACC	GATCAGCACAAATAGCAGG	AC137507
15	GATGGACACGGACTCTTT	GAAGTATACGGTAGGATG	AC137507
16	TGCGGAAACCATTTGACT	AAGACCTTGCCATTAGCC	AC092852

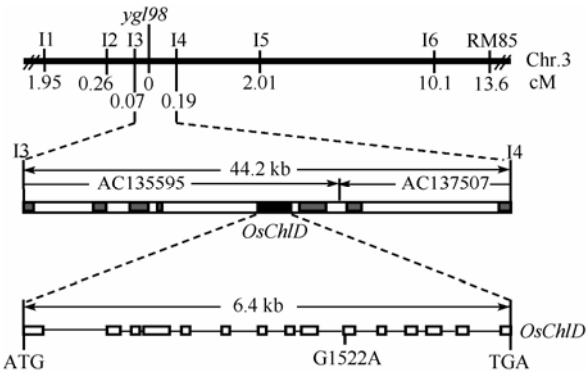


图 4 *yg198* 黄绿叶基因在水稻第 3 染色体长臂上的分子连锁图

**Fig. 4 Linkage map of *yg198* yellow-green leaf gene on the long arm of rice chromosome 3**

表 5 水稻第 3 号染色体定位区间内基因及其推测功能

**Table 5 Gene names and their putative functions in the target interval**

基因名称 Gene name	推测功能 Putative functions
LOC_Os03g59600	mitochondrial Rho GTPase 1, putative, expressed
LOC_Os03g59610	oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein, putative, expressed
LOC_Os03g59620	phospholipase, patatin family, putative, expressed
LOC_Os03g59630	retrotransposon protein, putative, unclassified
LOC_Os03g59640	magnesium-chelatase subunit ChlD, chloroplast precursor, putative, expressed
LOC_Os03g59650	mitochondrial Rho GTPase 1, putative, expressed
LOC_Os03g59660	clathrin adaptor complex small chain domain containing protein, expressed
LOC_Os03g59670	basic helix-loop-helix, putative, expressed

### 3 讨论

水稻叶色突变的分子机制比较复杂, 突变基因可直接或间接干扰叶绿素的合成及稳定, 经由多种途径引起叶色变化<sup>[26]</sup>。其中仅叶绿素整个生物合成过程就需要 15 步反应, 涉及 15 种酶<sup>[27]</sup>。迄今, 水稻中已克隆了编码参与叶绿素生物合成的 4 个酶的 7 个基因<sup>[11,13,19-21]</sup>,  $Mg^{2+}$ -螯合酶便是其中之一。 $Mg^{2+}$ -螯合酶由 ChlH、ChlD 和 ChlI 三个亚基组成, 它催化  $Mg^{2+}$  插入原卟啉 IX。Jung 等<sup>[11]</sup>利用 T-DNA 插入突变克隆了位于第 3 染色体上的编码  $Mg^{2+}$ -螯合酶 ChlH 亚基的 *OsChlH* 基因; Zhang 等<sup>[13]</sup>通过图位克隆方法克隆了水稻黄绿叶突变体 *Chlorina-1* 和 *Chlorina-9* 的突变基因, 它们是位于第 3 染色体上分别编码  $Mg^{2+}$ -螯合酶 ChlD 和 ChlI 亚基的 *OsChlD* 和 *OsChlI* 基因。*OsChlD* 基因组全长 6 765 bp, 共有 15 个外显子和 14 个内含子, cDNA 全长 2 265 bp, 编码一个由 754 个氨基酸组成的蛋白产物。本研究, 精细定位和测序结果表明, *yg198* 突变基因是 *Chlorina-1* 的等位基因, 即为编码镁离子螯合酶 ChlD 亚基的 *OsChlD* 基因。*yg198* 突变体在 *OsChlD* 基因编码区第 1 522 碱基处(位于第 10 外显子), 碱基 G 突变为碱基 A, 造成镁离子螯合酶 ChlD 亚基第 508 位的丙氨酸(Ala)突变成苏氨酸(Thr), 从而导致 *yg198* 突变体在整个生育期都表现为黄绿叶。而 *Chlorina-1* 突变体在编码

