

水稻黄绿叶突变体 *ygl4(t)* 的鉴定与基因定位^①

凌英华, 施军琼, 刘忠贤, 桑贤春,
杨正林, 张长伟, 赵芳明, 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 400715

摘要: 叶绿素相关突变体是水稻功能基因组学研究的一类重要突变源, 对于揭示水稻叶绿素生物合成机制以及构成光合系统蛋白复合体的相关研究都具有重要意义. 利用 EMS 诱变籼稻恢复系缙恢 10 号, 得到一个新的全生育期黄绿叶突变体 *ygl4(t)*, 表型分析结果显示, 该突变体的剑叶长、有效穗与每穗粒数与野生型(WT)差异无统计学意义, 而株高、千粒质量、结实率等 7 个性状均显著或极显著低于 WT. 此外, 叶绿素 a(*Chla*)质量分数, 净光合速率(*Pn*), 蒸腾速率(*Tr*)与 WT 差异无统计学意义, 而叶绿素 b(*Chlb*)质量分数, 总叶绿素(*Chl*)质量分数, *Chla/Chlb* 的比值, 气孔导度(*Gs*)与胞间 CO₂ 浓度(*Ci*)显著或极显著低于 WT. 突变体叶绿体内基粒片层减少, 排列不规则, 致使叶绿体在发育进程中受到抑制. 遗传分析表明, 该性状受 1 对隐性核基因控制, *YGL4(t)* 被位于水稻第 10 染色体 RM1162 与 RM7093 之间, 物理距离约 400 kb. 序列分析表明, 编码叶绿素 a 氧化酶(chlorophyll a oxygenase)基因 *O₃CAOI* 在终止密码子下游第 12 个碱基由 G 置换成 T, 推测 *O₃CAOI* 即为 *YGL4(t)* 的候选基因. 该研究为 *YGL4(t)* 基因功能研究奠定了基础.

关键词: 水稻; 黄绿叶; 基因定位; 候选基因

中图分类号: S511

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)10-0015-07

叶色变异是水稻突变体中最为常见的突变类型之一, 在水稻叶绿素代谢相关基因的定位、功能研究以及品种选育等领域都发挥着重要作用. 叶色突变基因通常直接或间接影响叶绿素的生物合成与降解, 降低叶绿素质量分数, 进而导致光合效率下降, 并最终导致减产或植株死亡^[1]. 目前, 已经鉴定了大量水稻叶色相关突变体^[2]. 研究结果显示, 控制突变性状的基因大多为隐性核基因, 只有极少数表现为显性核基因或胞质基因^[1, 3-6].

全生育期黄化型叶色突变体是近年来水稻叶色突变相关研究中广受关注的热点. 现有研究表明, 黄化型叶色突变性状由隐性核基因控制, 且目标基因编码产物大多为水稻叶绿素生物合成途径中的关键酶, 其叶绿素 a(*Chla*), 叶绿素 b(*Chlb*), 总叶绿素(*Chl*)以及 *Chla/Chlb* 比值均显著低于相应的野生型. 根据 *Chla/Chlb* 的比值, 可将水稻叶绿素相关突变体大致划分为 2 类: *Chlb*-less 型与 *Chlb*-deficient 型. *Chlb*-less 型突变体不含 *Chlb*, 或 *Chlb* 质量分数极低, *Chla/Chlb* 比值接近或超过 20; *Chlb*-deficient 型则含一定程度的 *Chlb*, *Chla/Chlb* 比值介于 6~10 之间^[7-8]. *Chlb* 的主要功能在于吸收和传递光能, 调控捕光天

① 收稿日期: 2014-01-27

基金项目: 重庆市自然科学基金计划项目(cstc2012jjA80011); 中央高校基本业务费专项资金资助(XDJK2014C147).

作者简介: 凌英华(1978-), 女, 四川资阳人, 副研究员, 主要从事水稻遗传育种的研究.

通信作者: 何光华.

线的大小,并维持 LHC2 的稳定性^[9]. *Chlb* 缺失或质量分数下降,会导致突变体叶绿体结构改变,从而影响其光合效率,甚至改变对光照强度、温度以及氧化胁迫的敏感程度^[10-14].

