

玉米碳水化合物分配缺陷突变体 *ysl3* 的光合特性及遗传分析

刘忠祥¹, 李永生¹, 王晓娟¹, 连晓荣¹, 梁根生¹, 寇向龙²,
何海军¹, 杨彦忠¹, 周文期¹, 周玉乾¹

(1. 甘肃省农业科学院作物研究所, 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 兰州 730070)

摘要: 以快中子辐射诱变玉米自交系 PH6WC 筛选得到的碳水化合物分配缺陷突变体 *ysl3* 为材料, 通过叶片内叶绿素含量和碳水化合物含量的测定、叶绿体结构显微观察、光合特性和遗传特性等进行分析。结果表明, 与野生型相比, 突变体叶绿体数目变少, 形态松散, 维管束鞘叶绿体积累了大量的淀粉, 淀粉颗粒排列不规则且体积增大, 导致了叶绿体的膨胀和膜结构的破坏; 叶片中淀粉、葡萄糖、果糖的含量都显著高于野生型, 表现出玉米碳水化合物分配缺陷的典型表型特征; 突变体的叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量都显著低于野生型; 净光合速率(Photosynthesis rate, *Pn*)、气孔导度(Stomatal conductance, *g_s*)、蒸腾速率(Transpiration rate, *T_r*)均极显著低于野生型, 胞间二氧化碳浓度(*C_i*)高于野生型。遗传分析表明, (*ysl3*×Mo17)_{F₂} 分离群体突变型(黄化)与野生型(绿色)植株性状分离符合 1:3 分离比例, 表明该突变体受单个核隐性基因控制。

关键词: 玉米; 碳水化合物; 突变体 *ysl3*; 光合特性; 遗传分析

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Photosynthetic Characteristics and Genetic Analysis of the Maize Carbohydrate Distribution Deficient Mutant *ysl3*

LIU Zhong-xiang¹, LI Yong-sheng¹, WANG Xiao-juan¹, LIAN Xiao-rong¹, LIANG Gen-sheng¹, KOU Xiang-long²,
HE Hai-jun¹, YANG Yan-zhong¹, ZHOU Wen-qi¹, ZHOU Yu-qian¹

(1. Crops Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070; 2. Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China)

Abstract: A carbohydrate distribution deficient mutant *ysl3* derived from fast neutron radiation with an elite maize line PH6WC was used to determine leaf chlorophyll and carbohydrate content, microscopic observation of chloroplast structure, photosynthetic and genetic characteristics. The results showed that the *ysl3* mutant chloroplast had fewer number and looser morphology, a large amount of starch accumulated in the chloroplasts of vascular bundle sheath, and the irregular arrangement and increased volume of starch particles lead to the expansion of chloroplasts and the destruction of membrane structure in comparison with the wild type. The contents of starch, glucose and fructose in the leaves were significantly higher, while the contents of chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll, and photosynthetic parameters, net photosynthetic rate(*Pn*), stomatal conductance(*g_s*) and transpiration rate(*T_r*), were significantly lower than those of the wild type, exhibiting typical phenotypic characteristics of carbohydrate allocation defects in maize. Genetic analysis showed that the separation ratio of mutant type(yellow) and wild type(green) in *F₂* population of *ysl3*×Mo17 was 1:3, explaining that the yellow mutant was controlled by a single nuclear recessive gene.

Key words: Maize; Carbohydrate; Mutant *ysl3*; Photosynthetic characteristic; Genetic analysis

录用日期: 2023-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(32260473, 32160490)、中国工程院战略研究与咨询项目(2021-DFZD-21-3)、甘肃省重大专项(21ZD11NA005, 21ZD10NF003)、甘肃省自然科学基金项目(20JR5A110)

作者简介: 刘忠祥(1964-), 甘肃清水人, 研究员, 主要从事玉米遗传育种工作。Tel: 13919451665 E-mail: lzhiang@sina.com

周玉乾为本文通信作者。E-mail: yuqianzhou2008@163.com

叶色突变是植物界中广泛存在的一种变异现象^[1]。叶色突变体是研究光合系统、叶绿素代谢及叶绿体发育等通路的理想材料^[2]。利用不同方法已在多种植物中创制并鉴定出叶色突变体,尤以黄化突变最多,多数黄化突变体表现为光合色素含量降低、光合速率下降,光合作用受影响而不能正常生长和完成生活史^[3]。高等植物中已发现 700 多个叶色突变的基因位点^[4]。玉米数据库中 (<http://www.maizgdb.org>) 已经报道或分离克隆了 200 多个与玉米叶色相关基因或 QTL 位点,白叶突变基因 18 个、斑叶 26 个、条纹叶 58 个、黄绿叶 65 个^[5],其中绝大多数突变体中的突变位点都是定位在某条染色体或染色体上的某个局部区域^[6]。拟南芥^[7]、水稻^[8]、玉米^[9]、烟草^[10,11]、甜瓜^[12]、辣椒^[13]等作物中已克隆了多个与叶色突变相关的基因,这些基因编码叶绿素合成途径中的多种酶,阻碍或促进叶绿素的合成,使叶绿体中各种色素比例发生变化,引起叶色变异。玉米碳水化合物分配缺陷突变也属于叶色突变范畴,常表现为叶片褪绿、黄化、株高降低、产量下降、碳水化合物积累增加等表型^[14,15]。目前为止,在玉米中已经报道 6 种碳水化合物分配中起作用的突变体,分别为 *sucrose export defective1(sxd1)*、*tie-dyed1(tdy1)*、*tie-dyed2(tdy2)*、*psychedelic(psc)*、*sucrose transporter1(sut1)*、*carbohydrate partitioning defective1(cpd1)*^[15-17],各突变体控制玉米碳水化合物分配相关基因有 *SXD1*、*TDY1*、*TDY2*、*PSC*、*ZmSUT1*、*CPD1* 等。因此,发掘鉴定植物叶绿素缺乏和玉米碳水化合物分配缺陷突变基因,开展其基因定位、克隆以及作用机理等方面研究具有重要的理论意义和应用价值。

本研究以快中子辐射诱变自交系 PH6WC 筛选到的株高降低、叶片褪绿、产量下降、碳水化合物积累增加突变体 *ygl3* 为材料,通过表型鉴定及生理生化指标分析,褪绿部位叶绿素含量和光合效率显著降低,维管束鞘叶绿体中积累了过量的淀粉,导致其形态异常且碳水化合物分配存在缺陷。因此,通过对其叶色性状、叶绿体结构、叶绿素含量、光合特性、叶片中玉米碳水化合物含量测定分析,从生理和分子水平上阐明碳水化合物分配缺陷及黄化产生的原因,为植物叶色遗传、植物光合系统的研究以及玉米碳水化合物分配缺陷机制提供有益的理论补充和优异的种质材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

