

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.07.004

王晓菲, 李凤菲, 邸新晏, 等. 水稻黄绿叶突变体 *ycl20* 的鉴定与候选基因发掘 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(7): 47-58.

水稻黄绿叶突变体 *ycl20* 的鉴定与候选基因发掘

王晓菲, 李凤菲, 邸新晏, 杨国金,
陈梅, 张长伟, 凌英华

西南大学 水稻研究所/作物分子改良重庆市重点实验室, 重庆 400715

摘要: 叶色突变影响植物的光合作用, 最终会影响水稻的产量和品质。用甲基磺酸乙酯(EMS)处理野生型西农 1B (WT), 获得一个稳定遗传、全生育期均为黄绿叶的突变体 *yellow-green leaf20* (*ycl20*)。与野生型 WT 相比, *ycl20* 株高、二次枝梗数、每穗实粒数、结实率与千粒质量均明显下降 ($p < 0.05$ 或 0.01), 叶片中叶绿素 a (Chla)、叶绿素 b (Chlb)、总叶绿素 (ChlT) 和类胡萝卜素 (Car) 含量也显著降低 ($p < 0.01$), 光合速率 (P_n)、气孔导度 (G_s) 和蒸腾速率 (T_r) 均极显著低于野生型 WT ($p < 0.01$), 胞间 CO_2 浓度 (C_i) 则显著增加 ($p < 0.05$)。透射电镜检测结果显示: *ycl20* 叶绿体中嗜银小体增多, 基粒堆积密度低, 基质片层松散。遗传分析表明: *ycl20* 的黄绿叶受 1 对隐性核基因控制。利用图位克隆方法对 *YGL20* 基因定位克隆, 发现 *YGL20* 的 G/T 单碱基替换导致了 *ycl20* 黄绿叶的突变表型, 其编码产物为牻牛儿基牻牛儿基还原酶 (Geranylgeranyl Reductase, GGR)。qRT-PCR 分析表明: *YGL20* 可能参与了叶绿素合成/代谢相关的调控网络。

关键词: 水稻; 黄绿叶突变体 *ycl20*; 图位克隆; 牻牛儿基牻牛儿基还原酶 (GGR)

中图分类号: S511

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2025)07-0047-12

Identification and Mining Candidate Gene for Yellow-green Leaf Mutant *ycl20*

WANG Xiaofei, LI Fengfei, DI Xinyan, YANG Guojin,
CHEN Mei, ZHANG Changwei, LING Yinghua

Rice Research Institute, Southwest University/Chongqing Key Laboratory of Crop Molecular Improvement, Chongqing 400715, China

Abstract: Leaf-color related mutants can directly influence the photosynthesis of plant, eventually affecting the grain yield and quality of rice. A novel yellow-green leaf mutant *ycl20* (*yellow-green leaf20*), was

收稿日期: 2024-04-30

基金项目: 重庆市技术创新与应用发展专项(CSTB2022TIAD-KPX0018); 重庆英才计划“包干制”项目(cstc2022ycjh-bgzxm0134)。

作者简介: 王晓菲, 硕士研究生, 主要从事水稻遗传育种的研究。

通信作者: 凌英华, 硕士, 副研究员。

screened from the mutant library of elite restorer line Xinong 1B chemically induced via EMS (ethyl methane sulphonate). Compared to the wild type (WT), plant height, secondary panicle branches, filled grains per panicle, setting rate, and 1000-grain weight of *yg120* significantly decreased ($p < 0.05$ or 0.01). ContentS of carotenoid (Car), chlorophyll a (Chla), chlorophyll b (Chlb), and total chlorophyll (ChlT) of leaves of *yg120* were also extremely decreased ($p < 0.01$). The photosynthetic rate (P_n), stomatal conductance (G_s) and transpiration rate (T_r) of the mutant were significantly lower than those of WT ($p < 0.01$), while intercellular CO_2 concentration (C_i) was significantly increased ($p < 0.05$). The results of transmission electron microscopy showed that in the chloroplast of *yg120*, number of osmiophilic corpuscles increased, the stacking density of grana was low, and the stromal lamellae was loose. The results of genetic analysis indicated that yellow-green leaf color of *yg120* was controlled by one pair of recessive nucleic genes. The map-based cloning was used to map and clone the *YGL20*. It was found that a G/T single base substitution of *YGL20* led to the mutant phenotype of yellow-green leaf of *yg120*, which coded a product of geranylgeranyl reductase (GGR). RT-qPCR results showed that *YGL20* may be involved in the regulation network related to chlorophyll synthesis/metabolism. The results laid a foundation for further identification of the function of *YGL20* gene.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); yellow-green leaf mutant (*yg120*); map-based cloning; geranylgeranyl reductase (GGR)

叶片是光合作用的主要器官,作物的光合产物是人类食物的主要来源^[1]。叶色异常会影响水稻的光合作用效率及灌浆期中籽粒的形成,从而影响水稻的生长发育和产量^[2]。水稻叶色通常表现为绿色,这是由叶绿素和类胡萝卜素等色素共同作用的结果。叶绿素缺乏或过多通常会引起叶色异常,表现为叶色变黄、变白、过绿或呈现出其他异常的颜色^[3]。目前在水稻中克隆了许多与叶色相关的基因,主要参与叶绿素合成与降解、叶绿体发育和相关代谢途径、光信号与内源信号等其他途径,如叶绿素合成相关基因 *OsCAO1* 和 *OsCAO2*^[4]、*OsChlH*^[5]、*OsChlD*^[6]、*OsChlI*^[7]、*OsPORA*^[8]、*YGL1*^[9]、*YGL8*^[10]等,叶绿素降解相关基因 *SGR*^[11]、*OsPORB*^[8]、*NYC1*^[12]、*NYC4*^[13]等,叶绿体发育相关基因 *YSA*^[14]、*GRC1*^[15]、*ASL2*^[16]、*YGL2*^[17]、*GRY3*^[18]等,以及涉及其他调控途径的基因,如 *WLP2*^[19]、*OsAHL1*^[20]、*SPL35*^[21]等。

叶色突变体是研究光合作用的理想材料,探索叶绿素合成途径和叶绿体发育及其他相关酶基因的调控,有助于了解叶色相关基因的调控网络和分子机制,如水稻黄叶基因 *YGL1*,编码叶绿素合成酶,催化叶绿素酸酯植醇化,生成叶绿素 a^[22]。水稻苗期黄绿叶基因 *YGL2* 编码血红素加氧酶 1,其突变体 *yg12* 中 *YGL2* 的表达显著减少,叶绿素和四吡咯中间体含量下降,一些与叶绿素生物合成和光合作用相关的基因表达水平发生改变,表明 *YGL2* 在水稻叶绿素生物合成中发挥着重要作用^[23]。*YGL8* 基因编码镁原卟啉 IX 单酯环化酶(Mg PME)的一个催化亚基,参与叶绿素合成 FLU-YGL8-LCAA-POR 复合体的核心组分^[10]。*NYC1* 和 *NOL* 均编码短链脱氢酶/还原酶,并在体外发生相互作用,形成叶绿素 b 还原酶复合体,催化叶绿素 b 降解的第一步反应,在调节叶片衰老过程中叶绿素 b 降解和捕光复合体 II 降解中发挥重要作用^[12, 24]。*YGL6* 基因编码 NAD(P)-结合的 Rossmann 折叠超家族蛋白质,通过蛋白产物的 RNA 结合功能参与叶绿体的发育过程^[25]。另一个黄绿叶基因 *YGL8* 独立于叶绿素合成和光合系统,主要在叶片中高度表达,编码一个位于叶绿体的尿嘧啶核苷酸激酶,间接影响叶绿素的生物合成^[26]。

