

# 一个水稻苗期黄化叶突变体基因的定位

项显波<sup>1</sup>, 吴 晶<sup>1</sup>, 丁沃娜<sup>2</sup>, 朱世华<sup>2\*</sup>

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学 科学技术学院, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 通过筛选甲基磺酸乙酯(Ethyl Methane Sulfonate, EMS)诱变的籼稻 Kasalath 突变体库, 得到一个黄化叶突变体 *Osy11*(*Oryza sativa yellow leaf 1*), 在二叶期前该突变体叶色黄化, 后期突变体叶色逐渐恢复到野生型水平. 遗传分析显示 *Osy11* 突变性状受一对隐性基因控制, 经图位克隆技术将 *OsYLI* 基因定位在水稻第 3 染色体上的 STS(Sequence Tagged Site)标记 S5362 和 S5845 之间, 物理距离约为 483 kb, 在该区间内无已知黄化叶相关基因. 对 *OsYLI* 基因的定位, 为该基因的克隆打下基础.

**关键词:** 水稻; 黄化叶突变体; 基因定位

**中图分类号:** S511

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-5132 (2015) 03-0005-04

叶片作为主要的光合作用器官, 对水稻的产量和品质有着重要影响<sup>[1]</sup>. 叶片的光合作用首先要通过光合色素吸收光能, 光合色素包括叶绿素和类胡萝卜素, 其中叶绿素含量对水稻的光合速率和光合产物的形成有着直接的影响<sup>[2-3]</sup>. 水稻叶色突变的发生多与叶绿素合成或降解、叶绿体的发育等因素有关<sup>[4]</sup>. 因此, 叶色突变体是研究水稻光合作用机理、叶绿素合成途径、叶绿体发育机制等的良好材料, 能够为分子水平上改良光能利用、培育高光效品种和提高水稻产量提供资源.

水稻叶片黄化是叶色突变类型中的一种, 目前已克隆多个与水稻黄化叶相关的基因<sup>[5-6]</sup>. 其中 *OsPAPST1*、*YGL1*、*YLC1* 和 *YLC2* 基因突变后造成的黄化叶色会随着水稻的生长逐渐恢复成绿色<sup>[7-10]</sup>. 而 *OsDVR* 和 *YGL138(t)* 基因功能缺失引起的黄化叶色则维持水稻整个生命周期<sup>[11-12]</sup>. 研究发现一些黄化叶色相关基因的表达与光照相关, 如 *OsPORB*、*OsCAOI* 和 *LYL1* 基因<sup>[13-15]</sup>. *OsPORB* 基因在高光照条件下表达量增加, 其编码的原叶绿素酸脂氧化还原酶 B 蛋白是光照条件下合成叶绿素所必须的, 该基因突变后的新生叶的叶色在高光照下会迅速黄化<sup>[13]</sup>. *OsCAOI* 基因的表达也受光

照诱导, 在黑暗中表达下降, 该基因编码水稻叶绿素 a 加氧酶是叶绿素 b 合成的关键酶<sup>[14]</sup>. *LYL1* 有 2 个等位突变体 *lyl1-1* 和 *502ys*, *lyl1-1* 叶色在高光胁迫下黄化, *502ys* 在整个生长周期内叶色黄化<sup>[15-16]</sup>. 此外, 温度对水稻叶色也有影响, 在低温条件下 *yg12* 突变体的叶色与野生型差异加剧, 在高温条件下 *ylc1* 突变体的叶色会加快恢复绿色的速度<sup>[9,17]</sup>.

笔者从 EMS 诱变的籼稻 Kasalath 突变体库中筛选到一个黄化叶突变体 *Osy11*, 该突变体叶色在二叶期前黄化, 在二叶期后叶色逐渐恢复到野生型水平. 在对 *Osy11* 表型观察和遗传分析的基础上, 对突变基因 *OsYLI* 进行了基因定位, 为该基因的克隆和功能研究打下了基础.

## 1 材料和方法

### 1.1 水稻材料

突变体 *Osy11* 由籼稻品种 Kasalath 经 EMS 诱变获得, 通过不断自交种植确认突变性状能够稳定遗传.

### 1.2 突变体的表型鉴定

种子经自来水冲洗干净后, 用 0.6% 稀 HNO<sub>3</sub> 破休眠处理 16 h, 更换清水置于 37 °C 恒温箱内催

收稿日期: 2014-12-02.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(31371595); 宁波大学胡岗优秀博士基金.