美国引进玉米自交系 PH6WC,快中子辐射诱变

PH6WC 筛选得到的碳水化合物分配缺陷突变体 *ygl3* 以及 *ygl3* 与 Mo17 杂交并自交获得的 F₁、F₂ 分离群体。突变体 *ygl3* 从 5 叶期开始表现为叶片或叶缘黄化,并一直持续到生命进程结束直至最后成熟。与野生型相比,*ygl3* 突变体不会死亡,能够正常自交结实,且有较好的配合力。

1.2 试验方法

1.2.1 玉米碳水化合物分配缺陷突变体 *ygl3* 的表型观察

在甘肃省农业科学院张掖玉米育种试验站播种自交系 PH6WC、Mo17、*ygl3* 以及 *ygl3* 与 Mo17 杂交的 F₁、F₂ 群体。待植株生长至 5 叶 1 心至 7~8 叶时,统计野生型和突变体植株数量,并进行遗传学分析。野生型和突变体的判别标准为叶片或叶缘黄化的为突变型;反之,绿色叶片为野生型。同时,分别抽提野生型和黄化突变体植株各 30 株的 DNA 用于后续基因定位分析。

1.2.2 玉米碳水化合物分配缺陷突变体 *ygl3* 的光合色素及丙二醛(MDA)的含量测定

1.2.2.1 光合色素含量测定

分别取 5 叶期野生型 PH6WC 和突变体 *ygl3* 植株的第 4 片叶各 200 mg,剪成宽度小于 2 mm 的小块,放入盛有 15 mL 无水乙醇提取液的离心管中混匀,然后再加入 30 mL 提取液定容。利用分光光度计测定 PH6WC 和 *ygl3* 的提取液吸光值并计算其叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素的浓度^[29]。

1.2.2.2 野生型和突变体 MDA 含量测定

5 叶期分别取野生型和突变体植株的第 4 片叶各 0.5 g,加入 2 mL 预冷的 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 值 7.8),在研钵内研磨成匀浆并用缓冲液洗净转移到 5 mL 离心管,最后用缓冲液定容至 5 mL。在 4 500 r/min 离心 10 min,收集上清液,低温保存备用。吸取 2 mL 的上清液,利用硫代巴比妥酸法以及分光光度计测定 MDA 在 532、600 nm 波长条件下的吸光度,利用 532 nm 与 600 nm 条件下的吸光度差值进行计算 MDA 的含量。

1.2.3 玉米碳水化合物分配缺陷突变体 *ygl3* 的光合特性与叶绿体结构电镜分析

1.2.3.1 野生型和突变体光合相关参数的测定

在夏季(7月)无风高温的晴天,开花授粉期随机选取生长发育状况相对一致的野生型和突变体植株,将植株的穗位叶成熟区放置于 LI-6400XT 光合仪叶室处进行测定。在自然条件下,从早 9:30~11:00 时测定野生型和突变体植株穗位叶的瞬时净光合速率(Photo)、气孔导度(Cond)、胞间二氧化碳浓

度(Ci)和蒸腾速率(Tmmol)。每个材料每个时间点各测量12株,3个重复,然后取3个重复平均值作为测量结果,进行数据汇总分析。

1.2.3.2 叶绿体透射电镜制片和观察

选用光照培养室培育的3叶期野生型PH6WC和突变体 $ygl3$ 植株,取第1片叶的成熟区,剪成1~2 mm²形状后浸入2.5%戊二醛戈丁溶液4℃保存。取戊二醛戈丁保存的细胞或组织,经漂洗、渗透、包埋等处理后,在超薄切片机Leica切片(德国,型号EM UC7);用2%醋酸铀饱和水溶液和枸橼酸铅双染色15 min,切片室温干燥过夜,用FEI公司(美国)生产电镜型号Tecnai G220 TWIN透射电镜观察野生型和突变体叶绿体形态。

1.2.4 玉米碳水化合物分配缺陷突变体 $ygl3$ 可溶性糖和淀粉含量测定

采集0.1 g成熟的叶片用液氮磨成粉末。添加甲醇1 400 μ L,将样品转移到玻璃管中并超声处理30 min。以4 000 r/min离心5 min后使上清液和沉淀分离。取上清液并在氮气条件下进行干燥,利用气相色谱-质谱法进行可溶性糖含量的测定(8890-5977B,Agilent Inc.,USA)。对于淀粉提取,将330 μ L二甲基亚砜加入叶片粉末中,并在沸水浴5 min使淀粉糊化。糊化淀粉(50 μ L)用100 mmol/L乙酸钠(pH值5.0)950 μ L稀释,然后加入100 μ L α -淀粉酶工作溶液,置于沸水浴中15 min,然后在50℃水浴

3 min。加入淀粉葡萄糖酶溶液(20 μ L),并在50℃下孵育1 h。以最大速度离心5 min后转移上清液,在室温下转移到新的1.5 mL离心管中。使用葡萄糖(HK)测定试剂盒(Sigma,USA)测量上清液中的葡萄糖含量作为淀粉含量的替代物^[43]。

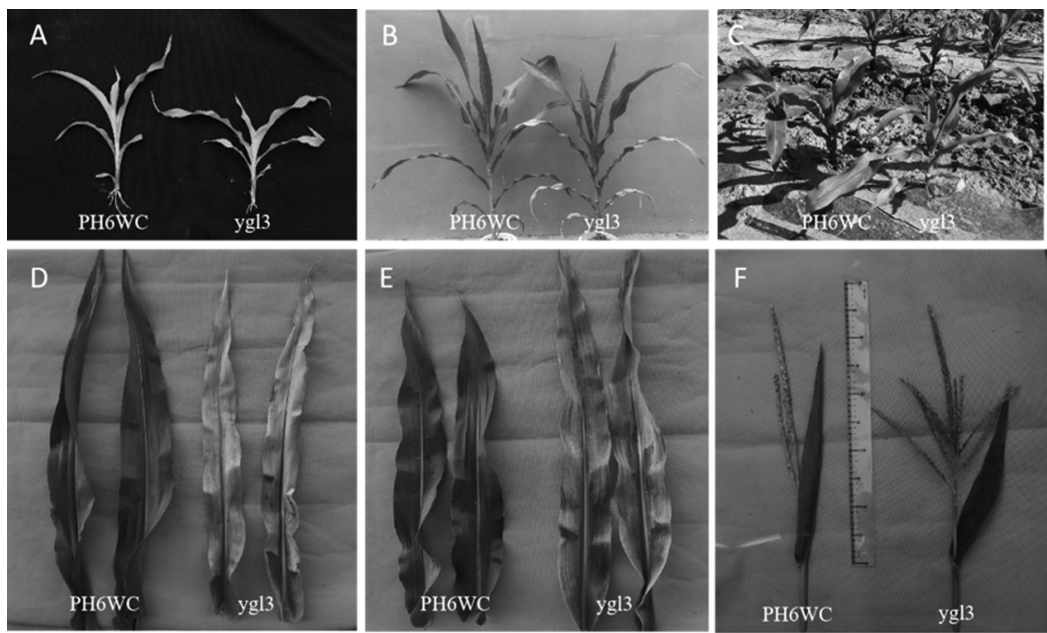
1.2.5 突变体 $ygl3$ 遗传分析与基因精细定位

($ygl3\times Mo17$)F₂分离群体中分别取30株突变型(叶片黄化)、30株野生型(叶片绿色)植株叶片组织等量混匀抽提RNA,构建突变型和野生型两个RNA混池用于转录组测序。在初定位的基础上,通过($ygl3\times Mo17$)F₂群体分离的1 300个突变体单株进行 $ygl3$ 突变基因精细定位。转录组测序数据分析参照李玉荣^[18]的方法进行。用经典贝叶斯算法分析SNP位点,确定与突变表型紧密相关的基因组区段^[19]。