目前已发表的水稻全生育期叶色相关突变体多为 *Chlb*-deficient 型, *Chlb*-less 型相对较少. 我们利用甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulfonate, EMS)对缙恢 10 号进行化学诱变,得到一个稳定遗传的黄绿叶突变体 *ygl4(t)*. 本研究以该突变体为材料,分析其叶绿素及农艺性状与 WT 之间的差异,并利用覆盖水稻全基因组的 SSR 标记对控制突变性状的目标基因进行定位以及候选基因预测,为后续的相关研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

利用 EMS 处理籼稻恢复系缙恢 10 号(J10),获得一个全生育期表现为黄绿叶的突变体 *ygl4(t)*. 经过多代连续自交,得到了遗传稳定的突变株系. 配制西农 1A/*ygl4(t)* 杂交组合,利用其 F₁ 和 F₂ 群体进行遗传分析和基因定位.

1.2 电镜扫描

参照 Shan 等^[15]的方法,将剪取的叶尖材料用 1% 锇酸(pH 值为 7.2)和 3% 戊二醛双重固定之后,利用不同梯度的丙酮脱水,然后环氧树脂 SPURR 包埋—置换,超薄切片之后,醋酸双氧铀和柠檬酸铅液双重染色, H600 型透射电镜观察、照相.

1.3 主要农艺性状调查

进入成熟期后,分别从种植 *ygl4(t)* 与 J10 的小区中,随机选取 10 株,考察株高、剑叶长与宽、主穗长、有效穗数、每穗粒数、每穗实粒数、千粒质量等主要农艺性状.

1.4 叶绿素质量分数的测定

参照 Lichtenthaler 等^[16]的方法进行. 在抽穗期分别随机选取 *ygl4(t)* 与 J10 各 5 株的剑叶、倒 2 叶和倒 3 叶,利用 95% 乙醇制备叶绿素浸提液后,分光光度计测定其波长为 470, 645 与 663 nm 处的吸光值.

1.5 光合测定

参照吕典华等^[17]的方法,在抽穗期随机选取长势相对一致的单株各 5 株,利用便携式 LI-6400 型光合测定仪测定 *ygl4(t)* 与 WT 的净光合速率(P_n),气孔导度(G_s),胞间 CO₂ 浓度(C_i)与蒸腾速率(T_r),重复 3 次,取平均值. 使用红、蓝光源,光强恒定为 1 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,温度为 30 °C, CO₂ 浓度为空气中的浓度.

1.6 基因定位

利用 BAS 法筛选连锁标记^[18]. 从 F₂ 群体中选取 10 株正常和 10 株突变株,剪取等量叶片,构建正常基因池和突变基因池,进行连锁标记筛选. 引物与 PCR 反应体系参考桑贤春等^[19]的方法进行.

1.7 数据分析

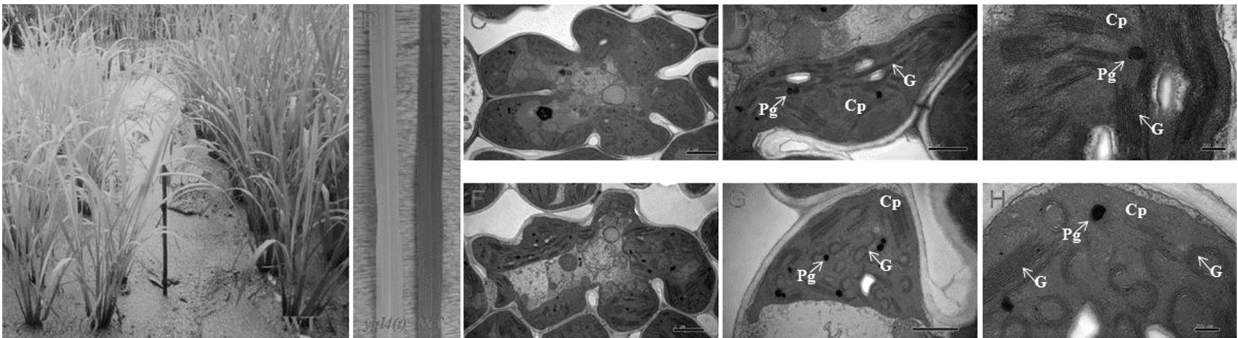
获得农艺性状、叶绿素质量分数以及光合测定值后,导入 SAS 软件(Statistical Analysis System, version 9.0),并利用该软件中的 Means 过程计算各参数的平均数与标准差,利用其中的 ANOVA 模块分析 *ygl4(t)* 与 J10 在各参数上的差异显著性.