第一作者: 项显波(1989-), 男, 浙江温州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水稻分子生物学. E-mail: xiangxianbo@163.com

\*通信作者: 朱世华(1963-), 男, 浙江宁波人, 博士/教授, 主要研究方向: 水稻分子生物学. E-mail: zhushihua@nbu.edu.cn

芽. 露白后播种至漂浮于水稻培养液(略作改动, 将  $\text{Fe}^{3+}$  调整为  $\text{Fe}^{2+}$ )的尼龙网纱上<sup>[18]</sup>. 培养温度为  $30^\circ\text{C}/22^\circ\text{C}$ (昼/夜), 光照 12 h, 湿度 80%, 培养液 pH 值为 5.5. 培养 7 d 和 21 d 后, 用相机(Nikon D5000)对植株进行拍摄.

### 1.3 突变体的遗传分析

将 *Osy11* 纯合体做为母本, 野生型 Kasalath 作为父本杂交获得  $F_1$  种子, 观察  $F_1$  植株表型确定基因的显隐性. 用  $F_1$  自交后得到  $F_2$  代, 发芽成苗进行表型观察和  $\chi^2$  测验, 按照孟德尔遗传规律分析突变表型是否由单基因控制.

### 1.4 基因的定位

将 *Osy11* 与粳稻品种日本晴杂交构建  $F_2$  定位群体, 作为突变体基因的定位材料, 具体定位方法可参考宁永强等<sup>[19]</sup>. 水稻基因组 DNA 采用 TPS 提取法<sup>[20]</sup>. PCR 反应体系: DNA 模板  $1\ \mu\text{L}$ 、 $10\times\text{PCR}$  Buffer  $1\ \mu\text{L}$ 、 $2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP  $0.3\ \mu\text{L}$ 、 $25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$   $1.2\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  引物各  $0.3\ \mu\text{L}$ 、 $5\ \text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  Taq 酶  $0.1\ \mu\text{L}$ 、超纯水补足至  $10\ \mu\text{L}$ . 扩增产物经 6.0% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 快速银染显色后观察.

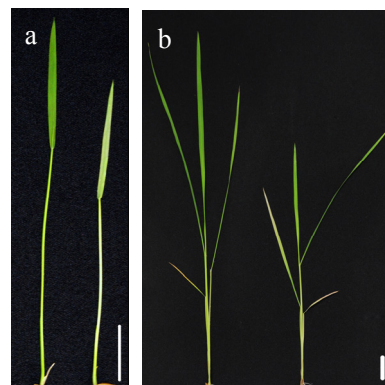
## 2 结果与分析

### 2.1 突变体的表型分析

7 d 苗龄的突变体植株 *Osy11* 的表型与野生型相比, 整体偏矮, 叶色明显黄化(图 1(a)). 在二叶期后 *Osy11* 的叶色逐渐恢复到野生型水平(图 1(b)).

### 2.2 突变体的遗传分析

*Osy11* 纯合体与野生型 Kasalath 的  $F_1$  代表型与野生型相同, 叶色正常, 表明突变基因为隐性基因.  $F_1$  自交获得的  $F_2$ , 225 株  $F_2$  植株的叶色表型出现分



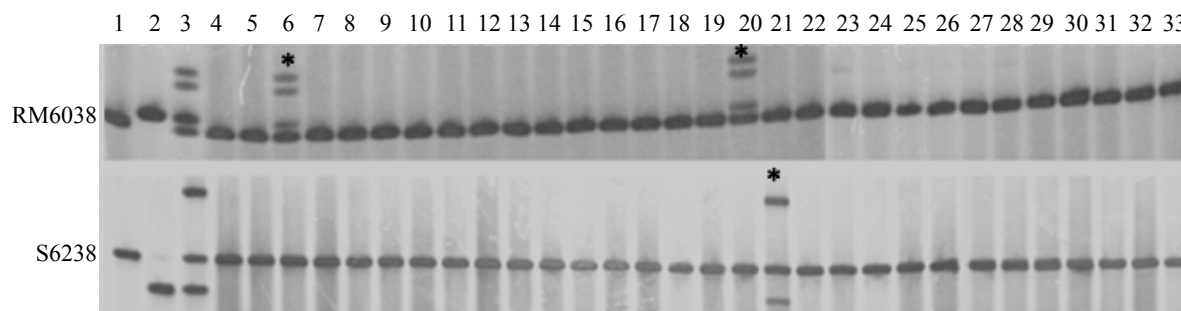
(a) 7 d 苗龄的野生型(左)和突变体 *Osy11*(右), bar=2 cm  
(b) 21 d 苗龄的野生型(左)和突变体 *Osy11*(右), bar=2 cm

图 1 野生型和突变体 *Osy11* 对照

离, 其中 175 株为野生型表型, 50 株为突变体表型. 经卡方检测结果为  $0.855 < \chi^2_{0.10} = 2.71$ , 符合单基因控制的遗传规律, 表明该突变体黄化叶表型受一对隐性核基因控制.