2 结果与分析

2.1 $ygl3$ 及其诱变背景亲本的表型分析

课题组前期工作中,以PH6WC为受体材料进行快中子诱变,筛选到1个叶片褪绿的突变体,命名为 $ygl3$ 。该突变体5叶期以前叶片呈绿色,5叶期后叶片自上而下褪绿黄化,较老的叶片从顶部向基部失绿黄化,新叶起始时外观正常,但随着时间的推移也逐渐开始褪绿(图1),同一植株不同叶片的褪绿程度也不相同,所有叶片中以穗位叶和穗上1叶表型最为明显,剑叶表型最轻。

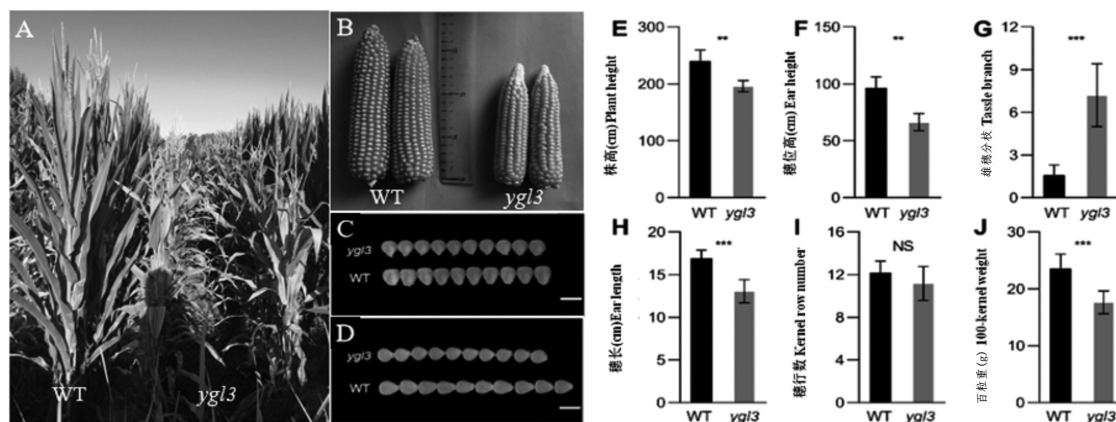


注:A为苗期表型;B、C为拔节期表型;D为穗位叶;E为穗上1叶;F为剑叶与雄穗。
Note: A, Phenotype at the seedling stage; B-C, Phenotype at the jointing stage; D, Ear leaf; E, The above ear position; F, The uppermost leaf and tassel.

图1 $ygl3$ 突变体叶片表型
Fig.1 Leaf phenotypes of $ygl3$ mutant

2018年在甘肃省农业科学院张掖玉米育种试验站对成株期的 *ygl3* 和 PH6WC 进行农艺性状调查,结果表明,相较于野生型 PH6WC,突变体 *ygl3* 的株

高和穗位高显著降低(图2, $P<0.001$)、雄穗分枝数显著增加($P<0.001$),果穗长度显著减小($P<0.001$),穗行数无显著变化,粒重显著降低($P<0.001$)。



注: A 为成株期植株; B 为果穗; C 为粒宽; D 为粒长; E 为株高; F 为穗位高; G 为雄穗分枝数; H 为穗长; I 为穗行数; J 为百粒重。

Note, A, Mature plant; B, Ear; C, Grain width; D, Grain length; E, Plant height; F, Ear height; G, The tassel branch number; H, Ear length; I, Kernel row number; J, Hundred-grain weight.

图2 *ygl3* 突变体的农艺性状

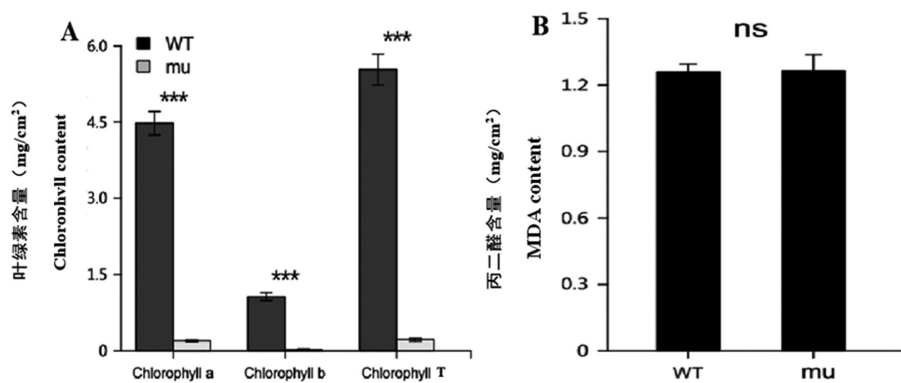
Fig.2 Agronomic traits of *ygl3* mutant

2.2 *ygl3* 的光合色素及 MDA 含量测定

为了进一步分析 *ygl3* 的光合色素含量变化状况,通过比较野生型植株和突变体 *ygl3* 的褪绿部分之间的叶绿素水平,在 5 叶期分别对野生型和突变体植株的第 4 片叶进行叶绿素含量测定,测定结果表明,突变体叶片的叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素

含量都显著低于野生型(图3)。

为明确突变体 *ygl3* 叶色变化是否由植株提前衰老所导致,分别测定了野生型和突变体叶片中 MDA 含量,结果表明两者无显著差异,由此初步推测叶色变化不是由植株提前衰老所引起,有待进一步验证。



注: WT 代表野生型 PH6WC; mu 代表突变体 *ygl3*。

Note: WT represents the wild-type PH6WC, and mu represents the mutant *ygl3*.