2 结果与分析

2.1 *ygl4(t)* 农艺性状调查和表型分析

水稻黄叶突变体 *ygl4(t)* 叶片在整个生育期均表现为黄色(图 1A, 图 1B),能正常结实. 透射电镜分析表明,野生型叶肉细胞叶绿体饱满、形状规则(图 1C, 图 1D),基粒丰富,形状规整,排列紧密,片层垛叠较厚(图 1E);突变体叶绿体发生了一定程度的畸变(图 1F, 图 1G),表现为叶绿体内基粒变大,片层减少,形状出现环形, S 形等不规则变化,构成基粒的类囊体片层也相对减少(图 1G, 图 1H). 说明突变体的叶绿

体在发育进程中受到抑制。



A: 分蘖期 *yg14(t)* 的表型(左)与野生型的表型(右); B: *yg14(t)* 的叶色(左)与野生型的叶色(右);

C-E: WT 叶绿体结构(标尺分别为 2 μm , 1 μm , 0.2 μm), F-H: *yg14(t)* 突变体结构(标尺分别为 2 μm , 1 μm , 0.2 μm).

图中, Cp 表示叶绿体; Pg 表示质体小球; G 表示基粒.

图 1 野生型与 *yg14(t)* 表型及叶绿体的超微结构

yg14(t) 与野生型有效穗和每穗粒数差异无统计学意义; 株高、穗长、实粒数、千粒质量与结实率等与野生型则有显著或极显著降低(表 1).

表 1 *yg14(t)* 与 WT 农艺性状的比较

农艺性状	株高/cm	有效穗	穗长/cm	实粒数
<i>yg14(t)</i>	102.04±2.08	10.20±1.35	26.20±0.93	835.70±288.72
WT	107.84±2.40	9.60±1.52	28.52±1.38	1 264.80±146.26
<i>p</i> 值	0.003 5	0.527 4	0.014 2	0.018

农艺性状	每穗粒数	千粒质量/g	结实率/%
<i>yg14(t)</i>	158.21±11.21	26.41±0.71	51.53±4.73
WT	172.33±27.06	27.26±0.40	77.68±3.62
<i>p</i> 值	0.312 4	0.047 9	<0.000 1

2.2 *yg14(t)* 叶绿素质量分数和光合效率分析

突变体与野生型的叶绿素 a 质量分数差异无统计学意义, 叶绿素 b 质量分数只有 0.1, 极显著低于野生型, 而总叶绿素质量分数差异有统计学意义. 从叶绿素 a 与叶绿素 b 的比值来看, 突变体的平均值达到 27.54, 极显著高于野生型的 3.42(表 2).

表 2 突变体与对照叶绿素质量分数的比较

叶绿素质量分数	叶绿素 a/(mg · g ⁻¹)	叶绿素 b/(mg · g ⁻¹)	总叶绿素/(mg · g ⁻¹)	叶绿素 a/叶绿素 b
<i>yg14(t)</i>	2.66±0.32	0.10±0.02	2.16±0.26	27.54±4.18
WT	3.17±0.42	0.93±0.10	2.94±0.39	3.42±0.02
<i>p</i> 值	0.080 0	0.000 1	0.017 1	0.000 6

光合效率的分析结果显示, 4 个光合参数中, 突变体的净光合速率、蒸腾速率与野生型的差异无统计学意义, 但突变体气孔导度显著低于野生型, 胞间 CO₂ 浓度极显著高于野生型(表 3).

