生 物 工 程 学 报
Chinese Journal of Biotechnology
http://journals.im.ac.cn/cjbcn
DOI: 10.13345/j.cjb.230647

Oct. 25, 2024, 40(10): 3471-3484
©2024 Chin J Biotech, All rights reserved

·农业生物技术·

水稻黄叶少分蘖突变体 *yllt10* 的遗传与定位

李文浩[1,2]，朱晓彤[1,2]，罗会超[1]，彭令灵[1,2]，詹玥[2]，叶亚峰[2]，吴跃进[2]，陶亮之[2]，马伯军[1]，陈析丰[1*]，刘斌美[2*]

1 浙江师范大学 生命科学学院，浙江 金华 321004
2 中国科学院合肥物质科学研究院，安徽 合肥 230031

李文浩，朱晓彤，罗会超，彭令灵，詹玥，叶亚峰，吴跃进，陶亮之，马伯军，陈析丰，刘斌美. 水稻黄叶少分蘖突变体 *yllt10* 的遗传与定位[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3471-3484.
LI Wenhao, ZHU Xiaotong, LUO Huichao, PENG Lingling, ZHAN Yue, YE Yafeng, WU Yuejin, TAO Liangzhi, MA Bojun, CHEN Xifeng, LIU Binmei. Heredity and fine mapping of a yellow leaf and less tillering mutant *yllt10* in rice[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3471-3484.

摘　要：水稻(*Oryza sativa* L.)是重要的粮食作物，其植株光合作用与肥料利用的效率是决定水稻产量的重要因素。本研究在水稻‘科辐粳 7 号’的辐射诱变群体中筛选到一个叶片黄化且分蘖减少的突变体，并将其命名为 *yllt10* (*yellow leaf and less tillering 10*)。与野生型对照相比，该突变体叶片的叶绿素含量降低、叶绿体的结构发育异常、光合作用速率显著下降。遗传分析表明 *yllt10* 突变体的表型受单隐性核基因控制，利用图位克隆技术将 *YLLT10* 基因定位于水稻第 10 号染色体 J4 与 J5 两个分子标记之间，通过对该区间内的注释基因进行 PCR 测序，发现在 *yllt10* 突变体中 *CAO1/PGL* 基因的第 1 个外显子发生单碱基缺失，从而导致该基因的移码突变，是 *CAO1/PGL* 基因的一个新等位变异。此外，在不同氮素浓度种植条件下，*yllt10* 突变体均表现出对氮素不敏感的表型。本研究表明 *YLLT10* 基因调控水稻的叶色和分蘖数，影响水稻的光合作用和产量，对该基因的功能机制研究能够为水稻高产育种提供一定的理论依据。

关键词：水稻突变体；叶片黄化；少分蘖；氮素响应

资助项目：安徽省自然科学基金(2108085MC99)；合肥市“借转补”科技专项(J2020G45)；安徽省科技重大专项(202003c08020006)；浙江省自然科学基金重点项目(LZ23C130004)
This work was supported by the Natural Science Foundation of Anhui Province (2108085MC99), the Hefei “loan-to-supplement” Science and Technology Project (J2020G45), the Anhui Science Technology Major Project (202003c08020006), and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LZ23C130004).
*Corresponding authors. E-mail: CHEN Xifeng, xfchen@zjnu.cn; LIU Binmei, liubm@ipp.ac.cn
Received: 2023-09-20; Accepted: 2024-05-20; Published online: 2024-05-22

Heredity and fine mapping of a yellow leaf and less tillering mutant *yllt10* in rice

LI Wenhao[1,2], ZHU Xiaotong[1,2], LUO Huichao[1], PENG Lingling[1,2], ZHAN Yue[2], YE Yafeng[2], WU Yuejin[2], TAO Liangzhi[2], MA Bojun[1], CHEN Xifeng[1*], LIU Binmei[2*]

1 College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China
2 Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, Anhui, China

Abstract: Rice (*Oryza sativa* L.) is a major food crop and increasing rice yield is the primary objective of rice research. Photosynthesis and nitrogen utilization efficiency directly affect the tiller number of rice, which affects the yield of rice. In this study, a stable yellow leaf and less tillering rice mutant *yllt10* (*yellow leaf and less tillering 10*) was obtained by heavy-ion beam mutagenesis of rice variety 'Ke-fu-geng 7'. Compared with the wild type, *yllt10* showed reduced chlorophyll content, decreased photosynthesis rate, and abnormal chloroplast structure. The genetic analysis indicated that the phenotype of *yllt10* was controlled by a single recessive nuclear gene. Map-based cloning localized *YLLT10* between two molecular markers J4 and J5 on chromosome 10. The sequencing of candidate genes within this interval revealed that *YLLT10* was an allelic mutation of *CAO1/PGL* with a single base deletion in the first exon resulting in the frame shift mutation of *CAO1/PGL*, and *YLLT10* was a new allelic variation of *CAO1/PGL*. The mutant *yllt10* was insensitive to changes in nitrogen concentration when being incubated with different nitrogen concentrations. *YLLT10* controls leaf color and tiller number and affects photosynthesis and yield of rice. The study of this gene provides a theoretical basis for molecular breeding of rice.
Keywords: rice mutant; leaf yellowing; less tillering; nitrogen response