图3 野生型和突变体叶绿素和 MDA 含量测定

Fig.3 Determination of chlorophyll and MDA content in wild-type and mutant plants

2.3 *ygl3* 的光合特性与叶绿体结构电镜分析

在玉米开花授粉期,利用 LI-6800 光合仪对突变体及野生型植株进行光合参数测定分析,与野生型相比,突变体净光合速率、气孔导度、蒸腾速率均极显著低于野生型,净光合速率降低 87.29%,气孔

导度降低 80.95%,蒸腾速率降低 69.06%(图4)。胞间 CO_2 浓度升高 83.81%,极显著高于野生型,说明突变体 *ygl3* 叶绿素降解导致了光合速率的降低,光合色素含量降低造成其净光合速率的下降,而光合参数的改变导致胞间 CO_2 的利用率降低。

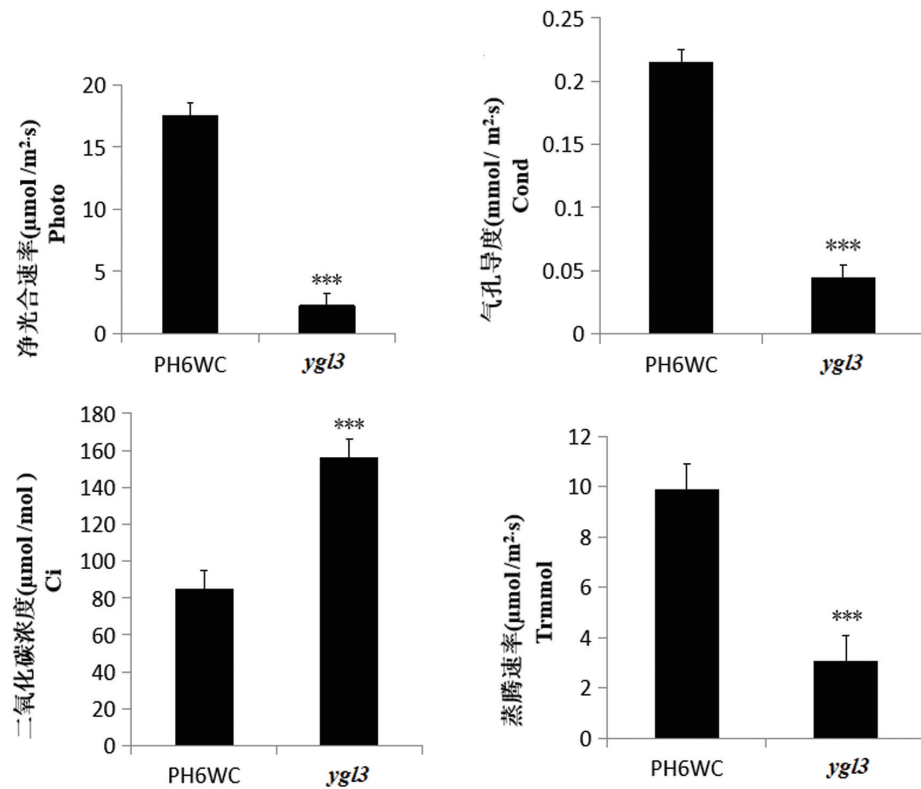
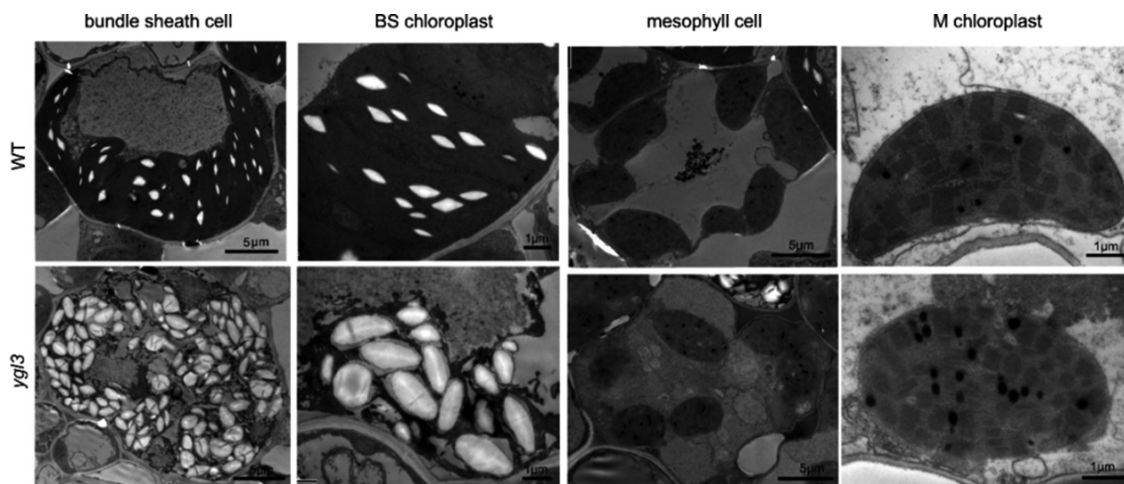


图4 野生型和突变体光合参数比较

Fig.4 Comparison of photosynthetic parameters in wild-type and mutant plants

为了确定 *ygl3* 突变体叶片褪绿的原因,利用透射电镜对野生型和 *ygl3* 的叶绿体结构进行观察,结果表明,在 *ygl3* 叶片中,叶肉叶绿体形态正常,与野生型没有显著差异;而维管束鞘叶绿体中存在大量淀粉,对叶绿体膜造成了破坏。作为 C_4 植物,玉米具有两种形态和物理上截然不同的叶绿体来进行 CO_2 的固定和同化。用于 CO_2 同化的叶肉叶绿体具有发达的基粒结构,而用于 CO_2 固定的维管束鞘叶

绿体几乎没有基粒,但含有许多淀粉颗粒。*ygl3* 的叶肉叶绿体表现出发育良好的层状结构,具有堆叠的基粒和类囊体膜,与野生型的没有显著差异;但它的维管束鞘叶绿体积累了大量的淀粉,使其形态发生了巨大的改变。野生型维管束鞘叶绿体中的淀粉颗粒排列整齐,大小适中;而 *ygl3* 维管束鞘叶绿体中的淀粉颗粒排列不规则且体积增大,导致了叶绿体的膨胀和膜结构的破坏(图5)。

图5 *ygl3* 突变体的叶绿体结构Fig.5 Chloroplast structure of *ygl3* mutant

2.4 *ygl3*的碳水化合物含量分析

考虑到 *ygl3* 的表型具有株高降低、叶片褪绿等表型,类似于之前报道碳水化合物分配缺陷突变体,本研究对其叶片内碳水化合物的含量进行了测定。

图6结果表明, *ygl3* 叶片中淀粉、葡萄糖、果糖的含量都显著高于野生型($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$),而蔗糖含量与野生型之间没有显著差异,暗示 *ygl3* 是一个碳水化合物分配缺陷突变体。