调控水稻叶色变化是一个复杂而精细的过程,挖掘和鉴定更多的基因有利于深入了解这一过程并对其进行调控。本研究以 EMS 处理野生型西农 1B(WT)获得的黄绿叶突变体 *yg120* 为试验材料,对其进行表型鉴定、主要农艺性状研究、光合特性分析和细胞学观察,并利用缙恢 10 号与 *yg120* 突变体杂交构建的分离群体进行遗传分析、基因定位及候选基因预测。此外,利用荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 对突变体 *yg120* 的部分相关基因进行表达水平分析。

1 材料与方法

1.1 研究材料

黄绿叶突变体是由西农 1B(籼型保持系)经 EMS 诱变获得的, 表型稳定遗传, 暂命名为 *yellow-green leaf20* (*ycl20*)。利用优良恢复系缙恢 10 号与 *ycl20* 杂交, 获得 F_1 代种子, 同年 9 月将 F_1 代于海南水稻基地种植并收获 F_2 代种子; 次年 3 月将亲本与 F_2 代群体于重庆北碚歇马实验基地种植。 F_1 与 F_2 代群体用于目标性状的遗传分析, F_2 代群体中的隐性植株用于目标基因的精细定位。

1.2 研究方法

1.2.1 表型分析

自然条件下, 于 3 月中旬在重庆北碚歇马实验基地播种野生型和黄绿叶突变体 *ycl20*, 4 月下旬将二者各 100 株以株距 17 cm、行距 27 cm 移栽至同一块试验田, 观察全生育期植株表型; 成熟期随机选取试验田非边行的 10 株野生型西农 1B(WT)和 10 株突变体 *ycl20*, 对其株高、穗长、一次枝梗数、结实率及千粒质量等重要农艺性状进行考察。

1.2.2 细胞形态学分析

参照 Shan 等^[27]的方法, 经戊二醛和锇酸双重固定, 乙醇梯度逐级脱水、置换、包埋后, 制作超薄切片, 采用醋酸双氧铀和柠檬酸铅液双染色, H600 型透射电镜(Hitachi, Japan)观察叶片细胞超微结构。

1.2.3 光合色素含量检测

在抽穗期, 随机选取长势一致的野生型 WT 和突变体 *ycl20* 各 3 株, 根据 Lichtenthaler^[28]的方法测定倒 1 叶(Top1)、倒 2 叶(Top2)、倒 3 叶(Top3)的叶绿素 a(Chla)、叶绿素 b(Chlb)、总叶绿素(ChlT)、类胡萝卜素(Car)含量。

1.2.4 光合效率测定

在正常田间种植条件下, 于抽穗期选择晴朗无云、温度稳定的天气进行试验: 随机选取 3 株野生型 WT 和 3 株突变体 *ycl20*, 采用便携式光合测定仪(GFS-3000)测定其光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、胞间 CO_2 浓度(C_i)、蒸腾速率(T_r)等 4 个光合参数, 并分析突变体与 WT 植株的光合效率。

1.2.5 基因定位

在整个生育期记录 F_2 代所有植株的叶片颜色, 分别统计与野生型 WT 和突变体 *ycl20* 叶色相似的个体, 通过卡方检验对突变体 *ycl20* 进行遗传分析。所有材料的 DNA 通过 CTAB^[29]提取, 并使用覆盖整个水稻基因组的 400 多对 SSR 和 InDel 标记进行亲本多态性分析, 计算遗传距离(D), 构建连锁图谱^[30]。

$$D = [(H + 2A)/2n] \times 100$$

式中: H 为定位群体中杂合带型的单株数; A 为正常带型的单株数; n 为定位群体的隐性单株数。

1.2.6 RNA 提取与 qRT-PCR 分析

在孕穗期, 通过总 RNA 提取纯化试剂盒(天根生化科技公司)从野生型 WT 和突变体 *ycl20* 叶片中提取总 RNA, 纯化并检测 RNA 浓度, 按照 RNA 反转录试剂盒合成 cDNA, 采用 qRT-PCR 方法测定光合作用相关基因在野生型和突变体植株中的表达。

1.2.7 数据分析与作图

本研究所有数据均采用 Excel 2019 进行整理和作图, 并进行 t 检验, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 表型与农艺性状

在自然田间种植条件下, 野生型西农 1B(WT)在整个营养生长期和生殖生长早期至中期(正常生理老化阶段之前)都保持绿色, 而突变体 *ycl20* 的所有叶片从第 1 叶即开始呈现黄绿色(图 1a、1b)。*ycl20* 叶片的黄绿色首先出现在叶尖, 然后逐渐向中部延伸, 最后到叶基部。从分蘖早期到籽粒灌浆期, *ycl20* 的叶片, 尤其是植株顶部的叶片, 呈现出黄色偏多、绿色偏少的趋势(图 1c-1e)。*ycl20* 的 3 个功能叶片中, Top1 的黄化程度最显著, 其次是 Top2 和 Top3(图 1d、1f)。

成熟期的农艺性状鉴定结果显示，除一次枝梗数外，突变体 *yg120* 的所有性状均显著降低(表 1)。与野生型 WT 相比，*yg120* 的分蘖数仅为 5.30 个，下降了 41.76%($p<0.01$)；株高、二次枝梗数、每穗总粒数和每穗实粒数均减少了 10% 以上，差异达到显著或极显著水平；而穗长、结实率、千粒质量 3 个性状降低程度相对较轻，但差异也都达到显著或极显著水平(表 1)。