### 2.3 突变基因的定位

*OsYL1* 基因的粗定位采用混合分离分析方法(Bulked Segregant Analysis, BSA)<sup>[21]</sup>. 在 *Osy11*/日本晴  $F_2$  分离群体中随机挑选了 30 株黄化叶突变体, 以 Kasalath、日本晴和  $F_1$  为模板对照, 用 98 对 SSR 标记(均匀分布在水稻 12 条染色体上)进行扩增, 发现 *OsYL1* 与第 3 染色体上的标记 RM6038 连锁(图 3), 30 个群体中有 2 个交换单株. 随后在 RM6038 附近发展了新的 STS 标记, 从标记 S6238 的扩增结果中发现了 1 个交换单株且与 RM6038 不同(图 3), 于是将 *OsYL1* 基因初步定位在标记 RM6038 和 S6238 之间. 在精细定位中, 又开发了 2 对有多态性的标记 S5362 和 S5845(表 1), 定位群体发展至 500 株, 最终将 *OsYL1* 基因定位在标记 S5362 和 S5845 之间, 两者区间大小约 483 kb(图 3).



1 为 Kasalath; 2 为日本晴; 3 为  $F_1$ (日本晴 $\times$ *Osy11*); 4~33 为  $F_2$  突变体单株, \*为交换单株

图 2 标记 RM6038 和 S6238 在日本晴/*Osy11*  $F_2$  群体中的分离

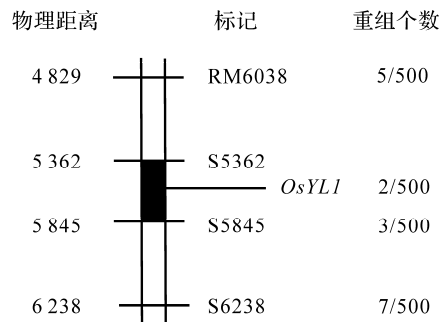


图 3 *OsYLI* 基因在第 3 染色体上的精细定位

表 1 用于定位的分子标记序列

| 引物名    | 正向引物(5'-3')          | 反向引物(5'-3')          |
|--------|----------------------|----------------------|
| RM6038 | CTTCGCCCGCATAAGTCTAG | GTAGTCCGACTCGATCTCCG |
| S5362  | AGGATTGAGAAATGAATCAA | GCATAATATGTAGGGCACC  |
| S5845  | TACTAAACAGTCTCATATAC | AAGTATAAATGAAGCACAC  |
| S6238  | GACTTCTAGTTCGGCTAGTC | TAAACGTTTCATGTGATATG |

3 讨论

水稻叶片光合碳同化源大小即叶源量是影响水稻产量高低的重要因素<sup>[22]</sup>。水稻叶片叶绿素含量和叶绿素 a/b 的比值对光合速率及作物产量存在影响<sup>[23]</sup>。对水稻的叶色相关基因的发掘和利用, 能为生物技术改造叶色, 从而提高水稻对光能利用提供条件<sup>[24]</sup>。在目前发现的水稻叶色突变材料中, 成功克隆到的相关突变基因只是其中一小部分, 这些基因还不能彻底地解释叶色的调控机理, 因此对水稻叶色突变体的基因克隆和利用仍具有重大意义<sup>[6]</sup>。本研究发掘的水稻黄化叶突变体进一步丰富了水稻叶色突变体库, 为突变基因的定位以及后续研究提供了参考。

本研究的 *OsYLI* 突变体的黄化叶色会随着水稻的继续生长逐渐恢复成绿色, 到目前为止已克隆到的叶色基因中有多个控制类似的性状。Xu 等<sup>[7]</sup>克隆的 *OsPAPST1* 位于第 1 染色体, 编码一个 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸运输载体, 具有介导叶绿体向细胞核反向信号传导的功能, 该突变体在三叶期叶色恢复正常。 *YGL1* 位于第 3 染色体, 编码叶绿素合酶, 具有催化叶绿素酸酯生成叶绿素 a 的功能, 该突变体成熟叶片叶绿素含量接近野生型的水平<sup>[8]</sup>。编码一个未知蛋白的 *YLC1* 定位在第 9 染色体, 可能与叶片早期的叶绿素和叶黄素的积累及叶绿体的发育相关, 该突变体叶色在抽穗期恢复正常<sup>[9]</sup>。

编码血红素氧合酶 *HO2* 的 *YLC2* 也在第 3 染色体, 可能参与调节水稻四吡咯生物合成过程, 该突变体苗期叶色黄化明显, 田间种植后成熟叶片恢复绿色, 但新生叶的叶色仍较浅<sup>[10]</sup>。

本研究中的 *OsYLI* 基因定位在水稻第 3 染色体上的 STS 标记 S5362 和 S5845 之间, 物理距离约为 483 kb。生物信息学分析表明, 在这段区间内共有 76 个预测基因, 其中没有发现已报道的叶色相关基因, 因此 *OsYLI* 是一个新的控制水稻叶色发育的基因。

参考文献:

[1] 王旭军, 徐庆国, 杨知建. 水稻叶片衰老生理的研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(3):187-190.