表 3 突变体与对照光合效率的比较

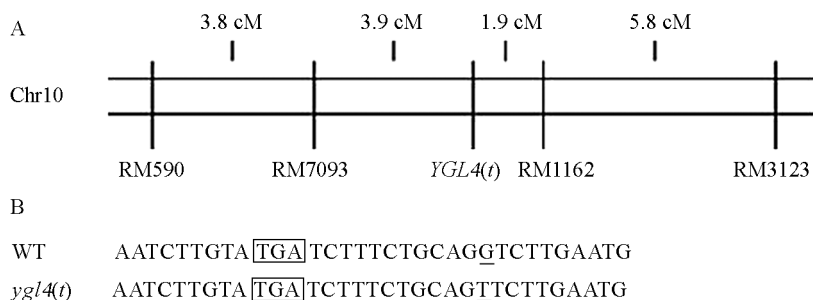
光合参数	净光合速率 <i>P</i> _n / ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	气孔导度 <i>G</i> _s / ($\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	胞间 CO ₂ 浓度 <i>C</i> _i / ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)	蒸腾速率 <i>T</i> _r / ($\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
<i>yg14(t)</i>	11.79±1.55	1.09±0.46	364.69±7.09	9.00±0.89
WT	11.15±2.63	1.79±0.68	338.97±2.35	8.54±0.72
<i>p</i> 值	0.540 7	0.020 5	<0.000 1	0.249 1

2.3 遗传分析与基因定位

西农 1A/ *yg14(t)* 的 F₁ 群体植株表型正常, F₂ 群体出现野生型和突变体表型的分离, 3 813 株 F₂ 群体中有黄绿叶表型 909 株, 正常株(2904)与突变株(909)的比例符合 3 : 1 分离比例 [$\chi^2 = 2.68 < 3.84$

($\chi^2_{0.05, 1}$)]，表明黄绿叶突变性状受 1 对隐性核基因控制。

利用分布在水稻 12 条染色体上的 400 个 SSR 标记对西农 1A 和 *yg14(t)* 进行全基因组扫描，获得 96 个多态性 SSR。利用这 96 个多态性 SSR 筛选正常基因池和突变基因池，发现位于第 10 染色体的 RM3123 与 RM590 在基因池间表现多态性，进一步利用 F_2 群体正常单株和突变单株进行验证，结果表明 *yg14(t)* 距两标记距离分别为 9.7cM 和 5.7cM。为将 *YGL4(t)* 定位在更小范围，从 RM3123 与 RM590 间选取更多的标记进一步缩短定位区间。结果发现 RM1162 与 RM7093 存在多态性，通过群体单株验证，最终将 *YGL4(t)* 定位在 RM1162 与 RM7093 之间，遗传距离分别为 3.9cM 与 1.9cM(图 2A)。检索 gramene 网站(www.gramene.org) 上 RM1162 与 RM7093 之间的基因组信息，发现这 2 个标记之间的物理距离约为 400 kb。



A: *YGL4(t)* 的分子定位; B: *yg14(t)* 与 WT 序列差异。

图 2 *YGL4(t)* 的分子定位与序列测定

2.4 候选基因

利用 gramene 网站(www.gramene.org)对位于 RM7093 与 RM1162 标记区域的基因组序列进行分析，发现该区间存在 3 个与叶绿素相关基因，分别为 *CHL-CPN10*，*CAO1* 与 *CAO2*，其中 *CAO1* 与 *CAO2* 编码叶绿素 *b* 合成的关键酶；*CHL-CPN10* 是叶绿体的伴侣蛋白，与叶绿体发育有关。随后扩增了 *CHL-CPN10*，*CAO1* 与 *CAO2* 基因的全长 DNA，并进行测序。结果显示，*yg14(t)* 与 WT 的 *CHL-CPN10* 与 *CAO2* 序列相同，*CAO1* 基因终止密码子下游第 12 个碱基由 G(WT)变为 T[*yg14(t)*](图 2B)。因此，将 *OsCAO1* 初步确定为 *YGL4(t)* 的候选基因。