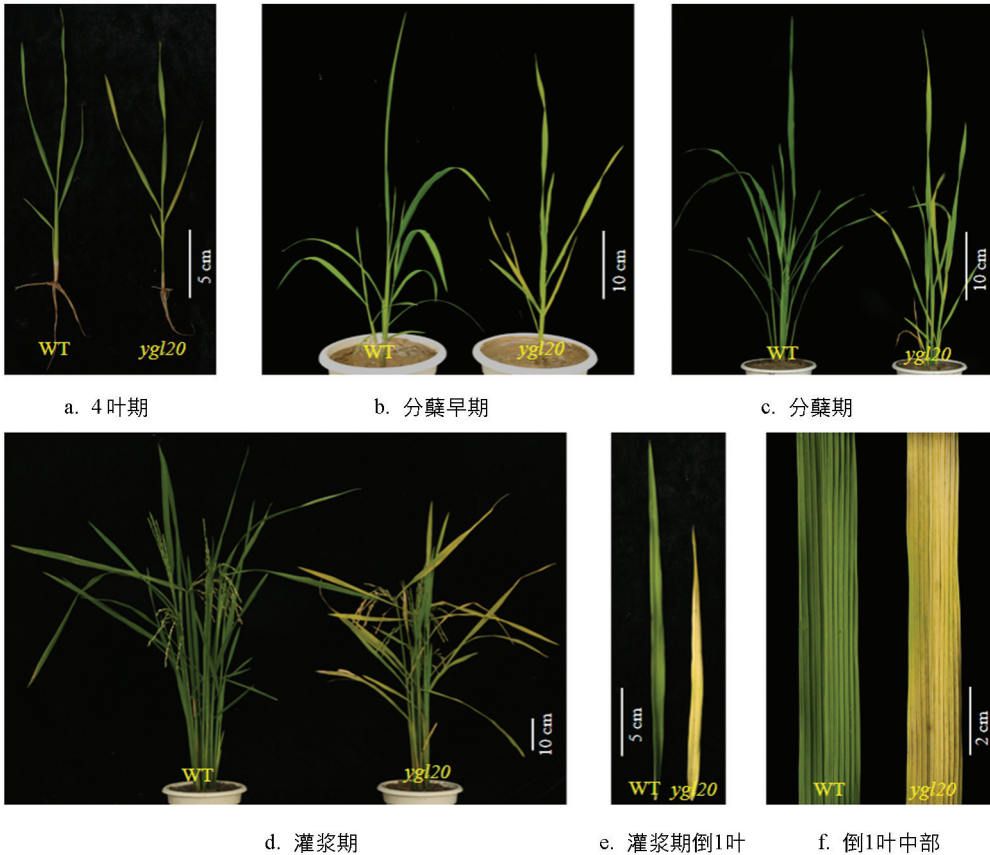


图 1 野生型 WT 与突变体 *yg120* 的表型

表 1 野生型 WT 与突变体 *yg120* 的农艺性状

性状	WT	<i>yg120</i>	<i>p</i> 值
株高/cm	80.75±4.36	69.32±3.05	2.34×10^{-6}
分蘖数/个	9.10±1.73	5.30±1.64	8.37×10^{-5}
穗长/cm	22.32±1.35	20.52±1.64	0.015 7
一次枝梗数/个	10.40±1.07	9.50±0.97	0.065 2
二次枝梗数/个	29.40±2.84	23.89±2.80	0.000 5
每穗总粒数/粒	151.10±23.01	132.50±13.07	0.039 3
每穗实粒数/粒	133.30±22.61	105.10±11.48	0.002 5
结实率/%	88.01±3.28	79.32±3.44	1.77×10^{-5}
千粒质量/g	22.51±1.08	20.28±0.68	0.038 8

2.2 光合色素含量与光合效率分析

在抽穗期，从野生型 WT 和突变体 *yg120* 植株倒 1 叶(Top1)、倒 2 叶(Top2)和倒 3 叶(Top3)中提取叶绿素 a(Chla)、叶绿素 b(Chlb)、总叶绿素(ChlT)和类胡萝卜素(Car)，结果显示，*yg120* 叶片中光合色素含量较 WT 均显著降低($p<0.01$ ，图 2a-2c)。与 WT 相比，*yg120* 的 Top1 中 Chla、Chlb、ChlT 和 Car 质量分数分别下降了 91.85%、93.95%、92.32%和 79.60%，Top2 中下降了 84.43%、88.97%、85.49%

和 67.61%, Top3 中下降了 63.97%、60.72%、63.23%和 56.69%。结果表明, 突变体 *yg120* 黄绿色表型主要是由叶片中光合色素含量极显著降低所致, 且其 Top1、Top2 和 Top3 光合色素含量呈梯度降低, 与其黄化程度减弱的表型相一致。

为探讨叶片颜色变化对光合效率的影响, 在抽穗期测定了野生型 WT 和突变体 *yg120* 的光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、胞间 CO_2 浓度(C_i)、蒸腾速率(T_r)等 4 个光合参数。结果显示, *yg120* 的 P_n 、 G_s 和 T_r 分别下降了 57.02%、28.04%、20.97%, 均极显著低于 WT ($p < 0.01$, 图 2d、2e、2g), C_i 则显著增加(16.22%, $p < 0.05$, 图 2f), 推测 *yg120* 叶色变化引起 G_s 降低, 从而使光合作用和蒸腾作用减弱, 导致细胞间 CO_2 浓度的积累。

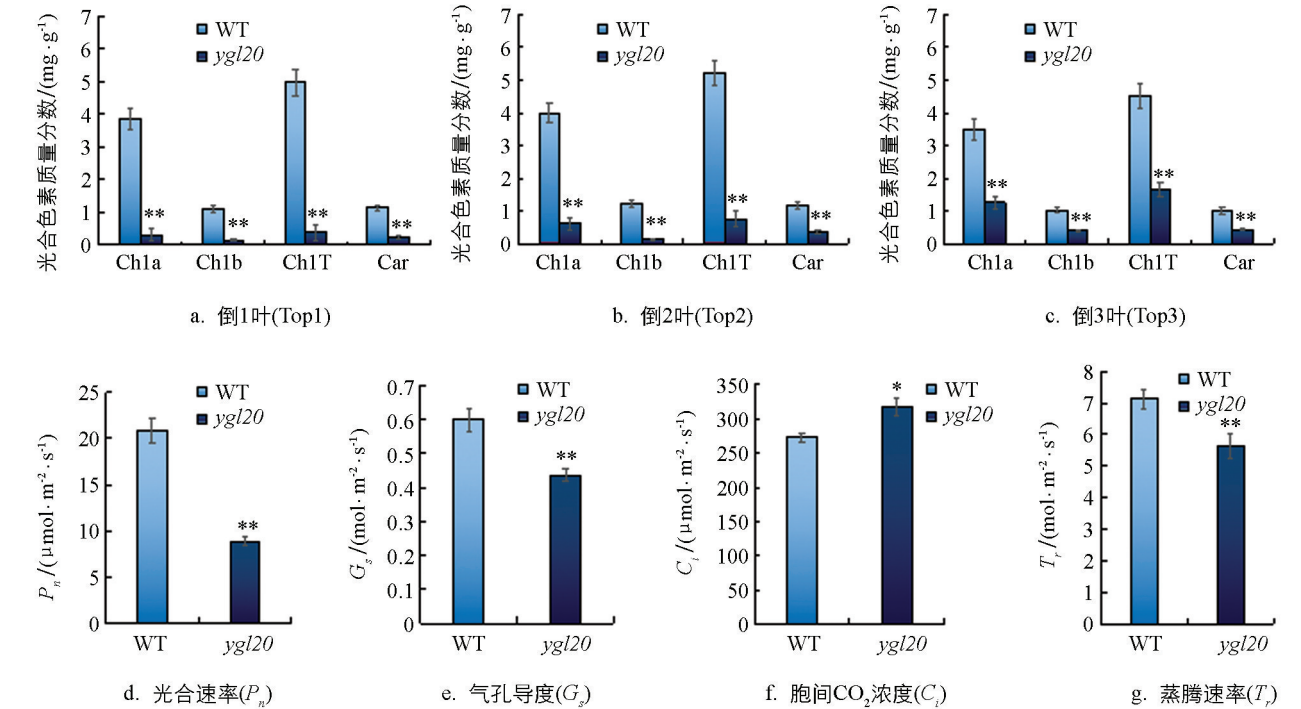


图 2 抽穗期野生型 WT 和突变体 *yg120* 光合色素质量分数和光合效率

2.3 细胞学观察

利用透射电镜对苗期野生型 WT 和突变体 *yg120* 倒 1 叶中部进行观察, 结果显示, WT 和 *yg120* 的叶肉细胞中均显示出发育良好的膜系统, 叶绿体呈贴壁分布, 体内有基粒片层。WT 叶绿体基粒丰富, 基质片层紧密排列(图 3a), 但 *yg120* 叶绿体中嗜饿小体增多, 基粒堆积密度低, 基质片层疏松, 类囊体含有多个空泡(图 3b), 表明 *yg120* 叶绿体发育异常或遭到破坏。除叶绿体的变化外, WT 的细胞内淀粉颗粒也比 *yg120* 多($p < 0.01$, 图 3g), 说明 WT 的光合能力更强, 导致淀粉颗粒在叶片细胞中积累更多。