水稻(*Oryza sativa* L.)是我国最重要的粮食作物，其产量受到叶片光合作用效率的影响[1]。水稻叶肉细胞中存在大量的叶绿体，叶绿体中含有叶绿素、类胡萝卜素等光合色素，其含量的变化是决定水稻叶色的主要原因[2]。目前，水稻中已报道了浅绿、白化、黄化、条纹、绿黄和白翠等多种类型的叶色突变体[3]。按照光合色素含量的变化，可分为色素缺乏型和色素增加型，色素缺乏型又可细分为总叶绿素缺乏型、叶绿素 a 缺乏型和叶绿素 b 缺乏型[4]。调控叶色相关的基因大多是通过参与光合色素的合成或代谢，进而影响叶色的变化[5-6]。例如，镁螯合酶由 Chl H、Chl I 和 Chl D 三个亚基组成，其能够催化镁离子结合卟啉从而生成镁原卟啉，在光合色素合成中必不可少。拟南芥 *GUN5* 基因编码 Chl H 亚基，该基因突变后会导致拟南芥植株白化[7]。水稻 *OsChlI* 基因编码镁螯合酶I亚基，其突变体叶片在整个生育期均呈现浅黄绿色，而编码 Chl D 亚基的 *OsChlD* 基因突变后突变体在苗期叶片表现为黄绿色[8]。参与光合色素合成的联乙烯还原酶、原叶绿素酸酯氧化酶以及水稻叶绿素 a 氧化酶均能在一定程度上影响植物的叶色[2]。此外，光合色素的降解也能影响植物叶色，例如叶绿素 b 还原酶基因 *NOL* 在叶片衰老过程中影响光捕获复合体和叶绿体基粒的降解。水稻 *nol* 突变体在衰老后期叶

片仍保持绿色[9]。光合色素的合成除了受到基因调控外，还可受到氮素营养的影响，氮素是水稻生长和发育所必需的大量元素，同时氮素还是叶绿素的组成元素之一，缺乏氮素会导致叶绿素合成受阻，并削弱植株的光合效率[9-11]。

分蘖是指单子叶植物在生长发育过程中能够产生特殊分枝的一种特性。水稻作为单子叶模式植物，其分蘖数决定了穗数，是影响水稻株型和产量的重要农艺性状[12-13]。研究表明，氮、磷、钾等营养元素通过影响生长素和细胞分裂素的含量来调节水稻的分蘖，其中氮素的作用最为显著[14-18]。例如，*OsNRT1.1B* 基因编码一个硝酸盐转运蛋白，其表达受到硝酸盐的诱导，NRT1.1B 蛋白可通过影响水稻根际微生物，改变根际微环境，进而影响水稻对氮肥的利用效率最终改变水稻分蘖数和产量[19]。NLP4 是 NLP(nitrate responsive transcript factor)家族转录因子，其能够与亚硝酸还原酶基因 *OsNiR* 的启动子相结合，并激活 *OsNiR* 基因的表达，增强水稻对氮素的利用效率，进而增加水稻的分蘖数和产量[20]。NGR5 蛋白是水稻在生长发育过程中响应氮素的正调控因子，在水稻中 NGR5 蛋白和 PRC2 蛋白可抑制 *D14* 基因和 *OsSPL14* 的表达进而调控水稻分蘖等农艺性状对氮素的响应[21]。水稻 TCP (teosinte branched1/cycloidea/proliferating cell factor) 转录因子 OsTCP19 可以通过抑制分蘖促进基因 *DLT* 的表达，负调控水稻的分蘖，而受氮素诱导的 LBD (lateral organ boundaries domain)蛋白 OsLBD37 和 OsLBD39 可以与 *OsTCP19* 基因的启动子相结合，抑制其表达，并且 OsLBD37 和 OsLBD39 对启动子区域缺失 29 bp 的 *OsTCP19-H* 基因的表达抑制作用更强[22]。不同浓度的氮素会影响水稻分蘖芽的生长，而高氮肥可促进水稻产生更多的分蘖，有效提升水稻的产量。但是，大量施用氮肥不仅会导致水稻的氮肥吸收率下降，还会造成土壤酸化、水体富营养化等诸多环境污染问题[23]。因此，发掘氮高效利用的优异基因，培育氮高效利用的水稻品种，是推进农业可持续发展的有效途径之一[21]。