3 讨论

水稻中已经发现大量黄绿叶突变体，包括 *chl13(t)*，*yg14*，*yg11* 等，其中部分基因已经克隆^[20-23]。这些叶色突变体的农艺性状都受到不同程度的负向影响，叶绿素结构以及类囊体基质片层等都会发生一定的变化^[24]。从叶绿素质量分数来看，*Chla* 与 *Chlb* 的质量分数都会显著或极显著低于 WT，进一步导致 *Chl* 的质量分数也显著下降。在叶绿素的降低中，*Chlb* 的下降幅度一般要高于 *Chla*，从而使得 *Chla/Chlb* 的比值显著高于 WT。*Chla/Chlb* 比值在 15 以下，属于 *Chlb*-deficient 型突变体^[7-8]。

本研究新发现的 *yg14(t)* 突变体与已报到黄绿叶突变体有相似的农艺性状表现和叶绿体与类囊体的结构变化^[17, 21]；与其他类似突变体相同，*yg14(t)* 的总叶绿素质量分数与 *Chlb* 质量分数也都极显著低于 WT。*yg14(t)* 突变体的一个显著特点是 *Chla* 质量分数与 WT 差异无统计学意义，总叶绿素质量分数降低主要是由于 *Chlb* 显著下降所致，与大麦和拟南芥中报道的突变体相似^[8, 25]。*Chla/Chlb* 的比值超过 25，属于典型的 *Chlb*-less 型突变体^[7-8]。尽管控制该突变性状的候选基因与我们此前报道的 *YGL4* 位于相同的标记区间^[21]，但是测序结果显示，*yg14(t)* 的候选基因为 *OsCAO1*，突变体由于终止密码子下游第 12 个碱基由 G 置换成 T，位于候选基因的编码区以外。而 *yg14* 的候选基因则是因为在 *OsCAO1* 的第 7 外显子由 C 到 T 的单碱基突变，导致其编码的氨基酸由亮氨酸突变为苯丙氨酸^[21]。此外，*yg14* 的 *Chla*，*Chlb*，*Chl* 以及 *Chla/Chlb* 与 WT 之间差异有统计学意义。*yg14(t)* 与 WT 之间除 *Chla* 的差异无统计学意义外，*Chl*，*Chlb* 与 *Chla/Chlb* 的差异无统计学意义。这种差异主要是由于突变体 *Chlb* 质量分数显著降低所致。突变体 *yg14(t)* 的 *Chla/Chlb* 为 27.54，属于典型的 *Chlb*-less 型突变体，*yg14* 的 *Chla/Chlb* 则为 7.91，属于 *Chlb*-deficient 型突变体^[7-8]。

在叶绿素的生物合成中, *Chlb* 由 *Chla* 氧化形成, 这一过程受 *CAO* 基因编码的酶所催化^[26]. 低 *Chlb* 叶色突变体是一种常见的水稻叶色突变类型, 已报道了多个合成水稻 *Chlb* 的 *OsCAO1* 基因^[27-29]. *Chlb-less* 型突变体表型的共同点在于 *Chlb* 质量分数比 WT 严重下降, *Chla* 的质量分数也明显下降, 与 WT 之间的差异有统计学意义. 本研究发现的 *OsCAO1* 新突变体 *yg14(t)* 与已报到的 *Chlb-less* 型突变体之间的相似之处在于 *Chlb* 质量分数的极显著下降; 不同之处在于 *yg14(t)* 的 *Chla* 质量分数与 WT 相比下降了 16.1%, 降幅明显低于已报到的同类突变体, 且 *Chla* 质量分数与 WT 之间的差异无统计学意义. 在突变表型上, *yg14(t)* 与此前报道的同类突变体有所差异. 并且, 从突变位点来看, 已报道的 *OsCAO1* 候选基因的突变位点基本位于 ORF 以内^[27-29], 而 *yg14(t)* 的突变位点则位于终止密码子下游, 即在候选基因的突变位点上也表现出了明显的不同. 这一结果表明, ORF 以外的突变可能对 *Chlb* 的影响更大.

