

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2015.04.03

一个新的玉米黄绿叶突变体 *ygl-m* 的初步研究

关海英,何春梅,徐相波,刘铁山,刘春晓,刘强,董瑞,汪黎明*

(山东省农业科学院玉米研究所,济南 250100)

摘要:在田间选育系谱过程中发现了一份黄绿叶突变体 *ygl-m*,该突变体叶片在苗期自发地表现黄绿色,待植株长到6周大左右植株叶片开始恢复绿色,最后整个植株叶片都恢复正常的绿色。苗期 *ygl-m* 与野生型植株 B73 相比,叶片总叶绿素、叶绿素 *a*、叶绿素 *b* 含量均显著下降,叶绿素 *a/b* 比值显著升高;苗期叶片叶绿体中基粒类囊体片层较少,排列不规则,结构松散。遗传分析表明,突变体 *ygl-m* 的黄绿叶表型由隐性单基因控制。本研究将为开展 *ygl-m* 基因的分子标记定位和进一步探讨其利用潜力奠定基础。

关键词:玉米;黄绿叶突变体;遗传分析;基因

中图分类号:S513;Q34301+3 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2015)04-220-05

The initial research of a new yellow-green leaf mutant *ygl-m* in maize

GUAN Haiying, HE Chunmei, XU Xiangbo, LIU Tieshan, LIU Chunxiao, LIU Qiang, DONG Rui, WANG Liming*

(Maize Institute, Shan Dong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China)

Abstract: A yellow-green leaf mutant *ygl-m* was identified in the process of pedigree selection in field, which spontaneously showed yellow-green leaf phenotype at seedling stage. The plants began to restore green in almost 6 weeks later, and then all leaves of the plants turned green. Compared to wild type line B73, the contents of total chlorophyll, chlorophyll *a*, chlorophyll *b* in *ygl-m* decreased significantly, while the ratio of chlorophyll *a/b* increased significantly. There are only of few chloroplast grana thylakoid lamellar with irregular arrangement and loose structure in *ygl-m* at seedling stage. Genetic analysis showed that a single recessive gene controlled the yellow-green leaf phenotype of *ygl-m*. This study may lay foundations to molecular map of *ygl-m* and further explore its application of potential.

Keywords: Maize; Yellow-green leaf mutant; Genetic analysis; Gene

在自然界存在的所有突变类型中,叶色突变是常见的突变形式之一,并且叶色突变通常可以直观表现出来,性状相对比较明显,也容易辨别和区分。叶色突变体又称为叶绿素突变体,它往往是由突变基因直接或间接影响叶绿素的合成或降解,改变叶绿素的含量或成分比,从而导致性状发生变异。早在20世纪30年代,生物学研究中就有相关叶色突变体的报道^[1]。至今已在水稻、大豆、玉米、大麦、小麦、番茄和油菜等多种植物中发现叶色突变体^[2-8]。植物叶色突变体的来源十分广泛,总的来

说,可通过自发突变和人工诱发突变产生。

叶色突变体曾被认为是无意义的突变,因为叶色突变体往往导致叶片光合作用效率降低,突变严重的甚至能够导致整个植株发生死亡。近些年来,随着分子生物学的发展和一些模式植物基因组序列的完成,研究者们开始越来越关注叶色突变体的利用价值。叶色突变体是进行光合作用,叶绿素合成与降解、叶绿体分化及发育等基础研究的良好材料^[9]。此外,叶色突变体也可以作为一种标记性状应用于良种扩繁^[10]和杂交制种^[11]等应用研究中。

收稿日期:2015-07-31;修回日期:2015-09-13。

基金项目:山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(项目编号BS2012SW020);山东省自然科学基金(ZR2009DM037);山东省博士后创新项目专项资金(2014年度)。

作者简介:关海英,女,在站博士后,研究方向:玉米功能基因组学;E-mail:guanhying@163.com。

*通信作者:汪黎明,男,研究员,研究方向:玉米遗传育种;E-mail:13605401923@126.com。

至今已报道的与玉米叶绿素缺陷突变相关的基因有210余个,在1~10号染色体上均有分布(<http://www.maizgdb.org>)。根据表型不同分为白化苗、黄化苗、条纹叶、斑点叶等^[12]。这些丰富的叶色突变材料为研究玉米中叶绿素相关代谢途径及叶绿体发育机制等提供了良好的材料基础。