2.4 突变性状的遗传分析和目标基因的分子定位

用叶片颜色正常的恢复系缙恢 10 号(JH10)与突变体 *yg120* 杂交, F_1 代植株的叶色与 JH10 相同, F_2 代群体中则出现明显的分离, 出现正常表型和黄绿叶表型。在被调查 F_2 代群体的 3 579 株中, 2 713 株具有正常叶色, 其余 866 株为突变样的黄绿叶。卡方测验结果显示, 正常株与突变株的分离比为 3.13, 符合 3 : 1 理论比例($\chi^2 = 1.23 < \chi^2_{0.05, 0.01} = 3.84$), 表明突变体 *yg120* 的黄绿叶性状由 1 对隐性核基因控制。

从 F_2 代群体中随机选取 10 株正常株和 10 株突变株, 分别构建正常表型基因池和突变表型基因池。利用筛选到的 80 对 JH10 和西农 1B 之间的多态性标记, 扩增亲本、正常基因池及突变基因池。结果表明, 第 2 染色体长臂上的标记 RM13986 在两个基因池间存在差异, 预测该标记可能与 *YGL20* 基因连锁。利用 92 株 F_2 代黄绿叶单株验证, 确定 RM13986 与 *YGL20* 连锁。在 RM13986 附近开发新的具有多态性的 InDel 和 SSR 标记, 最终将 *YGL20* 基因初步定位在标记 ZW2-12 和 RM13986 之间(图 4a、4b);

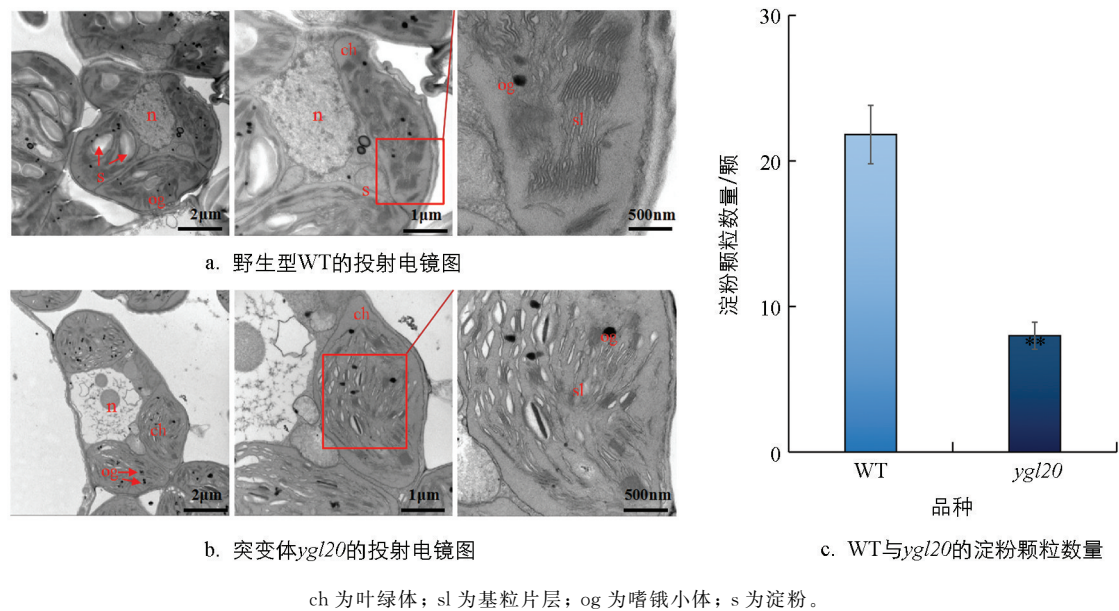
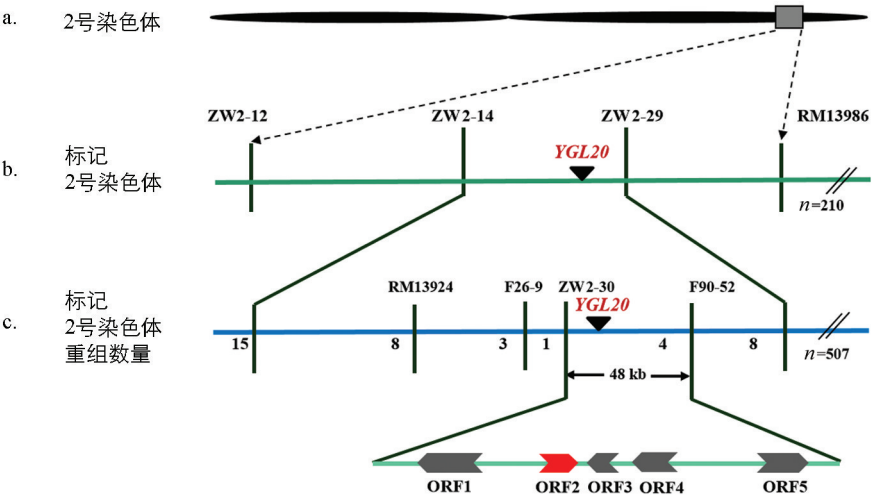


图 3 野生型 WT 和突变体 ygl20 的倒 1 叶叶片细胞结构

进一步设计筛选标记对 *YGL20* 进行精细定位(表 2); 最后检测到 ZW2-12 与 RM13986 标记区间存在重组的 5 个多态性标记 ZW2-14、F26-9、ZW2-30、F90-52 和 ZW2-29(图 4b、4c)。根据重组结果, 将 *YGL20* 精细定位在 ZW2-30 与 F90-52 之间 48 kb 的物理范围内(图 4c)。



a 为 *YGL20* 在 chr2 上的初步定位; b 为 210 个隐性 F_2 代个体的 *YGL20* 定位; c 为 507 个 F_2 代隐性个体对 *YGL20* 的精细定位和候选物理区域的标注。

图 4 *YGL20* 的分子定位

表 2 第 2 染色体上新开发的连锁标记引物

标记	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
ZW2-12	CTTCGGATATACGAGGCTGTTC	GATGCTATCAGCTTGCCGCT
ZW2-14	GCCGATGATAAACACCGGAG	GGGCTGGTTCACGTACTACTA
F26-9	TGCACAATGTGCTCAAGCA	TTCTGCCCTACGCATTCTAA
ZW2-30	CGCTTAATTGTGGTCAGGCTC	ATCTCAGTCAGACGGCCATTG
F90-52	CTACCTAAGAGTTTTCAACCTGC	GCCAAATCTCAGAATACATCATG
ZW2-29	CACAGATTGAGTTTGAATCTGAAGC	CTCTGCCTCTAAGCCATTCTATCTC