研究者利用不同来源的 *Chlb-less* 型突变体, 系统研究了 *Chlb* 的生理特性以及光合效率, 并深入分析了 *Chlb* 质量分数下降所导致变化的原因. Dai 等通过一个自然条件下产生的、具有较高产量潜力的低叶绿素 b 突变体(*Chla/Chlb* 为 4.7)的研究发现, 突变体耐受强光特性比野生型有所提高, 但其截光率(0.42)较野生型(0.81)显著降低^[10-11]. 其后续研究表明, 该突变性状对类囊体膜的组成与稳定性影响较小; 与野生型相比, 突变体光合电子传递速率和羧化反应消耗电子速率之间更加平衡, 从而导致突变体的光合功能较野生型更为稳定, 这可能是由于突变体的 LHC1(light-harvesting complex1, 捕光复合体 1)与 LHC2(light-harvesting complex2, 捕光复合体 2)及其他相关蛋白的变化所致^[30-32]. 另一方面, 研究者通过对利用 Ds 插入梗稻材料中花 11 基因组所获得的 2 个 *Chlb-less* 型突变体 *vg28-1* 与 *vg30-5* 的系统研究发现, 这 2 个突变体的 LHC2 缺失, LHC1 的质量分数也降低, 对温度、光照以及强氧化等胁迫的敏感度高于 WT, 并且由于 *Chlb* 的缺失, 导致突变体对强光照以及强氧化胁迫更为敏感^[12-14].

本研究发现, *yg14(t)* 的净光合速率(*Pn*)与 WT 差异无统计学意义, 与 Lin 等^[12]在 2 类水稻 *Chlb-less* 型的突变体中检测到的结果一致. 他们推测尽管突变体中 LHC1 的质量分数下降, LHC2 的合成受阻, 但 PSI(photosystemI, 光系统 I)与 PSII(photosystemII, 光系统 II)中的多肽质量分数升高. 突变体中核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RuBPCO)的质量分数显著高于 WT, 而 RuBPCO 的增加有可能会弥补突变体中因为 PSII 活性降低对其光合作用的影响, 从而导致突变体的 *Pn* 与 WT 相比不会出现显著下降^[12]. 在 *yg14(t)* 中, 是否也是由于类似的机理导致其能够保持较高的 *Pn*, 有待进一步的研究. 我们还发现, *yg14(t)* 的蒸腾速率(*Tr*)与 WT 的差异无统计学意义, 而其气孔导度与胞间 CO₂ 浓度与 WT 差异有统计学意义, 不同于黄绿叶突变体 *yg15* 与 *pylg11*^[21]. *Chlb* 在植物光合作用中主要负责吸收和传递光能、调控捕光天线的大小以及维持 LHC2 的稳定性^[9], 而 *yg14(t)* 中气孔导度的显著下降与胞间 CO₂ 浓度极显著增加是否是由于 *Chlb* 质量分数的极端下降所致, 有待进一步研究.

本研究初步将 *OsCAO1* 确定为 *yg14(t)* 的候选基因, 然而序列分析表明, 在 *YGL4(t)* 中, 突变位点为终止密码子下游的第 12 个碱基, 位于编码区以外, 明显不同于此前报道的同类基因^[21, 26-27]. 该突变位点是如何导致 *yg14(t)* 中 *Chlb* 的急剧下降, 有待后续的进一步研究. 此外, *Chlb-less* 型突变体对于强光照、高温以及强氧化等外界因素胁迫的敏感程度均会发生相应的变化^[9, 13-14, 33-34], *yg14(t)* 是否对这些类似的胁迫具有相似的表现也需要进一步试验予以揭示.

参考文献:

- [1] SHENG Z H, WEI X J, SHAO G N, et al. Genetic Analysis and Molecular Mapping of Novel White Striped Leaf Mutant Gene in Rice [J]. Rice Science, 2013, 20(5): 336-342.
- [2] 魏彦林, 施勇烽, 吴建利. 水稻核基因控制的叶色变异 [J]. 核农学报, 2011, 25(6): 1169-1178.
- [3] 钱 前, 朱旭东, 曾大力, 等. 细胞质基因控制的新特异材料白绿苗的研究 [J]. 作物品种资源, 1996(4): 11-12.
- [4] 李贤勇, 王楚桃, 李顺武, 等. 一个水稻高叶绿素含量基因的发现 [J]. 西南农业学报, 2002, 15(4): 122-123.
- [5] 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.