在选系过程中发现了黄绿叶突变体 *ygl-m*, 经过多代自交, 性状遗传稳定, 该突变体在苗期整个植株叶片都自发地表现黄绿色, 6周大时植株叶片开始恢复绿色, 最后完全恢复正常绿色。在报道的玉米黄绿叶突变体中未见有这种特性的, 推测黄绿叶突变体 *ygl-m* 是一个新的突变材料。本研究利用黄绿叶自发突变体 *ygl-m*, 对其开展表型特性、叶绿素含量测定、叶绿体透射电镜和遗传规律研究, 旨在了解该突变体黄绿叶性状的发生机制, 为进一步探讨叶色变异的调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

玉米黄绿叶突变体 *ygl-m* 是从田间选育系谱过程中发现的, 经过多代自交发现黄绿叶表型遗传稳定, 暂命名为 *ygl-m*。该突变体苗期整个植株叶片都自发地表现黄绿叶, 第6周大小时植株叶片开始恢复绿色, 后来整个植株都恢复正常的绿色。

1.2 光合色素含量测定

将种植两周后的野生型植株 B73 和突变体 *ygl-m* 的新鲜叶片, 剪成长约 1 cm 宽 1 mm 大小的小叶片, 称取各个待测样品 0.15~0.20 g, 放入 25 mL 的丙酮溶液与乙醇的混合溶液中(以 V95% 丙酮: V100% 无水乙醇体积 = 2 : 1, 配成萃取叶绿素的混合溶液), 在 26℃ 的黑暗条件下, 将剪碎的叶片浸泡 24h。用分光光度计分别测量 470 nm(类胡萝卜素的吸收峰)、645 nm(叶绿素 b 的吸收峰)和 663 nm(叶绿素 a 的吸收峰)三个波长下各个待测溶液的光密度值(Optical Density value, OD), 每个样品进行三次重复, 取平均值。根据如下公式计算出待测样品叶片中的叶绿素 a(Chl a)、叶绿素 b(Chl b)以及类胡萝卜素(Car)的含量。叶绿素和类胡萝卜素含量的计算公式如下:

$$\text{Chla}(\text{mg/g}) = [(12.7 * \text{OD663} - 2.69 * \text{OD645}) * V] / (W * 1000)$$

$$\text{Chlb}(\text{mg/g}) = [(22.9 * \text{OD645} - 4.68 * \text{OD663}) * V] / (W * 1000)$$

$$\text{Car}(\text{mg/g}) = [\text{OD470} * (V/W) - 3.27 * \text{Chla} - 104 * \text{Chlb}] / 198$$

其中: *V* 为浸泡溶液的体积(25 mL); *W* 为称取叶片的质量(0.15~0.20 g); OD470、OD645 和 OD663 分别为分光光度计上读取的光密度值(单位为 mg/g)。

1.3 叶绿体透射电镜观察

将种植两周后的野生型植株 B73 和突变体 *ygl-m* 相同部位叶片材料切成 1 mm×1 cm 的矩形小方块, 固定于 2.5% 的戊二醛溶液中(4℃ 冰箱 2 h 以上); 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 45 m, 分三次每次 15 m; 漂洗后固定于 1% 锇酸(pH = 7.2) 1 h; 再用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 45 m, 分三次每次 15 m; 用 1% 醋酸铀块染 2 h; 用 50%、70%、80%、90%、100% 丙酮脱水各 15 m, 再用 100% 丙酮脱水两次, 每次 10 m; 浸透(丙酮: 包埋液 = 1 : 1, 37℃ 烘箱 2 h; 丙酮: 包埋液 = 1 : 4, 37℃ 烘箱过夜; 纯包埋液 45℃ 烘箱 2 h); 包埋聚合(45℃ 烘箱 3 h, 65℃ 烘箱 48 h); 修块; 半薄切片光镜定位; 挑选并清洗好载网, 在载网上覆盖支持膜; 超薄切片(切片机型号: Leica, Ultracut UCT); 最后在日立 H-7500 型透射电镜下观察、照相。

1.4 遗传分析

2015 年 4 月初将 *ygl-m* 与 B73 杂交的 F₂ 分离群体种植在山东省农业科学院试验基地, 于两周后调查统计群体中绿色植株和黄绿叶植株的数目, 观察记录数据, 进行遗传分析。

2 结果与分析

2.1 表型分析

玉米黄绿叶突变体 *ygl-m* 是从田间选育系谱的过程中发现的, 经过多代自交, 其性状遗传稳定, 其苗期叶片都自发地表现黄绿色(图 1a), 待植株长到 6 周大时叶片从叶尖部位逐渐开始恢复绿色(图 1c, 黑色箭头所示), 最后整个植株的叶片都恢复正常的绿色。