2.5 候选基因分析

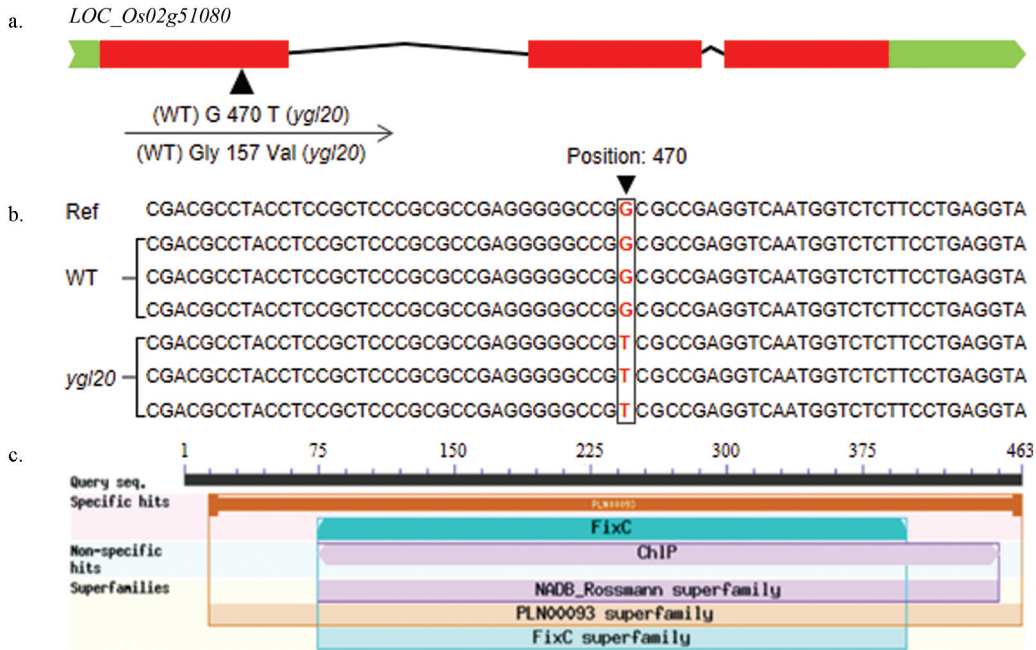
根据 Gramene 数据库(www.gramene.org)的检索结果,在精细定位的物理区域内标注了 5 个开放阅读框 ORFs(Open Reading Frame),即 ORF1-5,分别编码淀粉合成酶Ⅱ、牻牛儿基牻牛儿基还原酶、含 RWP-RK 结构域的蛋白质、砷泵驱动 ATP 酶和硅内流转运蛋白基因(表 3)。

表 3 精细定位的物理区间内注释基因

开放阅读框	基因名称	基因注释
ORF1	<i>LOC_Os02g51070</i>	淀粉合成酶Ⅱ
ORF2	<i>LOC_Os02g51080</i>	牻牛儿基牻牛儿基还原酶
ORF3	<i>LOC_Os02g51090</i>	含 RWP-RK 结构域的蛋白质
ORF4	<i>LOC_Os02g51100</i>	砷泵驱动 ATP 酶
ORF5	<i>LOC_Os02g51110</i>	硅内流转运蛋白基因

为进一步确定目的基因,设计特异性引物,扩增野生型 WT 和突变体 *ycl20* 中上述 5 个 ORF 的基因序列。比对结果显示,ORF1 和 ORF3/4/5 在 WT 和 *ycl20* 之间具有相同的序列,而在 ORF2 第 1 外显子 470 位,即 *LOC_Os02g51080*,检测到从 G(WT)到 T(*ycl20*)的替换,导致编码的氨基酸从甘氨酸(Gly, WT)变为缬氨酸(Val, *ycl20*)(图 5a)。对 Gramene 数据库(Ref)中的序列进行进一步比对,并从 WT 和 *ycl20* 中扩增,结果显示,Ref 和 WT 在 470 位点处具有相同的 G 碱基,而 *ycl20* 的所有拷贝在同一位置都具有变化的 T 碱基(图 5b)。除了 470 位点的碱基替换外,Ref、WT 和 *ycl20* 的所有拷贝都具有相同的序列。综上所述,*LOC_Os02g51080* 被预测为 *YGL20* 的候选基因。

YGL20 (*LOC_Os02g51080*)具有 3 个外显子和 2 个内含子(图 5a),编码产物 *YGL20* 含有 463 个氨基酸,分子量为 50 kDa(图 5c)。基于 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 BLAST 比对结果显示,*YGL20* 在水稻中发挥着牻牛儿基牻牛儿基还原酶的功能(表 3)。



a 为 *YGL20* 候选基因 *LOC_Os02g51080* 的结构(左右绿色条分别为 5' UTR 和 3' UTR, 红色条为外显子, 黑色线为内含子); b 为部分 DNA 序列比对外显子覆盖 470 位(Ref 为 Gramene 数据库中 *LOC_Os02g51080* 的参考序列, 突变碱基用红色粗体标记); c 为 *YGL20* 候选基因 *LOC_Os02g51080* 编码的预测特征蛋白。

图 5 候选基因 *YGL20* 的测序比对和蛋白结构域示意图

由于 *LOC_Os02g51080* 被标注为光诱导黄叶 1 号, 因此我们设计了遮光试验, 以揭示 *YGL20* 控制的黄绿叶表型是否也有光诱导。结果显示, 遮荫处理后的 *yg120* 叶片中 Chla、Chlb、ChlT 和 Car 含量均高于 WT 处理, 其中, *yg120* 的 ChlT 含量显著高于 WT 处理。此外, 比较 WT 和 *yg120* 植株倒 1 叶(Top1)遮荫部分和未遮荫部分叶绿素含量的变化, 观察到在遮荫处理期间, 有明显的光诱导颜色变化(图 6a、6b)。

遮荫处理 8 d 时, *yg120* 的 4 叶区 Chla、Chlb、ChlT 和 Car 含量均低于 WT, 但仅有 Chlb 和 ChlT 差异存在统计学意义($p<0.05$, 图 6d)。延长遮荫时间至 16 d 时, 处理叶区中 *yg120* 的 Chla 和 ChlT 含量显著高于 WT($p<0.05$, 图 6e), 与未遮荫处理和遮荫 8 d 的结果(图 6c、6d)相反。遮荫处理的结果表明, *yg120* 的叶片颜色变化受光诱导, 这一结果也进一步证实了 *LOC_Os02g51080* 是 *YGL20* 的目标基因。