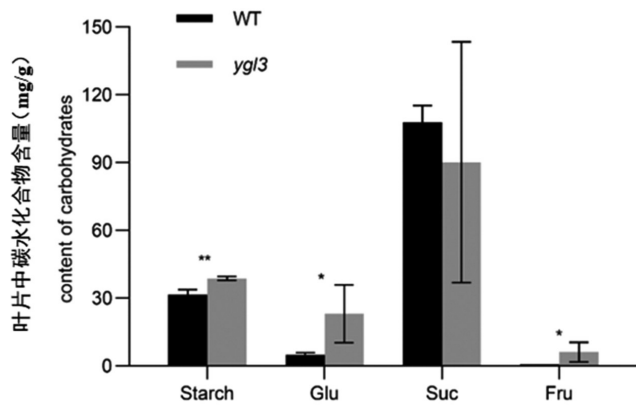


图6 *ygl3*突变体叶片中碳水化合物的含量
Fig.6 Carbohydrate content of *ygl3* mutant in the leaves

2.5 *ygl3*遗传分析和基因精细定位

将 *ygl3* 和已知参考基因组的自交系 Mo17 进行杂交,获得 F_1 ,观察发现, F_1 的叶片颜色和野生型 Mo17 一致,没有表现出 *ygl3* 的黄化表型,表明该突

变为一个隐性突变;将 F_1 自交,获得 F_2 分离群体(表1),通过卡方检验发现, F_2 分离群体中绿叶和黄化表型符合 3:1 分离比($\chi^2=1.32<\chi^2_{0.05,1}=3.84$, $P<0.05$),表明该突变体是受单个核隐性基因控制的。

表1 F_2 分离群体中的目标性状分离和卡方测验
Table 1 Segregation analysis and Chi-square test of F_2 segregating plants

群 体 Population	观察值 Observed value		期望值 Expected value		卡方检验 χ^2
	野生型 Wild type	突变体 Mutant	野生型 Wild type	突变体 Mutant	
(<i>ygl3</i> ×Mo17) F_2	341	97	328.5	109.5	1.32

突变基因定位所用的群体为(*ygl3*/Mo17) F_2 分离群体。5 叶期表型出现后,从 F_2 群体中分别选择 97 株野生型单株和 97 株突变型单株,分别构建突变和野生型两个混合样品池并抽提 RNA,进行转录组测序;测序的数据通过贝叶斯统计分析的方法,将突变基因初步定位在玉米第 3 染色体上 177 ~ 183 Mb 之间约 6 Mb 的区间内。

在初定位的基础上通过 1 个含有 130 个单株的小群体对 BSR-Seq 的结果进行验证。在第 3 染色体 177 ~ 183 Mb 区间内共开发了 12 对 KASP 标记,经筛选其中 8 对在两亲本之间具有多态性,分别为 1633、1672、1741、1769、1804、1820、1884 和 1940。用这些标记鉴定小群体的基因型,结合植株表型,进一步将突变位点定位在第 3 染色体标记 1769 与 1820 间约 5.1 Mb 区间内,该区间位于初定位区间

内,证实了 BSR-Seq 初定位结果的可靠性。为进一步缩小目的基因所在区间,在 1769 和 1820 之间开发的 7 对标记中筛选得到 1 对多态性标记 1812。用 1769、1820 加上新开发的 1812,分析来自 F_2 群体的 1 300 株突变体的基因型,共筛选到 117 个交换单株,通过交换单株基因型分析,将目的基因定位在标记 1812 和 1820 间约 830 kb 的物理区间内,该区间内共含有 25 个基因(图 7)。

3 讨 论

光合作用机制和叶绿体发育相关研究是生命科学领域的热点问题,而叶色突变体是研究叶绿体形成和发育相关基因功能的重要材料。开展玉米叶色突变体的相关研究,对光合作用、光形态建成、基因功能、蛋白质功能、代谢途径及抗性机制的阐述具有

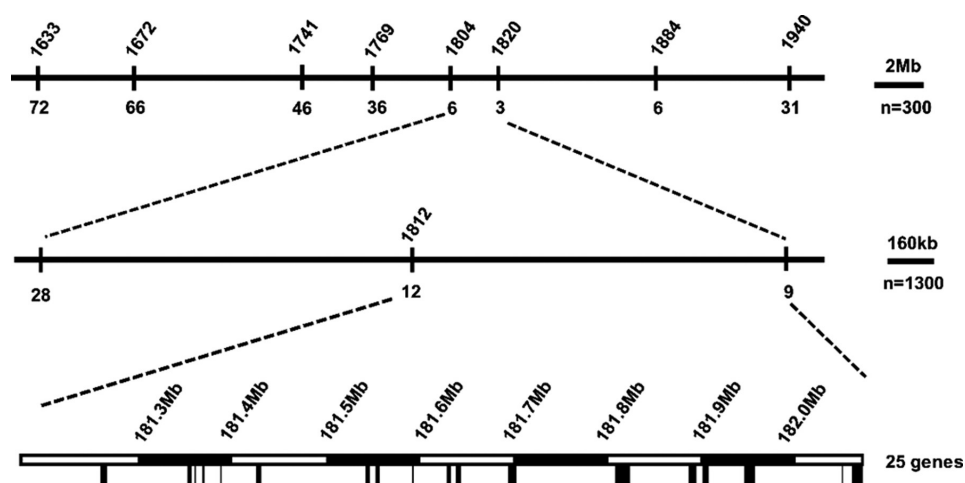


图7 突变位点定位结果

Fig.7 Mutation site localization results

重要的理论意义。已有研究表明,叶色变异的类型有很多,遗传规律也不尽相同。有细胞质遗传^[21,22]、核质基因互作^[23],有显性核基因控制^[24]和不完全显性核基因控制的遗传^[25],也有双隐性重叠基因互作控制^[26]和单隐性核基因控制相关报道。但大部分叶色突变是受一对隐性核基因控制,如水稻 *yl6(t)* 基因是受1对核隐性基因控制的遗传,位于第6号染色体短臂约56 Kb的区段内,控制叶色遗传目的基因 *LOC-Os06g06880* 的第1外显子上的碱基由G变成了A,导致相应的氨基酸由甘氨酸变成了精氨酸^[27]。玉米黄绿叶突变体 *ygl-1* 也是受1对核隐性基因控制,叶色黄化的原因是编码 cpSRP43 蛋白的 *GRMZM2G007441* 基因在 *ygl-1* 的编码区发生单碱基的缺失,导致叶绿体前体合成异常^[28]。本实验中 *ygl3* 突变体在5叶期以后叶片或叶缘才开始出现黄化表型,叶色黄化性状受1对隐性核基因控制,与水稻^[27]、玉米^[29]、棉花^[30]、拟南芥^[31]、番茄^[32]、甘蓝^[33]、黄瓜^[34]、茄子^[35]、辣椒^[36]等作物的叶色黄化突变的遗传规律相一致。