在苗期对正常植株 B73 和黄绿叶突变体 *ygl-m* 的叶片相对应的位置取材, 进行叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量的测定。结果如表 1 所示, 黄绿叶突变体 *ygl-m* 与正常植株相比其总叶绿素、叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均极显著下降, 分别下降 26.94%、20.16% 和 56.14%。其中叶绿素 b 的含量降幅大于叶绿素 a, 导致叶绿素 a/b 比值上升 82%。突变体中类胡萝卜素含量下降 5.23%, 但未达到显著水平。推测突变体 *ygl-m* 的黄绿叶表型是由叶绿素含量下降及叶绿素 a/b 升高引起的, 特别是叶绿素 b 的含量下降可能对其表型起着重要的作用。

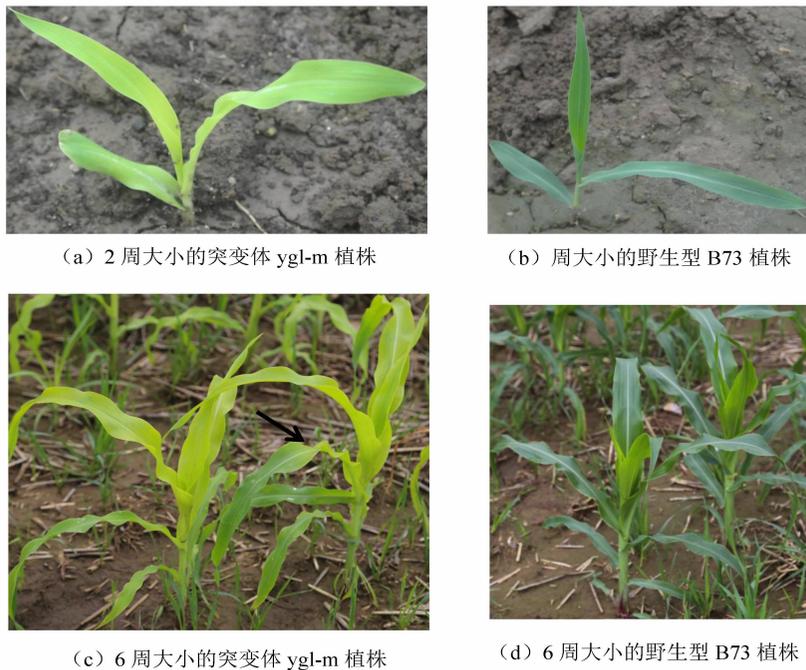


图1 黄绿叶突变体 *ygl-m* 和野生型的表型
Fig. 1 Phenotype of the mutant *ygl-m* and the wild type

表1 突变体 *ygl-m* 和 B73 苗期叶片的叶绿素和类胡萝卜素含量

材料	叶绿素 a+叶绿素 b	叶绿素 a	叶绿素 b	叶绿素 a/b	类胡萝卜素
B73	1.35±0.07	1.10±0.06	0.25±0.01	4.31±0.03	0.21±0.01
<i>ygl-m</i>	0.99±0.05 *	0.87±0.05 *	0.11±0.01 **	7.84±0.09 **	0.22±0.01
比对照+(%)	-26.94	-20.16	-56.14	82	-5.23

注:**显著性差异 $P=0.01$, *显著性差异 $P=0.05$ 。

在苗期对正常植株 B73 和黄绿叶突变体 *ygl-m* 的叶片相对应的位置取材,经过前处理后进行透射电镜观察。发现正常植株 B73 苗期叶片中叶绿体内部具有明显的类囊体基粒片层结构,数量多,且排列紧密(图 2b,黑色箭头所示)。黄绿叶突变体 *ygl-*

m 与正常植株 B73 相比其叶绿体外形正常,但其叶绿体内部基粒仅由少数几个类囊体垛叠而成,排列不规则,结构松散,如图 2a 黑色箭头所示。这些结果说明突变体 *ygl-m* 影响了叶绿体的正常发育。