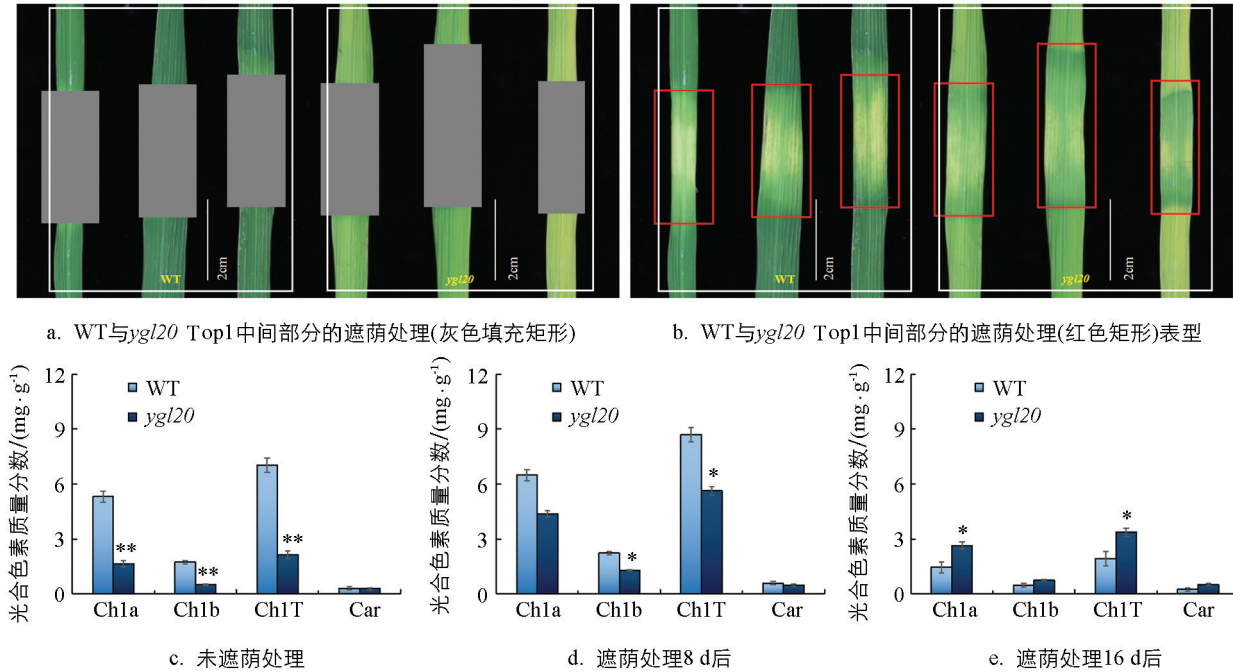


图 6 抽穗期遮荫处理后野生型(WT)和 *yg120* 光合色素质量分数变化

2.6 YGL20 及其相关基因表达分析

qRT-PCR 结果表明, *YGL20* 在根、茎、叶、叶鞘和幼穗等器官中均有表达, 其中在叶片中的相对表达量最高, 分别是叶鞘和茎的 6.2 倍和 9.6 倍, 而在根和幼穗组织中相对表达量最低, 显示出组织特异性的趋势(图 7a)。与野生型 WT 相比, *YGL20* 基因在突变体 *yg120* 中表达水平极显著降低; 随着 *YGL20* 的表达变化, 另 17 个光合作用相关基因也发生了相应的变化, 即 HEMA 表达上调, 其他 16 个基因表达下调(图 7b)。叶绿素代谢途径相关调控基因 *CHLM*、*DVR*、*CAO1* 和 *PORA* 在 *yg120* 中的表达量较 WT 分别下降了 52.33%、57.52%、89.25%和 31.22%。类胡萝卜素代谢途径相关基因 *PSY1* 和 *PSY2* 在 *yg120* 中的表达量仅略有下降(图 7b)。光系统 I 复合物(PS I)、光系统 II 复合物(PS II)和细胞色素 b6f 复合物是类囊体膜上重要的蛋白质复合物, 与 WT 相比, *yg120* 的 3 个 PS I 编码基因(*psaA*、*psaB*、*psaC*)、3 个 PS II 编码基因(*psbA*、*psbB*、*psbC*)和 2 个细胞色素 b6f 编码基因(*petA*、*petB*)的表达量均显著下调, 相应的下调幅度分别为 33.26%、36.51%、47.22%、40.35%、39.28%、47.36%、59.21%、77.65%(图 7b)。

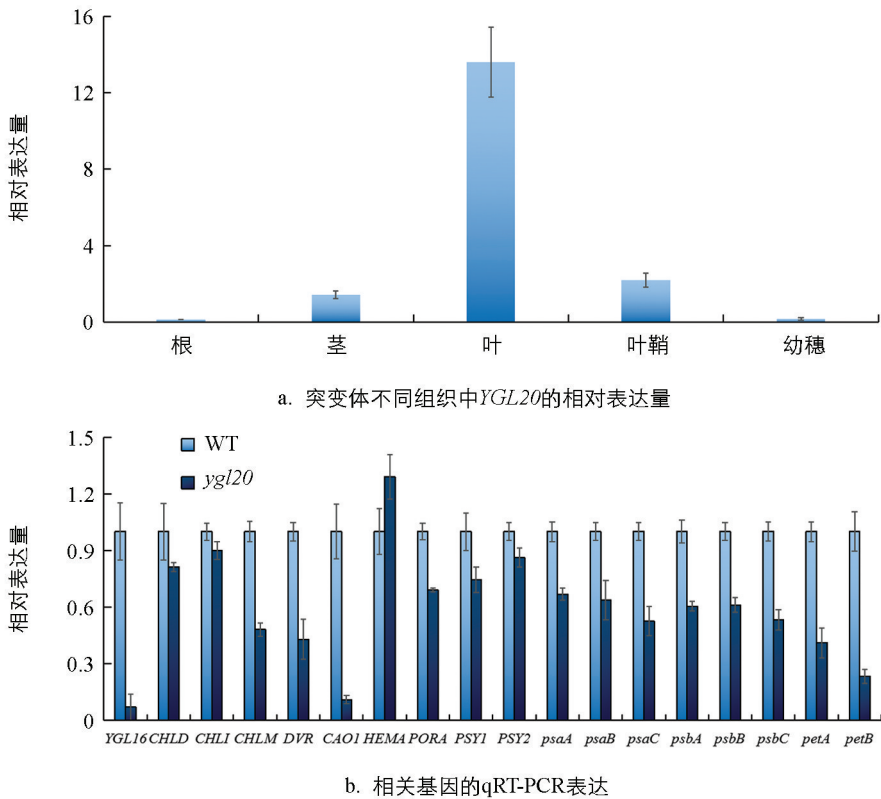


图 7 YGL20 及光合相关基因的表达分析

3 讨论与结论

3.1 讨论

水稻叶片颜色突变是常见的突变性状, 通常发生在苗期, 表现为叶片颜色从正常绿色到不同的异常表型, 如黄色、浅黄色、浅绿色、条纹、斑点和白化^[31-32]。叶绿素是光合作用必不可少的分子, 负责在天线系统中收集和传输太阳能, 以及在反应中心实现电荷分离和电子传递^[33]。光合色素含量直接影响光合效率, 最终反映在作物产量的相关性状上^[34], 因此叶色是作物育种中重要的性状之一, 叶绿体发育与调控的分子机制在分子生物学和遗传学领域得到了广泛的研究^[35]。