- [6] CHEN X, ZHANG W, XIE Y J, et al. Comparative Proteomics of Thylakoid Membrane from a Chlorophyll b-Less Rice Mutant and Its Wild Type [J]. Plant Science, 2007, 173(4): 397—407.
- [7] TERAOKA T, YAMASHITA A, KATOH S. Chlorophyll b-Deficient Mutants of Rice: I. Absorption and Fluorescence Spectra and Chlorophyll a/b Ratios [J]. Plant Cell Physiol, 1985, 26(7): 1361—1367.
- [8] FALBEL T G, STAEHELIN L A. Partial Block in the Early Steps of the Chlorophyll Synthesis Pathway: A Common Feature of Chlorophyll b-Deficient Mutants [J]. Physiol Plant, 1996, 97(2): 311—320.
- [9] 郭春爱, 刘 芳, 许晓明. 叶绿素 b 缺失与植物的光合作用 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(5): 967—973.
- [10] 戴新宾, 曹树青, 许晓明, 等. 低叶绿素 b 高产水稻突变体及其光合特性的研究 [J]. 植物学报, 2000, 42(12): 1289—1294.
- [11] DAI X, XU X, LU W, Kuang T. Photoinhibition Characteristics of a Low Chlorophyll b Mutant of High Yield Rice [J]. Photosynthetica, 2003, 41(1): 57—60.
- [12] LIN ZF, PENG C L, LIN G Z, et al. Photosynthesis Characteristics of Two New Chlorophyll b-Less Rice Mutants [J]. Photosynthetica, 2003, 41(1): 61—67.
- [13] LIN ZF, PENG C L, XU X L, et al. Thermostability of Photosynthesis in Two New Chlorophyll b-Less Rice Mutant [J]. Science in China Ser. C Life Sciences, 2005, 48(2): 139—147.
- [14] LIN ZF, LIN G Z, PENG C L. Enhancement of Susceptibility to Photoinhibition and Photooxidation in Rice Chlorophyll b-Less Mutants [J]. Photosynthetica, 2009, 47(1): 46—54.
- [15] SHAN X, WANG H, ZHANG S, et al. Accumulation and Uptake of Light Rare Earth Elements in a Hyperaccumulator *Dicroptheris dichotoma* [J]. Plant Science, 2003, 165(6): 1343—1353.
- [16] LICHTENTHALER H K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes [J]. Meth Enzymol, 1987, 148: 350—382.
- [17] 吕典华, 宗学风, 王三根, 等. 两个水稻叶色突变体的光合特性研究 [J]. 作物学报, 2009, 35(12): 2304—2308.
- [18] MICHELMORE R W, PARAN I, KESSELI R V. Identification of Markers Linked to Disease-Resistance Genes by Bulk Segregant Analysis: a Rapid Method to Detect Markers in Specific Genomic Regions by Using Segregating Populations [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 9828—9832.
- [19] 桑贤春, 杜 川, 王晓雯, 等. 水稻矮秆脆性突变体 *dbc1* 的鉴定与基因定位 [J]. 作物学报, 2013, 39(4): 626—631.
- [20] 李秀兰, 孙小秋, 王平荣, 等. 一个新的水稻黄绿叶突变体的遗传分析与基因定位 [J]. 作物学报, 2010, 36(6): 1050—1054.
- [21] 刘梦梦, 桑贤春, 凌英华, 等. 水稻黄绿叶基因 *YGL4* 的遗传分析和分子定位 [J]. 作物学报, 2009, 35(8): 1405—1409.
- [22] DONG H, FEI GL, WU CY, et al. A Rice Virescent-Yellow Leaf Mutant Reveals New Insights Into the Role and Assembly of Plastid Caseinolytic Protease in Higher Plants [J]. Plant Physiol, 2013, 162(4): 1867—1880.
- [23] WU Z, ZHANG X, HE B, et al. A Chlorophyll-Deficient Rice Mutant with Impaired Chlorophyllide Esterification in Chlorophyll Biosynthesis [J]. Plant Physiol, 2007, 145(1): 29—40.
- [24] 宗学风, 罗 力, 吕典华, 等. 水稻叶片全生育期黄化突变体 *ylg3* 叶绿素合成特性研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2013, 35(11): 21—26.
- [25] MURRY D L, KOHORN B D. Chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* Homozygous for the *chl-l* Locus Lack Chlorophyll b, Lack Stable LHCPII and Have Stacked Thylakoids [J]. Plant Mol Biol, 1991, 16: 71—79.
- [26] OSTER U, TANAKA R, TANAKA A, et al. Cloning and Functional Expression of the Gene Encoding the Key Enzyme for Chlorophyll b Biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 2000, 21(3): 305—310.
- [27] LEE S, KIN J H, YOO E S, et al. Differential Regulation of *Chlorophyll a Oxygenase* Genes in Rice [J]. Plant Mol Biol, 2005, 57(6): 805—818.
- [28] ABE A, KOSUGI S, YOSHIDA K, et al. Genome Sequencing Reveals Agronomically Important Loci in Rice Using MutMap [J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(2): 174—179.
- [29] 杨海莲, 刘 敏, 郭 旻, 等. 一个水稻黄绿叶突变体 *ylg10* 的遗传分析和基因定位 [J]. 中国水稻科学, 2014, 28(1): 41—48.
- [30] 龚红兵, 陈亮明, 刁立平, 等. 水稻叶绿素 b 减少突变体的遗传分析及其相关特性 [J]. 中国农业科学, 2001, 34(6):