区第 1 178 bp 处(位于第 8 外显子), 碱基 G 突变为碱基 A, 造成 ChlD 亚基第 393 位的精氨酸变成谷氨酰胺(R393Q), 该突变体在 2~3 周龄幼苗时开始出现黄绿叶, 且该黄绿叶突变性状仅在苗期表现<sup>[13]</sup>。这 2 个突变体黄绿叶性状表现时期的差异, 可能是由于 ChlD 亚基不同位点氨基酸的变化造成的。

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<sup>[28-30]</sup>。本研究中, 与野生型 10079 相比, *yg198* 突变体的叶绿素 a、叶绿素 b 分别下降 39.6%和 67.3%, 叶绿素 a/b 提高了 3.25, 说明 *yg198* 突变体合成叶绿素 a 少, 叶绿素 b 更少, 这可能是镁离子螯合酶活性受阻造成的。Staehelin 等<sup>[31]</sup>也认为, 镁离子螯合酶活性受阻可能是叶绿素 b 减少和突变体表型发生变化的原因, 由于镁离子螯合酶活性降低, 导致底物 Proto IX 累积, 产物 Mg-proto IX 减少, 以及后续产物 Pchlde 含量降低, 最终导致合成叶绿素 a 少、叶绿素 b 更少。

孔萌萌等<sup>[32]</sup>把水稻叶绿体发育大体分为 3 个阶段: (1)前质体时期, 内部无片层结构, 内膜周围有许多小泡形成; (2)单片层形成期, 小泡相互融合, 形成单个类囊体片层; (3)基粒形成期, 多个片层平行排列形成基粒, 发育成正常叶绿体。透射电镜观察表明, *yg198* 突变体的叶绿体中有许多空的囊泡状结构, 类囊体数目较少, 每个基粒仅由少数几个类囊体垛叠而成。这说明 *yg198* 突变体的叶绿体发育受到抑制, 推断叶绿体发育停滞在第 2 阶段与第 3 阶段之间。

#### 4 结论

通过化学诱变获得 1 份遗传稳定的水稻黄绿叶突变体 *yg198*, 其叶绿素和类胡萝卜素含量显著下降。*yg198* 突变体的叶绿体形状不规则, 叶绿体中有很多空的囊泡状结构, 类囊体数目减少, 每个基粒仅由少数几个类囊体垛叠而成。*yg198* 突变性状由 1 对隐性核基因控制, 突变基因被精细定位于第 3 染色体长臂近端部的 InDel 标记 I3 和 I4 之间, 遗传距离分别为 0.07 cM 和 0.19 cM, 候选基因是 *Chlorina-1* 的等位基因, 编码镁离子螯合酶 ChlD 亚基; *yg198* 突变体在 *OsChlD* 基因编码区第 1 522 碱基处(位于第 10 外显子), 碱基 G 突变为碱基 A, 造成编码蛋白序列第 508 位的丙氨酸(Ala)突变成苏氨酸(Thr)。*yg198* 突变体整个生育期都表现为黄绿叶, 而 *Chlorina-1* 突变体在 2~3 周龄幼苗时开始出现黄绿