玉米碳水化合物分配的相关研究较少且都与蔗糖长距离运输相关。*CARBOHYDRATE PARTITIONING DEFECTIVE1(CPD1)* 编码1个含有Pleckstrin homology(PH)结构域的蛋白。*cpd1* 突变体的韧皮部存在大量胼胝质的沉积,阻碍了蔗糖的运输,导致其出现株高减低、叶片褪绿、产量降低等碳水化合物分配缺陷的典型表型^[37]。*cpd33* 突变体具有叶片褪绿、淀粉和可溶性糖(葡萄糖、蔗糖、果糖)大量积累的表型。*cpd33* 突变体中伴胞-筛分子界面上胞间连丝数量显著减少,表明该基因可能通过影响伴胞-筛分子界面上胞间连丝的形成来调节蔗糖转运速率。

CPD33 编码1个MCTP蛋白,是拟南芥中 *QUIRKY* 的同源基因^[38]。在 *BK2L3* 的两个等位突变体 *cpd28* 和 *cpd47* 中,纤维素合成受阻导致了筛分子细胞壁结构改变,进而阻碍了碳水化合物的分配^[39]。Bezruczyk 利用 CRISPR/Cas9 创制的 *zmsweet13a/b/c* 三突变体具有典型的碳水化合物分配缺陷,即叶片褪绿、碳水化合物积累增加^[40]。*Zmsut1* 突变体具有植株矮化、叶片中碳水化合物和花青素过量积累和雌雄穗发育异常的表型^[41];*Zmsut2* 突变体发育较野生型植株更为迟缓,雌雄穗减小,同时叶片中碳水化合物含量也有所增加^[42]。*chl3* 突变体维管束鞘叶绿体中积累了过量的淀粉,淀粉原位染色实验表明,淀粉的过量积累是 *chl3* 叶片褪绿的原因。图位克隆结果表明, *chl3* 表型是由玉米中淀粉磷酸化酶2(*ZmPHOH*)的突变导致的。RNA-seq 结果表明, *chl3* 叶片中与光合作用和碳水化合物代谢相关的基因转录下调^[43]。*TDY1* 和 *TDY2* 两个基因的突变体中,碳水化合物在叶片的某些部位过度积累导致叶片部分褪绿,形成了类似“扎染”的图案。透射电镜观察结果表明, *tdy1* 和 *tdy2* 突变体的伴胞中存在类似于油滴的结构,暗示其中具有过量的碳储备。结合两个蛋白的亚细胞定位及生物学功能, Baker 等推测这两个基因可能行相互作用以促进伴胞-筛分子之间的共质体运输^[44~49]。本研究所用突变体材料 *ygl3* 与上述研究材料类似,同样表现出叶片褪绿、株高降低、碳水化合物积累增加的表型。有关基因克隆、基因功能和碳水化合物分配机制等方面的研究有待深入和补充。

光合色素含量减少会导致净光合速率降低,进而降低光合作用。本实验中黄化突变体 *ygl3* 的叶绿

素 a、叶绿素 b 含量和净光合速率显著低于野生型,与其他作物如大麦^[50]、小麦^[51]、油菜^[52-53]、菊花^[54]、番茄^[55]的研究结果一致。在玉米开花授粉期,突变体 *ysl3* 的气孔导度、净光合速率和蒸腾速率极显著低于野生型,胞间 CO₂ 浓度显著高于野生型。推测该突变体光合速率降低的主要原因是叶绿素含量的大幅度减少导致的。

叶色突变体由于生长势弱,在生长发育的某个阶段就会死亡,大多数没有利用价值。茄子突变体 *chl861-2* 叶色黄化明显,生长势弱,果实相对较小,但黄化突变体 *chl861-2* 与正常叶色品系 06-8、914 配置的杂交组合(*chl861-2*×06-8、*chl861-2*×914),其 F₁ 之间的生长势无明显差异。本实验中黄化突变体 *ysl3* 与昌 7-2、M₀17、B73、LY0986 杂交,其 F₁ 之间的生长势差异较大,其中组合(LY0986×*ysl3*)优势明显,产量与对照品种相当,表现出了较高的一般配合力,具有一定的育种应用价值。

植物叶片在衰老过程中发生一系列生理生化变化,如核酸和蛋白质含量下降、叶绿素降解、光合作用降低及内源激素平衡失调等。在植物衰老生理和抗性生理研究中,丙二醛(MDA)含量增加是植物衰老的标志之一。为明确突变体 *ysl3* 叶色变化是否由植株提前衰老所导致,分别测定了野生型和突变体叶片中 MDA 含量,结果表明两者无显著差异,由此初步推测叶色变化不是由植株提前衰老所引起,有可能是其他生理变化所致。

参考文献:

- [1] 杜文凯,袁素霞,胡 凤. 植物叶色突变分子机制的研究进展[J]. 分子植物育种,2019,17(6):1888-1897.
DU W K, YUAN S X, HU F. Research progress on molecular mechanisms of the leaf color mutation[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(6): 1888-1897. (in Chinese)
- [2] 徐明远,何 鹏,赖 伟,等. 植物叶色变异分子机制研究进展[J]. 分子植物育种,2021,10(19): 3448-3455.
XU M Y, HE P, LAI W, et al. Advances in molecular mechanism of plant leaf color variation[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 10(19): 3448-3455. (in Chinese)
- [3] 李 想. 大白菜黄化突变基因 *Brpem1* 精细定位及表达特性分析[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2019.
- [4] ECKHARDT U, GRIMM B, HRTENSTEINER S. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 56(1): 1-14.
- [5] 韩 帅,王立静,钟世宜,等. 一个新的玉米叶色突变体的遗传分析及基因定位[J]. 玉米科学,2012,20(3):26-28.
HAN S, WANG L J, ZHONG S Y, et al. Genetic analysis and gene mapping of a new leaf color mutant in maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2012, 20(3): 26-28. (in Chinese)
- [6] 彭 雷. 玉米黄化突变体 *eti1* 的鉴定、遗传分析及突变基因初步克隆[D]. 开封:河南大学,2015.
- [7] NOZOMI N, RYOUICHI T, SOICHIROU S, et al. Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in Arabidopsis thaliana and implications for the evolution of Prochlorococcus species[J]. The Plant Cell, 2005, 7(1): 233-240.
- [8] 余 宁. 水稻黄化苗基因 CS3 的图位克隆与功能分析[D]. 北京:中国农业科学院,2019.
- [9] 王 飞,段世名,李 彤,等. 玉米叶色突变体遗传分析及基因定位[J]. 植物遗传资源学报,2018,19(6):1205-1209.
WANG F, DUAN S M, LI T, et al. Fine mapping and candidate gene analysis of leaf color mutant in maize[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(6): 1205-1209. (in Chinese)
- [10] 孙明铭,蒋彩虹,罗朝鹏,等. 烟草黄绿叶突变体的遗传分析与基因定位[J]. 植物遗传资源学报,2018,19(5):942-950.
SUN M M, JIANG C H, LUO C P, et al. Genetic analysis and mapping of a yellow-green leaf mutant of Tobacco(*Nicotiana tabacum* L.)[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(5): 942-950. (in Chinese)
- [11] MONDE A R, ZITO F, OLIVE J, et al. Post-transcriptional defects in tobacco chloroplast mutants lacking the cytochrome b6/f complex[J]. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2000, 21(1): 61-72.
- [12] 邵 勤. 一个新的甜瓜叶色黄化突变体研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2013.
- [13] 马志虎,沈晓昆,宋 春. 黄绿苗叶色标记技术在辣椒纯度鉴定及雄性不育中的应用[J]. 长江蔬菜,2003(1):36-38.
MA Z H, SHEN X K, SONG C. Utilization of leaf color mark of yellow-green seedling in Hot Pepper purity identification and male sterility breeding[J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2003(1): 36-38. (in Chinese)
- [14] MARGARET B, THOMAS H, MARC H, et al. Impaired phloem loading in zmsweet13a,b,c sucrose transporter triple knock-out mutants in *Zea mays*[J]. The New Phytologist, 2018, 218(2): 594-603.
- [15] JULIUS B T, SLEWINSKI L T, FRANK R B, et al. Maize carbohydrate partitioning defective1 impacts carbohydrate distribution, callose accumulation, and phloem function[J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(16): 3917-3931.
- [16] FRANK R B, A K L, R N B, et al. Sucrose transporter ZmSut1 expression and localization uncover new insights into sucrose phloem loading[J]. Plant Physiology, 2016, 172(3): 1876-1898.
- [17] SLEWINSKI L T, FRANK R B, ADAM S, et al. Tie-dyed2 encodes a callose synthase that functions in vein development and affects symplastic trafficking within the phloem of maize leaves[J]. Plant Physiology, 2012, 160(3): 1540-1550.
- [18] 李玉荣. BSR-Seq 方法定位玉米黄化突变基因[D]. 武汉:华中农业大学,2014.
- [19] 刘忠祥,寇思荣,连晓荣,等. 玉米黄绿叶突变体表型鉴定及基因初步定位[J]. 植物遗传资源学报,2020,21(2):452-458.
LIU Z X, KOU S R, LIAN X R, et al. Phenotypic identification and low-resolution mapping of a yellow-green leaf mutant in maize[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(2): 452-458. (in Chinese)
- [20] 刘忠祥,杨彦忠,王晓娟,等. 快中子诱变突变体的表型鉴定及