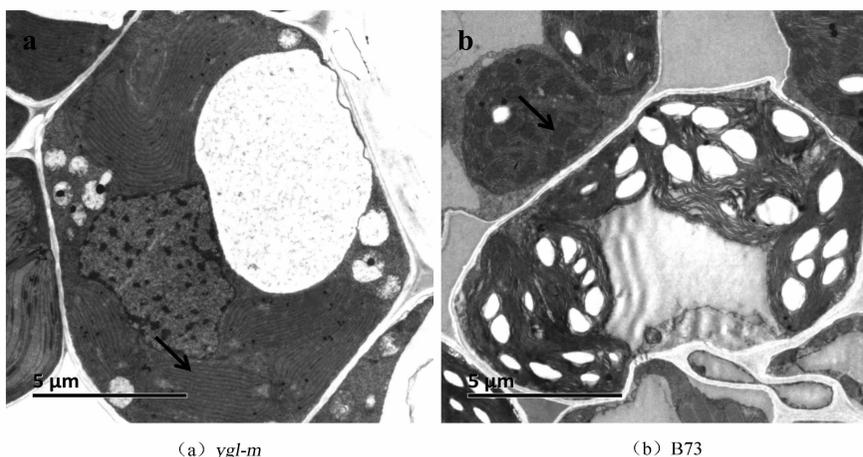


图2 苗期黄绿叶突变体 *ygl-m* (a) 和野生型 B73 (b) 的叶绿体超微结构透射电镜分析
Fig. 2 Transmission electron microscopy (TEM) analysis of chloroplast ultrastructure of yellow-green leaf mutant *ygl-m* and wild type B73 at seedling stage

2.2 遗传分析

利用玉米黄叶突变体 *ygl-m* 与叶色正常的自交系 B73 杂交,其 F_1 表现正常绿色,推测黄绿叶性状为隐性性状。用得到的 F_2 分离群体进行遗传分析,

发现其正常绿叶和黄绿叶的分离比完全符合 3:1(见表 2)。这些结果表明 *ygl-1* 的黄绿叶表型由隐性单基因控制。

表 2 黄绿叶突变体 *ygl-m* 和正常植株 B73 杂交 F_2 的叶色分离

Table 2 Segregation of leaf color in F_2 population from the cross of yellow-green leaf mutant *ygl-m* and wild type B73

材料	组合	观察值		期望值		χ^2
		绿色植株	黄绿色植株	绿色植株	黄绿色植株	
<i>ygl-m</i>		0	30			
B73		30	0			
F_1	B73 × <i>ygl-m</i>	30	0			
F_2	F_1 U	242	86	246	82	0.26

注: $\chi^2_{0.05, 1} = 3.84$

3 讨论

叶绿体是植物所特有的细胞器,也是植物进行光合作用的主要场所。叶绿素是参与光合作用的重要色素,因此对叶绿素的合成机理和叶绿体的发育调控的研究一直是植物遗传学和分子生物学领域的热点^[9]。据我们所知,目前已报道的与玉米叶绿素缺陷突变相关的基因有 210 余个,在 1~10 号染色体上均有分布。这些突变体的表型包括白化、黄化、条纹、斑点等。本研究在田间选育系谱过程中发现了一份黄绿叶突变体 *ygl-m*,该突变体叶片在苗期自发地表现黄绿色,待植株长到 6 周大左右植株叶片开始恢复绿色,最后整个植株叶片都恢复正常的绿色。据我们所知,玉米中未见相关表型的黄绿叶突变体的报道,推测 *ygl-m* 是一个新发现的黄绿叶突变体。这为丰富玉米叶绿素缺陷突变体库和研究玉米叶绿素代谢途径和叶绿体发育等提供了材料来源。

叶色突变体往往是由叶绿素的含量及成分比发生变化而导致的。在本研究中,黄绿叶突变体 *ygl-m* 与正常植株 B73 相比,苗期叶片中其总叶绿素、叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均显著下降,叶绿素 a/b 的比值显著升高,这也说明叶绿素 b 的含量降幅大于叶绿素 a 的降低幅度。突变体 *ygl-m* 中叶绿素 a/b 的比值显著升高这一研究结果同前人研究总结的大多数叶色突变体叶绿素 a/b 的比值较野生型升高相一致^[13]。突变体中类胡萝卜素的含量也下降但未达到显著水平。所以推测 *ygl-m* 的黄绿叶表型主要是由叶绿素的含量下降和叶绿素 a/b 的比值升高引起的,其中叶绿素 b 的含量降低可能对其表型起着重要的作用。

透射电镜发现突变体 *ygl-m* 中叶绿体内部基粒

类囊体片层很少,排列不整齐,结构比较松散。这与前人总结的几乎所有叶色突变体的叶绿体或多或少都发生了结构上的改变相一致^[14-15]。这一研究结果也说明突变体 *ygl-m* 影响了叶绿体的发育。推测突变体中叶绿体的发育受阻导致总叶绿素、叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均显著下降,叶绿素 a/b 的比值显著升高,最终导致其苗期的黄绿叶表型。至于后期为什么渐渐恢复正常的绿色目前还不能给出合理的解释。下一步将开展该基因的定位克隆研究,试图从分子水平上解析该突变体叶色改变的真正原因。