叶, 且该黄绿叶性状仅在苗期表现, 表型的差别可能是由于二者在 ChlD 亚基不同位点氨基酸的变化引起的。

#### References

- [1] Pan R-Z(潘瑞炽), Dong Y-D(董愚得). Plant Physiology (植物生理学). Beijing: Higher Education Press, 1995. pp 77-79 (in Chinese)
- [2] Suzuki J Y, Bollivar D W, Bauer C E. Genetic analysis of chlorophyll biosynthesis. *Annu Rev Genet*, 1997, 31: 61-69
- [3] Hu Z(胡忠), Peng L-P(彭丽萍), Cai Y-H(蔡永华). A yellow-green nucleus mutant of rice. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1981, 8(3): 256-261 (in Chinese with English abstract)
- [4] Ghirardi M L, Melis A. Chlorophyll b deficiency in soybean mutants effects on photosystem stoichiometry and chlorophyll antenna size. *Biochim Biophys*, 1988, 932: 130-137
- [5] Greene B A, Allred D R, Morishige D T. Hierarchical response of light harvesting chlorophyll proteins in a light-sensitive chlorophyll b-deficient mutant of maize. *Plant Physiol*, 1998, 87: 357-364
- [6] Krol M, Spangfort M D, Huner N P. Chlorophyll a/b binding proteins, pigment conversions and early light induced proteins in a chlorophyll b-deficient barley mutant. *Plant Physiol*, 1995, 107: 873-883
- [7] Falbel T G, Meehl J B, Staehelin L A. Severity of mutant phenotype in a series of chlorophyll-deficient wheat mutants depends on light intensity and the severity of the block in chlorophyll synthesis. *Plant Physiol*, 1996, 12: 821-832
- [8] Falbel T G, Staehelin L A. Partial block in the early steps of the chlorophyll synthesis pathway: a common feature of chlorophyll-deficient mutants. *Plant Physiol*, 1996, 97: 311-320
- [9] Zhao Y, Du L F, Yang S H, Li S C, Zhang Y Z. Chloroplast composition and structure differences in a chlorophyll-reduced mutant of oilseed rape seedlings. *Acta Bot Sin*, 2001, 43: 877-880
- [10] 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 phytylene desaturation. *Plant Cell*, 1999, 11: 57-68
- [11] 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
- [12] Nakanishi H, Nozue H, Suzuki K, Kaneko Y, Taguchi G, Haya-shida N. Characterization of the *Arabidopsis thaliana* mutant *pcb2* which accumulates divinyl chlorophylls. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46: 467-473
- [13] Zhang H, Li 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
- [14] 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
- [15] 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 genie 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)
- [16] Beale S I. Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth Res*, 1999, 60: 47–73
- [17] Nagata N, Tanaka R, Satoh S, Tanaka A. Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of Prochlorococcus species. *Plant Cell*, 2005, 17: 233–240
- [18] Beale S I. Green genes gleaned. *Trends Plant Sci*, 2005, 10: 309–312
- [19] 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
- [20] 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
- [21] Wang P R, Gao J X, Wan C M, Zhang F T, Xu Z J, Huang X Q, Sun X Q, Deng X J. Divinyl chlorophyll(ide) *a* can be converted to monovinyl chlorophyll(ide) *a* by a divinyl reductase in rice. *Plant Physiol*, 2010, 153: 994–1003
- [22] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods Enzymol*, 1987, 148: 350–382
- [23] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H. Molecular mapping of rice chromosome. *Theor Appl Genet*, 1998, 76: 815–829
- [24] McCouch S R, Teytelman L, Xu Y B, Lobos K B, Clare K, Walton M, Fu B Y, Maghirang R, Li Z K, Xing Y Z, Zhang Q F, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L. Development and mapping of 2 240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res*, 2002, 9: 199–207
- [25] 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
- [26] He B(何冰), Liu L-L(刘玲珑), Zhang W-W(张文伟), Wan J-M(万建民). Plant leaf color mutants. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2006, 42(1): 1–9 (in Chinese)
- [27] Wang P-R(王平荣), Zhang F-T(张帆涛), Gao J-X(高家旭), Sun X-Q(孙小秋), Deng X-J(邓晓建). An overview of chlorophyll biosynthesis in higher plants. *Acta Bot Boreali-Occident Sin* (西北植物学报), 2009, 29(3): 629–636 (in Chinese with English abstract)
- [28] Terao T, Yamashita A, Katoh S. Chlorophyll b-deficient mutants of rice I. absorption and fluoresce spectra and chlorophyll a/b ratios. *Plant Cell Physiol*, 1985, 26: 1361–1367
- [29] 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
- [30] Gong H-B(龚红兵), Chen L-M(陈亮明), 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(张荣铄), 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)
- [31] Falbel T G, Staehelin L A. Partial blocks in the early steps of the chlorophyll synthesis pathway: A common feature of chlorophyll b-deficient mutants. *Physiol Plant*, 1996, 97: 311–320
- [32] Kong M-M(孔萌萌), Yu Q-B(余庆波), Zhang H-Q(张慧琦), Sheng C(盛春), Zhou G-Y(周根余), Yang Z-N(杨仲南). Genetic mapping of rice gene *OsALB23* regulating chloroplast development. *J Plant Physiol Mol Biol* (植物生理与分子生物学学报), 2006, 32(4): 433–437 (in Chinese with English abstract)