- 配合力效应分析[J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(6): 184–194.
- LIU Z X, YANG Y Z, WANG X J, et al. Phenotypic identification and combining ability effect analysis of mutants by fast neutron radiation[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2021, 23(6): 184–194. (in Chinese)
- [21] 马国荣, 刘佑斌, 盖钧镒. 大豆细胞质遗传芽黄突变体的发现[J]. 作物学报, 1994, 20(3): 334–338.
- MA G R, LIU Y B, GAI J Y. Discovery of cytoplasmic bud yellow mutant in soybean[J]. Acta Agronomica Sinica, 1994, 20(3): 334–338. (in Chinese)
- [22] BARAK S, HEIMER Y, NEJIDAT A, et al. The peroxisomal glycolate oxidase gene is differentially expressed in yellow and white sectors of the D_{PI} variegated tobacco mutant[J]. Physiologia Plantarum, 2000, 110(1): 20–126.
- [23] WILLIAMS N D, JOPPA L R, DUYSEN M E, et al. Inheritance of three chlorophyll-deficient mutants of common wheat[J]. Crop Science, 1985, 25(6): 1023–1025.
- [24] SMITH L. A rare dominant chlorophyll mutant in durum wheat: Induced by atomic bomb irradiation[J]. Journal of Heredity, 1952, 43(3): 125–128.
- [25] SAWERS J H, VINEY J, FARMER P R, et al. The maize oil yellow1(oy1) gene encodes the I subunit of magnesium chelatase[J]. Plant Molecular Biology, 2006, 60(1): 95–106.
- [26] 张 琨, 刘志勇, 单晓菲, 等. 青梗菜黄化突变体 *pylm* 遗传特性分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2017, 48(1): 1–8.
- ZHANG K, LIU Z Y, SHAN X F, et al. Genetic analysis of a yellow mutant *pylm* in Pak-choi[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2017, 48(1): 1–8. (in Chinese)
- [27] 袁 铠. 水稻黄叶突变体 *yt6(t)* 的遗传分析和基因定位[D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
- [28] GUAN H Y, XU X B, HE C M, et al. Fine mapping and candidate gene analysis of the leaf-color Gene *ygl-1* in maize[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153962.
- [29] 高先玉. 玉米黄化突变体 *xy122* 的基因定位及生理分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.
- [30] ZHO J K, CHEN J D, GAO F K, et al. Rapid mapping and cloning of the virescent-1 gene in cotton by bulked segregant analysis-next generation sequencing and virus-induced gene silencing strategies[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(15): 4125–4135.
- [31] 平步云, 赵 军, 安丽君. 拟南芥叶色突变体 F03-06 的筛选及突变基因的克隆[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(21): 5664–5667.
- PING B Y, ZHAO J, AN L J. Genetic screening and isolation of a leaf color mutant F03-06 in *Arabidopsis*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(21): 5664–5667. (in Chinese)
- [32] 郭 明, 张 贺, 李景富. 番茄叶色黄化突变体的遗传分析及 SSR 分子标记[J]. 中国蔬菜, 2010(14): 31–35.
- GUO M, ZHANG H, LI J F. Genetic analysis and SSR molecule marker on tomato yellow leaf mutant[J]. China Vegetables, 2010(14): 31–35. (in Chinese)
- [33] 杨 冲. 甘蓝叶色黄化突变体 YL-1 的形态、生理、遗传和分子标记的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- [34] LUN Y, WANG X, ZHANG C, et al. A CsYcf54 variant conferring light green coloration in cucumber[J]. Euphytica, 2016, 208(3): 509–517.
- [35] 刘富中, 张 映, 杨锦坤, 等. 茄子叶色黄化突变体的特性及遗传分析[J]. 园艺学报, 2020, 47(12): 2340–2348.
- LIU F Z, ZHANG Y, YANG J K, et al. Characterization and genetic analysis of a yellowing mutant of eggplant leaf color[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(12): 2340–2348. (in Chinese)
- [36] 杨 莎, 张竹青, 陈文超, 等. 辣椒叶色黄化突变体的遗传及生理特性[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2020, 46(1): 48–52.
- YANG S, ZHANG Z Q, CHEN W C, et al. Genetic analysis and physiological characteristics of yellow leaf mutant in pepper[J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences Edition, 2020, 46(1): 48–52. (in Chinese)
- [37] JULIUS B T, SLEWINSKI L T, FRANK R B, et al. Maize carbohydrate partitioning defective1 impacts carbohydrate distribution, callose accumulation, and phloem function[J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(16): 3917–3931.
- [38] TRAN M T, MCCUBBIN J T, BIHMIDINE S, et al. Maize carbohydrate partitioning defective33 encodes an MCTP protein and functions in sucrose export from leaves[J]. Molecular Plant, 2019, 12(9): 1278–1293.
- [39] JULIUS B T, MCCUBBIN J T, MERTZ R A, et al. Maize Brittle Stalk2-Like3, encoding a COBRA protein, functions in cell wall formation and carbohydrate partitioning[J]. The Plant Cell, 2021, 33(10): 3348–3366.
- [40] MARGARET B, THOMAS H, MARC H, et al. Impaired phloem loading in *zmsweet13a,b,c* sucrose transporter triple knock-out mutants in *Zea mays*[J]. The New Phytologist, 2018, 218(2): 594–603.
- [41] SLEWINSKI L T, ROBERT M, BRAUN D M. Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(3): 881–892.
- [42] LEACH A K, TRAN M T, SLEWINSKI L T, et al. Sucrose transporter2 contributes to maize growth, development, and crop yield[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2017, 59(6): 390–408.
- [43] QIN Y, XIAO Z Y, ZHAO H, et al. Starch phosphorylase 2 is essential for cellular carbohydrate partitioning in maize[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(9): 1755–1769.
- [44] FRANK R B, BRAUN D M. Tie-dyed2 functions with tie-dyed1 to promote carbohydrate export from maize leaves[J]. Plant Physiology, 2008, 146(3): 1085–1097.
- [45] YI M, FRANK R B, MARIA M, et al. Tie-dyed1 and sucrose export defective1 act independently to promote carbohydrate export from maize leaves[J]. Planta, 2008, 227(3): 527–538.
- [46] YI M, SLEWINSKI L T, FRANK R B, et al. Tie-dyed1 encodes a novel, phloem-expressed transmembrane protein that functions in carbohydrate partitioning[J]. Plant Physiology, 2009, 149(1): 181–194.
- [47] SLEWINSKI L T, BRAUN D M. The psychedelic genes of maize redundantly promote carbohydrate export from leaves[J]. Genetics, 2010, 185(1): 221–232.
- [48] SLEWINSKI L T, ROBERT M, BRAUN D M. Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(3): 881–892.