4 结论

玉米黄绿叶突变体 *ygl-m* 叶片在苗期自发地表现黄绿色。与野生型 B73 相比,总叶绿素、叶绿素 a、叶绿素 b 均显著降低,叶绿素 a/b 显著升高。其叶绿体基粒类囊体片层较少,排列不整齐,结构疏松。推测黄绿叶突变体基因 *ygl-m* 影响了其叶绿体的发育,导致其叶绿素相关成分含量及成分比发生变化,最终导致黄绿叶表型。遗传分析表明玉米黄绿叶突变体 *ygl-m* 的性状由隐性单基因所控制。

参考文献

- [1]SUZUKI J Y, BOLLIVAR D W, BAUER C E. Genetic analysis of chlorophyll biosynthesis [J]. Annual Review of Genetics, 1997, 31(4):61-89.
- [2]胡忠,彭丽萍,蔡永华,等.一个黄绿色的水稻细胞核突变体[J].遗传学报,1981,8(3):256-261.
- [3]HU Zhong, PENG Liping, CAI Yonghua, et al. A yellow-green nucleus mutant of rice [J]. Acta Genetica Sinica, 1981, 8(3):256-261.
- [3]GHIRARDI M L, MELIS A. Chlorophyll b deficiency in soybean mutants effects on photo system stoichiometry and chlo-

- rophyll antenna size [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1988, 932(1):130-137.
- [4] GREENE B A, ALLRED D R, MORISHIGE D T, et al. Hierarchical response of light harvesting chlorophyll proteins in a light-sensitive chlorophyll b deficient mutant of maize [J]. *Plant Physiology*, 1998, 87(2):357-364.
- [5] KRÓL M, SPANGFORT M D, HUNER N P. Chlorophyll a/b binding proteins, pigment conversions and early light induced proteins in a chlorophyll b less barley mutant [J]. *Plant Physiology*, 1995, 107(3):873-883.
- [6] FALBEL T G, MEEHL J B, STAEHELIN L A, et al. 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 [J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(2):821-832.
- [7] FALBEL T G, STAEHELIN L A. Partial block in the early steps of the chlorophyll synthesis pathway Pa common feature of chlorophyll b-deficient mutants [J]. *Plant Physiology*, 1996, 97(2):311-320.
- [8] ZHAO Y, DU L F, YANG S H, et al. Chloroplast composition and structure differences in a chlorophyll-reduced mutant of oilseed rape seedlings [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(8):877-880.
- [9] 陈佳颖, 赵剑, 刘晓, 等. 一个新水稻温敏感叶色突变体的遗传分析及其基因分子标记 [J]. *植物学报*, 2010, 45(4):419-425.
- CHEN Jiaying, ZHAO Jian, LIU Xiao, et al. Genetic analysis and molecular mapping of a new thermosensitive leaf-color mutant in *Oryza sativa* [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2010, 45(4):419-425.
- [10] 马忠虎, 颜索芳, 罗精龙, 等. 辣椒黄绿苗突变体对良种繁育及纯度鉴定作用 [J]. *北方园艺*, 2001, (3):13-14.
- MA Zhihu, YAN Sufang, LUO Jinglong, et al. Effect of the greenish yellow bud mutant in pepper for breeding and purity identified [J]. *Northern Horticulture*, 2001, (3):13-14.
- [11] WU Dianxing, SHU Qingyao, XIA Yingwu. In vitro mutagenesis induced novel thermo/photoperiod-sensitive genic male sterile indica rice with green-revertible xanthan leaf color marker [J]. *Euphytica*, 2002, 123(2):195-202.
- [12] XING Cai, WANG Guixue, HUANG Junli, et al. Research on Chlorophyll mutation of plants and molecular mechanism [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008, 18(5):10-12.
- [13] 曹莉. 一个新的小麦黄化突变体的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- CAO Li. Characterization and genetics of a novel aurea mutant in wheat [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2007.
- [14] SIMPSON D J, WETLSTEIN D V. The structure and function of the thylakoid membrane [J]. *Carlsberg Research Communications*, 1989, 54(2):55-65.
- [15] LI J A, WEBBER A N. Photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants with reduced chloroplast number [J]. *Photosynthesis Research*, 2005, 85(3):373-384.