通过对水稻‘科辐粳 7 号’进行辐射诱变，在其后代群体中筛选到一个叶色黄化、分蘖减少的突变体，将其命名为 *yllt10* (*yellow leaf and less tillering 10*)，并对其进行了表型鉴定和目的基因的遗传分析与图位克隆，最终通过对目的基因的测序分析发现 *yllt10* 的突变表型是由于 *CAO1/PGL* 基因的功能缺失所导致；并进一步发现 *yllt10* 突变体在不同浓度氮素培养后，表现出对氮素浓度变化的不敏感，表明 *CAO1/PGL* 基因还参与了对氮素的响应。对该基因的功能机制研究有望为提高水稻光合效率以及氮素利用效率提供重要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

中国科学院合肥物质科学研究院技术生物与农业工程研究所利用重离子束诱变‘科辐粳 7 号’(*O. sativa* L. subsp. *japonica* cv. ‘Ke-fu-geng 7’)得到 *yllt10* 突变体。突变体经过连续多代种植后仍然具有叶片黄化且分蘖减少的表型，突变性状获得了稳定的遗传。利用 *yllt10* 突变体与籼稻(*O. sativa* L. subsp. *indica*) ‘93-11’进行杂交，获得 F_2 代分离群体，选取 F_2 代植株用于遗传分析。

1.2 农艺性状考察

将 *yllt10* 突变体及其野生型对照(wild-type, WT) ‘科辐粳 7 号’种植在稻田，每个小区种植 5 行，小区间行距 30 cm，每行种植 8 株，株距 12 cm。在种植区内随机选取 10 株成熟期的野生型和突变体，对其株高、有效分蘖数、穗长、

一次枝梗数、二次枝梗数、每穗粒数、千粒重和结实率进行考察。采用 GraphPad Prism 软件对以上指标进行统计分析。

1.3 叶片色素含量测定

取分蘖期 *yllt10* 突变体与 WT 的叶片，剔除叶片叶脉，将余下部分剪碎。使用分析天平称取 0.1 g 剪碎叶片于 10 mL 离心管中，向离心管中加入 9 mL 80%丙酮，避光处理 12 h，每组设 3 个重复。色素提取完成后，充分摇晃提取液，取提取液用于测定。使用紫外分光光度计分别测定 662、644、440 nm 处的吸光值(叶片色素含量计算公式见表 1)[24]。

根据计算结果，按下列公式计算叶片组织中色素的含量：色素的含量(mg/g)=(色素浓度×提取液体积×稀释倍数)/叶片鲜重。

1.4 叶绿体的透射电镜观察

分蘖期取 *yllt10* 突变体与 WT 的叶片，裁剪成合适大小，使用戊二醛固定液进行固定。将样品叶片裁剪为 2 mm×2 mm 的正方形，经戊二醛固定后，使用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.0)冲洗，随后使用锇酸固定 5 h。样品再次使用磷酸缓冲液冲洗，冲洗完成后使用乙醇进行脱水。完成脱水后使用树脂包埋样品，用切片机切片后，使用醋酸铀和柠檬酸铅染色，在透射电镜下观察叶绿体结构。

1.5 光响应曲线测定

在天气晴朗的条件下，上午 8:00 选取抽穗期的 *yllt10* 突变体和 WT 植株的剑叶，使用 LI-6800 便携式光合仪测定光响应曲线。每组选取 3 个重复。

表 1 叶片色素含量计算公式

Table 1 Formula for calculating leaf pigment content

Photosynthetic pigment (mg/L)	Calculation formula
Chlorophyll a	$Chla=9.78\times A_{662}-0.99\times A_{644}$
Chlorophyll b	$Chlb=21.43\times A_{644}-4.65\times A_{662}$
Total chlorophyll	$Total=5.13\times A_{662}-20.44\times A_{644}$
Carotenoid	$Car=4.70\times A_{440}-(1.38\times A_{662}+5.48\times A_{644})$

1.6 遗传分析

yllt10 突变体与野生型‘93-11’进行杂交获得 F_1，F_1 植株自交后得到 F_2 代遗传群体。随后统计 F_2 群体中突变植株与正常植株的分离比进行遗传分析和卡方检验。