[2] 粘金蓉, 张光恒, 李仕贵, 等. 水稻叶片保绿性的分子遗传研究进展[J]. 分子植物育种, 2011, 9(1):1-8.

[3] 王军, 王宝和, 周里慧, 等. 一个水稻新黄绿叶突变体基因的分子定位[J]. 中国水稻科学, 2006, 20(5):455-459.

[4] 杨麟, 罗大刚. 水稻叶色突变体的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014, 41(8):3341-3343; 3378.

[5] 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.

[6] 邓晓娟, 张海清, 王悦, 等. 水稻叶色突变基因研究进展[J]. 杂交水稻, 2012, 27(5):9-14.

[7] Xu J M, Yang J, Wu Z C, et al. Identification of a dual-targeted protein belonging to the mitochondrial carrier family that is required for early leaf development in rice[J]. Plant Physiology, 2013, 161(4):2036-2048.

[8] Wu Z, 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.

[9] Zhou K, Ren Y, Lü J, et al. Young leaf chlorosis 1, a chloroplast-localized gene required for chlorophyll and lutein accumulation during early leaf development in rice[J]. Planta, 2013, 237(1):279-292.

[10] Li Q Z, Zhu F Y, Gao X L, et al. Young leaf chlorosis 2 encodes the stroma-localized heme oxygenase 2 which is required for normal tetrapyrrole biosynthesis in rice[J]. Planta, 2014, 240(4):701-712.

[11] Wang P R, Gao J X, Wan C M, et al. Divinyl chlorophyll(ide) a can be converted to monovinyl chlorophyll(ide) a by a divinyl reductase in rice[J]. Plant

- Physiology, 2010, 153(3):994-1003.
- [12] Zhang F T, Luo X D, Hu B L, et al. *YGL138(t)*, encoding a putative signal recognition particle 54 kDa protein, is involved in chloroplast development of rice[J]. Rice, 2013, 6(1):7.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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):1-14.
- [16] Wang P Y, Li C M, Wang Y, et al. Identification of a geranylgeranyl reductase gene for chlorophyll synthesis in rice[J]. Springer Plus, 2014, 3:201.
- [17] Chen H, Cheng Z J, Ma X D, et al. A knockdown mutation of yellow-green leaf 2 blocks chlorophyll biosynthesis in rice[J]. Plant Cell Rep, 2013, 32:1855-1867.
- [18] Yoshida S, Forno D A, Cock J H, et al. Laboratory manual for physiological studies of rice[M]. Third edition. Manila: International Rice Research Institute, 1976:62.
- [19] 宁永强, 丁沃娜, 朱世华, 等. 水稻短根突变体 *ksr1* 的遗传分析和基因定位[J]. 中国水稻科学, 2010, 24(6): 652-654.
- [20] 张向前, 邹金松, 朱海涛, 等. 水稻早熟多子房突变体 *fon5* 的遗传分析和基因定位[J]. 遗传, 2008, 30(10): 1349-1355.
- [21] Michelmore R W, Papan I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1991, 88(21):9828-9832.
- [22] 曹树青, 翟虎渠, 张红生, 等. 不同类型水稻品种叶源量及有关光合生理指标的研究[J]. 中国水稻科学, 1999, 13(2):91-94.
- [23] 刘贞琦. 不同株型水稻光合特性的研究[J]. 中国农业科学, 1980, 3(6):6-10.
- [24] 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.

## Molecular Mapping of a Rice Yellow Leaf Gene *OsYLI*

XIANG Xian-bo<sup>1</sup>, WU Jing<sup>1</sup>, DING Wo-na<sup>2</sup>, ZHU Shi-hua<sup>2\*</sup>

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. College of Science and Technology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** Leaf color mutants are useful resource for rice genomics research and development of rice cultivars with high photosynthetic efficiency. In this research, a rice yellow leaf mutant is isolated from an EMS (ethyl methane sulfonate)-generated rice mutant library of Kasalath background, and *Oryza sativa yellow leaf 1* (*Osy11*) is thus obtained. The *Osy11* shows a yellow leaf phenotype before the second leaf stage and later leaves gradually turn back to green similar to the wild type. Genetic analysis suggests that the phenotype of *Osy11* is controlled by a single recessive nuclear gene. By map-based cloning, the *OsYLI* is mapped to a 483 kb region between the markers S5362 and S5845 on chromosome 3. No report on yellow leaf related gene has been found in this region. The result of this study is expected to provide useful reference for cloning and characterizing *OsYLI*.

**Key words:** *Oryza sativa*; yellow leaf mutant; gene mapping

(责任编辑 史小丽)