686—689.

[31] 张荣铎, 许晓明, 戴新宾, 等. 叶绿素 b 含量低的水稻突变体的光合功能衰退及其与活性氧的关系 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(2): 104—108.

[32] 陈 熙, 崔香菊, ZHAO Y X, 等. 低叶绿素 b 水稻突变体类囊体膜的比较蛋白质组学 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(7): 653—659.

[33] 郭春爱, 周 玮, 刘 芳, 等. 水稻低叶绿素 b 突变体光系统 II 的热稳定性 [J]. 作物学报, 2007, 33(8): 1390—1392.

[34] XIE Y J, CHEN H Y, ZHANG R X, et al. Antioxidase System of a Rice Mutant with Low Chlorophyll b [J]. Agricul Science Technology, 2008, 9(3): 6—10, 30.

Identification and Gene Mapping of a Yellow-Green Leaf Mutant *ylg4(t)* in Rice (*Oryza sativa* L.)

LING Ying-hua, SHI Jun-qiong, LIU Zhong-xian,
SANG Xian-chun, YANG Zheng-lin, ZHANG Chang-wei,
ZHAO Fang-ming, HE Guang-hua

Rice Research Institute of Southwest University / Chongqing Key Laboratory of Application and Safety Control of Genetically Modified Crops, Chongqing 400715, China

Abstract: As an important type of mutation sources for researches of functional genomics, chlorophyll-related mutants are of great importance in the analysis of the mechanism of chlorophyll biosynthesis and protein complexes of photosynthesis in rice. A novel mutant with constitutive yellow-green leaves during the whole growth period in rice, *yg14(t)*, was induced in the chemically mutated descendents of Jinhui10, an indica restorer line, with ethyl methane sulfonate (EMS). Phenotypic analysis showed that the flag leaf length, effective panicle number and seed number per panicle of the mutant exhibited no significant difference from those of the wild type (WT), while other 7 traits, i. e. plant height, flag leaf width, main panicle length, full seed number, shriveled seed number, 1000-seed-weight and seed setting rate (%), were significantly or highly significantly lower than those of WT. Content of chlorophyll a (*Chla*), Pn and Tr were not significantly different between *yg14(t)* and WT, while chlorophyll b (*Chlb*) content, total chlorophyll content (*Chl*), *Gs* and *Ci* were significantly or highly significantly lower in *yg14(t)* than in WT. In the chloroplasts of *yg14(t)*, fewer grana lamellae were observed, compared with WT, and they were irregularly arranged, thus retarding the development of the chloroplasts. Results of genetic analysis indicated that *yg14(t)* was controlled by a pair of recessive genes and located on Chromosome 10 between markers RM1162 and RM7093, the physical distance being 400 kb. Results from the sequence analysis showed that the 12th base downstream the termination codon of *OsCAOI*, which encodes the chlorophyll a oxygenase in rice, mutated from G to T, which led to a significant decrease of *Chlb* content in the mutant leaves.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); yellow-green leaf; gene mapping; candidate gene