- [49] FRANK R B, SLEWINSKI L T, BRAUN D M. The tie-dyed pathway promotes symplastic trafficking in the phloem[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(6):e24540.
- [50] 谭新星, 许大全, 汤泽生. 叶绿素缺乏的大麦突变体的光合作用和叶绿素荧光[J]. *植物生理学报*, 1996, 22(1): 51-57.
- TAN X X, XU D Q, TANG Z S. Leaf photosynthesis and chlorophyll fluorescence in a chlorophyll-deficient mutant of barley[J]. *Acta Phytophysiological Sinica*, 1996, 22(1): 51-57. (in Chinese)
- [51] 杨佳秀, 杜丽芬, 刘录祥, 等. 小麦旗叶黄化转绿突变体的生理分析及细胞学研究[J]. *西北植物学报*, 2015, 35(12): 2455-2461.
- YANG J X, DU L F, LIU L X, et al. Physiological analysis and cytological observation of the wheat mutant with yellow green-revertible flag leaf[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, 35(12): 2455-2461. (in Chinese)
- [52] 董 遵, 刘敬阳, 马红梅, 等. 甘蓝型油菜黄化(苗)突变体的叶绿素含量及超微结构[J]. *中国油料作物学报*, 2000, 22(3): 27-30.
- DONG Z, LIU J Y, MA H M, et al. Chlorophyll contents and chloroplast ultrastructure of chlorophyll deficient mutant in *B. napus*[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2000, 22(3): 27-30. (in Chinese)
- [53] 肖华贵, 杨焕文, 饶 勇, 等. 甘蓝型油菜黄化突变体的叶绿体超微结构、气孔特征参数及光合特[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(4): 715-727.
- XIAO H G, YANG H W, RAO Y, et al. Analysis of chloroplast ultrastructure, stomatal characteristic parameters and photosynthetic characteristics of chlorophyll reduced mutant in *Brassica napus* L [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(4): 715-727. (in Chinese)
- [54] 常青山, 张利霞, 陈 煜, 等. 菊花黄绿叶突变体的光合与类囊体膜光谱[J]. *林业科学*, 2013, 49(2): 72-78.
- CHANG Q S, ZHANG L X, CHEN Y, et al. Characteristics of photosynthesis and spectra properties of thylakoid membranes in the yellow-green leaf mutant of *chrysanthemum*[J]. *Scientia Silvae Sinica*, 2013, 49(2): 72-78. (in Chinese)
- [55] 杨小苗, 吴新亮, 刘玉凤, 等. 一个番茄EMS叶色黄化突变体的叶绿素含量及光合作用[J]. *应用生态学报*, 2018, 29(6): 1983-1989.
- YANG X M, WU X L, LIU Y F, et al. Analysis of chlorophyll and photosynthesis of tomato chlorophyll-deficient mutant induced by EMS[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, 29(6): 1983-1989. (in Chinese)

(责任编辑: 朴红梅)

(上接第31页)

- [23] GRAY J, CLOSE P S, BRIGGS S P, et al. A novel suppressor of cell death in plants encoded by the *Lls1* gene of maize[J]. *Cell*, 1997, 89(1): 25-31.
- [24] CHINTAMANANI S, HULBERT S H, JOHAL G S, et al. Identification of a maize locus that modulates the hypersensitive defense response, using mutant-assisted gene identification and characterization[J]. *Genetics*, 2010, 184(3): 813-825.
- [25] WANG H Z, HOU J B, YE P, et al. A teosinte-derived allele of a MYB transcription repressor confers multiple disease resistance in maize[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(11): 1846-1863.
- [26] LIU S Z, YE H C T, TANG H M, et al. Gene mapping via bulked segregant RNA-Seq(BSR-Seq) [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36406.
- [27] BRUGGEMAN Q, RAYNAUD C, BENHAMED M, et al. To die or not to die? Lessons from lesion mimic mutants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 24.
- [28] JØRGENSEN I H. Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley[J]. *Euphytica*, 1992, 63(1): 141-152.
- [29] SIMMONS C, HANTKE S, GRANT S, et al. The maize lethal leaf spot 1 mutant has elevated resistance to fungal infection at the leaf epidermis[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, 11(11): 1110-1118.
- [30] WANG G F, JI J, EI-KASMI F, et al. Molecular and functional analyses of a maize autoactive NB-LRR protein identify precise structural requirements for activity[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(2): e1004674.
- [31] QIU T C, ZHAO X S, FENG H J, et al. OsNBL3, a mitochondrion-localized pentatricopeptide repeat protein, is involved in splicing *nad5* intron 4 and its disruption causes lesion mimic phenotype with enhanced resistance to biotic and abiotic stresses[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(11): 2277-2290.

(责任编辑: 朴红梅)