叶色相关基因突变通常会直接或间接影响叶绿素的合成与降解^[36], *OsCAO* 编码叶绿素 a 加氧酶, 从水稻中分离到两个同源基因 *OsCAO1* 和 *OsCAO2*, 参与叶绿素 a 合成叶绿素 b 的催化过程。突变后, 叶绿素含量降低, 叶绿素 a/叶绿素 b 比值升高, 叶片呈浅绿色^[37]。*OsPORA* 和 *OsPORB* 是水稻中的 NADPH (原叶绿素酸酯氧化还原酶 A 和 B), 催化叶绿素合成中的原叶绿素酸酯还原成叶绿素酸酯, 也是黄化质体中原片层体形成所必需。*OsPORB* 在整个叶片发育过程中, 尤其在高光下, 是叶绿素合成所必需, 而 *OsPORA* 主要在叶片发育早期起作用^[8]。*OsSGR* 编码产物属于一类古老的蛋白, 含有一段预测的叶绿体转运肽。*OsSGR* 可能参与调节或直接介导脱镁叶绿酸加氧酶(PaO)的活性, 也可能影响叶绿素的分解和色素蛋白复合物的降解, 其突变后叶片呈现永绿色^[11]。本研究黄绿叶突变体 *yg120* 整个生育期均呈现黄绿色, 且倒 1 叶黄化程度最严重。光合色素测定表明, 与野生型 WT 相比, 孕穗期 *yg120* 叶片中 Chla、Chlb、ChlT 和 Car 含量显著降低, 表明 *yg120* 的黄绿叶表型可能是由于叶绿素和类胡萝卜素含量极显著降低所致。*yg120* 植株叶片黄化程度在倒 1、2、3 叶依次减弱, 可能是由于倒 1、2、3 叶光合色素含量依次增加所致。定量分析结果显示, *psaA*、*psaB* 和 *psaC* 在 *yg120* 中的表达量显著低于 WT, *psbA*、*psbB* 和 *psbC* 是 PSII 反应中心蛋白的主要成分, 表达量也显著下调, 表明 *yg120* 中编码 PS I 和 PS II 相关蛋白表达量的下调可能会影响其正常功能, 阻碍对光的响应, 导致 *yg120* 叶片光合速率降低, 因此推测 YGL20 基因突变影

响光合色素的合成和正常的光合作用过程,最终导致叶片黄化、光合速率降低。

在水稻分子生物学和遗传学研究中,由于基因突变具有随机性,许多基因具有多个突变位点。不同的突变位点可能引起叶绿体发育和色素含量差异,从而导致突变植株出现不同的表型^[38-39]。随着越来越多的等位基因被发现,对多个等位基因的研究不仅有助于对该基因进行系统完整的研究,还有助于对该基因功能进行更为详尽地认识和补充,为进一步研究叶绿素分子合成和叶色调控网络提供新的信息。本研究中的候选基因 *YGL20* (*LOC_Os02g51080*) 被定位于第 2 染色体长臂,位于 SSR 标记 ZW2-30 和 F90-52 之间约 48 kb 的区域内。该基因可能是水稻黄绿叶基因 *LYL1*、*YGL2* 的等位基因。*LYL1* 编码牻牛儿基牻牛儿基还原酶,参与了水稻牻牛儿基牻牛儿基叶绿素(Chl-geranylgeranylated, Chl_{GG})和牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(Geranylgeranyl Pyrophosphate, GGPP)到叶绿素叶绿醇(Chl-phytol, Chl_{phy})和植基焦磷酸(Phytyl Pyrophosphate, PPP)的还原步骤^[40]。*lyl1-1* 突变体的 *LYL1* 基因在第 1 外显子 182 bp 处由 C 变为 T,导致编码蛋白的丙氨酸残基变为缬氨酸,突变体植株在整个生育期表现为动态的黄叶表型^[41]。*YGL2* 同样编码牻牛儿基牻牛儿基还原酶,在突变体 *yg12* 中,位于 *YGL2* 第 3 外显子的单个碱基变化(T1361G),导致编码产物的错义突变(L454R)^[42]。与 *LYL1*、*YGL2* 相比,*YGL20* 的突变位置有一定差异,其在第 1 外显子第 470 位碱基由 G 变成 T,导致蛋白序列的第 157 位氨基酸由甘氨酸变为缬氨酸,候选基因可能是 *LYL1*、*YGL2* 的等位基因^[43]。

叶色突变体特征明显,易于识别,可作为叶色标记用于良种繁育^[44]。*YGL20* 编码牻牛儿基牻牛儿基还原酶,目前对该酶的研究甚少,水稻作为单子叶模式作物,克隆并研究其酶学功能和作用机制对进一步揭示叶绿素生物合成具有重要意义,因此,*yg120* 可作为进一步研究叶绿素合成和叶色分子机制的遗传材料。

3.2 结论

yg120 全生育期叶片呈黄绿色,同时光合色素含量和光合速率降低。叶片黄化导致分蘖数、株高、穗长、一次枝梗数、每穗实粒数及千粒质量下降。*yg120* 的叶色受 1 对隐性核基因控制,*YGL20* 位于第 2 染色体标记 ZW2-30 和 F90-52 之间约 48 kb 的物理距离内,包含 5 个注释基因。序列比对发现,编码牻牛儿基牻牛儿基还原酶 *LOC_Os02g51080* 是 *YGL20* 靶标。qRT-PCR 结果显示,*YGL20* 主要在叶片中表达,其表达的显著下调严重影响了光合色素代谢及光合相关基因的表达。

参考文献:

- [1] 张战辉,张慧,李伟亚,等. RNA 解旋酶参与植物叶片衰老调控研究进展 [J]. 河南农业大学学报, 2022, 56(2): 171-179.
- [2] FENG B H, YANG Y, SHI Y F, et al. Genetic Analysis and Gene Mapping of *Light Brown Spotted Leaf* Mutant in Rice [J]. Rice Science, 2013, 20(1): 13-18.
- [3] WANG Z W, LV J, XIE S Z, et al. *OsSLA4* Encodes a Pentatricopeptide Repeat Protein Essential for Early Chloroplast Development and Seedling Growth in Rice [J]. Plant Growth Regulation, 2018, 84(2): 249-260.
- [4] LEE S, KIM J H, YOO E S, et al. Differential Regulation of Chlorophyll a Oxygenase Genes in Rice [J]. Plant Molecular Biology, 2005, 57(6): 805-818.
- [5] GOH C H, SATOH K, KIKUCHI S, et al. Mitochondrial Activity in Illuminated Leaves of Chlorophyll-deficient Mutant Rice (*OsCHLH*) Seedlings [J]. Plant Biotechnology Reports, 2010, 4(4): 281-291.
- [6] 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*) [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99564.
- [7] ZHANG H, LIU L L, CAI M H, et al. A Point Mutation of Magnesium Chelatase *OsCHLI* Gene Dampens the Interaction between *CHLI* and *CHLD* Subunits in Rice [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2015, 33(6): 1975-1987.
- [8] 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 [J]. The Plant Journal, 2013, 74(1): 122-133.
- [9] WU Z M, ZHANG X, HE B, et al. A Chlorophyll-deficient Rice Mutant with Impaired Chlorophyllide Esterification in

- Chlorophyll Biosynthesis [J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(1): 29-40.
- [10] KONG W Y, YU X W, CHEN H Y, et al. The Catalytic Subunit of Magnesium-protoporphyrin IX Monomethyl Ester Cyclase Forms a Chloroplast Complex to Regulate Chlorophyll Biosynthesis in Rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2016, 92(1): 177-191.
- [11] JIANG H W, LI M R, LIANG N T, et al. Molecular Cloning and Function Analysis of the Stay Green Gene in Rice [J]. *The Plant Journal*, 2007, 52(2): 197-209.
- [12] KUSABA M, ITO H, MORITA R, et al. Rice NON-YELLOW COLORING1 is Involved in Light-harvesting Complex II and Grana Degradation during Leaf Senescence [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(4): 1362-1375.
- [13] YAMATANI H, SATO Y, MASUDA Y, et al. NYC4, the Rice Ortholog of Arabidopsis *THF1*, is Involved in the Degradation of Chlorophyll - Protein Complexes during Leaf Senescence [J]. *The Plant Journal*, 2013, 74(4): 652-662.
- [14] 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 [J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(1): 227-238.
- [15] LI J Q, WANG Y H, CHAI J T, et al. *Green-revertible Chlorina 1 (Grc1)* is Required for the Biosynthesis of Chlorophyll and the Early Development of Chloroplasts in Rice [J]. *Journal of Plant Biology*, 2013, 56(5): 326-335.
- [16] LIN D, JIANG Q, ZHENG K, et al. Mutation of the Rice *ASL2* Gene Encoding Plastid Ribosomal Protein L21 Causes Chloroplast Developmental Defects and Seedling Death [J]. *Plant Biology*, 2015, 17(3): 599-607.
- [17] LIU X, YI X, YANG Y R, et al. A Rice Geranylgeranyl Reductase is Essential for Chloroplast Development [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2021, 20(10): 2592-2600.
- [18] JIANG H Z, ZHANG A P, RUAN B P, et al. Identification of *Green-revertible Yellow 3 (GRY3)*, Encoding a 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl Diphosphate Reductase Involved in Chlorophyll Synthesis under High Temperature and High Light in Rice [J]. *The Crop Journal*, 2023, 11(4): 1171-1180.
- [19] LV Y S, SHAO G N, QIU J H, et al. *White Leaf and Panicle 2*, Encoding a PEP-associated Protein, is Required for Chloroplast Biogenesis under Heat Stress in rice Open Access [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(18): 5147-5160.
- [20] ZHOU L G, LIU Z C, LIU Y H, et al. A Novel Gene *OsAHL1* Improves both Drought Avoidance and Drought Tolerance in Rice [J]. *Scientific Reports*, 2016(6): 30264.
- [21] MA J, WANG Y F, MA X D, et al. Disruption of Gene *SPL35*, Encoding a Novel CUE Domain-containing Protein, Leads to Cell Death and Enhanced Disease Response in Rice [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(8): 1679-1693.
- [22] SHENG Z H, LV Y S, LI W, et al. *Yellow-Leaf 1* Encodes a Magnesium-Protoporphyrin IX Monomethyl Ester Cyclase, Involved in Chlorophyll Biosynthesis in Rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177989.
- [23] CHEN H, CHENG Z J, MA X D, et al. A Knockdown Mutation of *YELLOW-GREEN LEAF2* Blocks Chlorophyll Biosynthesis in Rice [J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(12): 1855-1867.
- [24] SATO Y, MORITA R, KATSUMA S, et al. Two Short-chain Dehydrogenase/Reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are Required for Chlorophyll b and Light-Harvesting complex II Degradation during Senescence in Rice [J]. *The Plant Journal*, 2009, 57(1): 120-131.
- [25] 施军琼, 王亚琴, 张天泉, 等. 水稻黄绿叶基因 *Yellow-Green Leaf 6 (YGL6)* 的表达模式与蛋白定位 [J]. *作物学报*, 2018, 44(5): 650-656.
- [26] ZHU X Y, GUO S, WANG Z W, et al. Map-based Cloning and Functional Analysis of *YGL8*, which Controls Leaf Colour in Rice (*Oryza sativa*) [J]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1): 134.
- [27] SHAN X Q, WANG H O, ZHANG S Z, et al. Accumulation and Uptake of Light Rare Earth Elements in a Hyperaccumulator *Dicroptheris Dichotoma* [J]. *Plant Science*, 2003, 165(6): 1343-1353.
- [28] LICHTENTHALER H K. Chlorophylls and Carotenoids; Pigments of Photosynthetic Biomembranes [J]. *Methods in Enzymology*, 1987, 148: 350-382.
- [29] PANAUD O, CHEN X, MCCOUCH S R. Development of Microsatellite Markers and Characterization of Simple

- Sequence Length Polymorphism (SSLP) in Rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Molecular and General Genetics MGG, 1996, 252(5): 597-607.
- [30] WANG Y, ZHU Z, SUN Y, et al. Identification of a Novel *D3* Allele Playing a Role in Nitrogen Utilization [J]. Euphytica, 2020, 216(3): 55.
- [31] GUSTAFSSON Å. The Plastid Development in Various Types of Chlorophyll Mutations [J]. Hereditas, 1942, 28(3-4): 483-492.
- [32] AWAN M A, KONZAK C F, RUTGER J N, et al. Mutagenic Effects of Sodium Azide in Rice [J]. Crop Science, 1980, 20(5): 663-668.
- [33] MASUDA T. Recent Overview of the Mg Branch of the Tetrapyrrole Biosynthesis Leading to Chlorophylls [J]. Photosynthesis Research, 2008, 96(2): 121-143.
- [34] CHEN N G, WANG P R, LI C M, et al. A Single Nucleotide Mutation of the *IspE* Gene Participating in the MEP Pathway for Isoprenoid Biosynthesis Causes a Green-reversible Yellow Leaf Phenotype in Rice [J]. Plant and Cell Physiology, 2018, 59(9): 1905-1917.
- [35] SHEN L, ZHANG Q, WANG Z W, et al. OsCAF2 Contains Two CRM Domains and is Necessary for Chloroplast Development in Rice [J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 381.
- [36] HAN S H, SAKURABA Y, KOH H J, et al. Leaf Variegation in the Rice *Zebra2* Mutant is Caused by Photoperiodic Accumulation of Tetra-Cis-lycopene and Singlet Oxygen [J]. Molecules and Cells, 2012, 33(1): 87-97.
- [37] YANG Y L, XU J, HUANG L C, et al. *PGL*, Encoding Chlorophyllide a Oxygenase 1, Impacts Leaf Senescence and Indirectly Affects Grain Yield and Quality in Rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(5): 1297-1310.
- [38] MORITA R, SATO Y, MASUDA Y, et al. Defect in Non-yellow Coloring 3, an α/β Hydrolase-fold Family Protein, Causes a Stay-green Phenotype during Leaf Senescence in Rice [J]. The Plant Journal, 2009, 59(6): 940-952.
- [39] YOO S C, CHO S H, SUGIMOTO H, et al. Rice *Virescent3* and *Stripe1* Encoding the Large and Small Subunits of Ribonucleotide Reductase are Required for Chloroplast Biogenesis during Early Leaf Development [J]. Plant Physiology, 2009, 150(1): 388-401.
- [40] ZHANG Q, SHEN L, WANG Z W, et al. *OsCAF1*, a CRM Domain Containing Protein, Influences Chloroplast Development [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(18): 4386.
- [41] ZHOU Y, GONG Z Y, YANG Z F, et al. Mutation of the *Light-Induced Yellow Leaf 1* Gene, which Encodes a Geranylgeranyl Reductase, Affects Chlorophyll Biosynthesis and Light Sensitivity in Rice [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75299.
- [42] LIU C H, ZHU H T, XING Y, et al. *Albino Leaf 2* is Involved in the Splicing of Chloroplast Group I and II Introns in Rice Open Access [J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(18): 5339-5347.
- [43] DU Z X, HAO H Y, HE J P, et al. *GraS* is Critical for Chloroplast Development and Affects Yield in Rice [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2020, 19(11): 2603-2615.
- [44] HUANG R, WANG Y, WANG P R, et al. A Single Nucleotide Mutation of *IspF* Gene Involved in the MEP Pathway for Isoprenoid Biosynthesis Causes Yellow-green Leaf Phenotype in Rice [J]. Plant Molecular Biology, 2018, 96(1): 5-16.