1.7 连锁分析与基因定位

选取 F_2 代突变植株作为基因定位群体。采用 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)裂解法提取样品 DNA，利用具有多态性的 simple sequence repeat (SSR)标记对 F_2 代单株进行 PCR 检测。PCR 使用 20 μL 的反应体系，其中 DNA 模板(100 ng/μL) 2 μL，正、反向引物(10 μmol/L)各 1 μL，2×*Taq* PCR StarMix with Loading Dye 10 μL，ddH_2O 补足至 20 μL。PCR 反应程序为：95 ℃ 5 min；95 ℃ 20 s，55–65 ℃ 20 s，72 ℃ 20 s，35 个循环；72 ℃ 5 min。取 4 μL 扩增产物，使用 4.5%琼脂糖凝胶进行电泳实验。对凝胶电泳结果进行分析，对突变基因进行染色体连锁分析，及其初步定位。设计 InDel (insertion and deletion)分子标记及其 PCR 引物(表 2)，对目的基因进一步精细定位，缩小区间范围，对候选基因进行 PCR 扩增及测序，引物序列见表 3。

1.8 水稻 *YLLT10* 基因的扩增及回补载体的构建

以 WT 水稻基因组 DNA 作为模板，用引物 C-EcoRI-pYLLT10-F 和 C-KpnI-pYLLT10-R (表 4)扩增 *YLLT10* 基因的 2.5 kb 启动子片段，将其连接至 pEASY-Blunt 载体(TransGen Biotech)上，转化大肠杆菌提质粒测序后，用 *Eco*R I和 *Kpn* I 双酶切回收启动子片段。使用 *Eco*R I和 *Kpn* I 双酶切 pCAMBIA2300-35S 载体，用 *YLLT10* 基因的启动子片段替换 35S 启动子片段，获得

pCAMBIA2300-*pYLLT10* 载体。以 WT 叶片的 cDNA 作为模板，用引物 C-KpnI- YLLT10-F 和 C-BamHI-YLLT10-R (表 4)扩增得到 *YLLT10* 基因的编码序列(coding sequences, CDS)，再用 *Kpn* I和 *Bam*H I酶切 pCAMBIA2300-pYLLT10 载体，将 CDS 片段连入，经测序鉴定获得回补载体 *pYLLT10::YLLT10*。使用农杆菌介导的遗传转化将目的基因转入到由 *yllt10* 突变体种子诱导的愈伤组织中。

1.9 氮响应实验

在人工气候室中(14 h 光照，28 ℃；10 h 黑暗，20 ℃)设置 4 个不同氮浓度(40、20、8、4 mg/L)，依次记为 1N、1/2N、1/5N、1/10N[25]。水稻培养液 pH 控制在 5.80±0.50。分别取 *yllt10* 突变体和 WT 的 2 叶 1 心期幼苗用上述条件培养 30 d。

表 2 水稻 *YLLT10* 基因精细定位分子标记的引物序列

Table 2 Primers sequences of molecular markers used in fine mapping of rice *YLLT10* gene

Molecular Maker	Forward sequence (5′→3′)	Reverse sequence (5′→3′)
JSR20	GACATGCGAACAACGACATC	CATGCGATCCTGTGCTAAAA
JSR28	CATCGCATCGTATCGTATCG	GCTTCAAACACGCCTTCTTC
J1	TTGCTCCTGATTCTCGTGTG	ACTGCAATTCGCTTTCGTTT
J2	GTGGGTGGATAACTCGCATC	GGATTAGTCAAGCCGAGCAG
J3	CGCTTCAGTTGTGTGTGGTT	GAGCGAAGCAGCTAAAAAGG
J4	GGCAATAAACCAGCTTGCAT	ATTGCCAAACTCCTGTGCTC
J5	GCTGGTATCCCGAGGAGATT	TTCATCAAATTGTCCAGCCA
J6	TAGGATTGCCGTTAGCGTGT	CGATATTCAGCAGGCACTGA
J7	CATCGCATCGTATCGTATCG	GCTTCAAACACGCCTTCTTC
J8	CATTGTCAAAATTCGGATCG	TGCTCTCTCTCCCTGCTTTC

表 3 水稻 *YLLT10* 基因 PCR 扩增的引物序列

Table 3 Primers sequences for PCR amplification of rice *YLLT10* gene

Primer name	Forward sequence (5′→3′)	Reverse sequence (5′→3′)
YLLT10-1	GTTGGAGGACCGATCTGAAA	TTGGCAACTAGGCTGTCCTT
YLLT10-2	TTGCTCATCAAGCCTTCCTT	CCGACAGATGAACCTGGATT
YLLT10-3	CAGGACCTCCTCACCATCAT	TTGTGGATGGCATTTTCTCA
YLLT10-4	GCATGCTTCCGCATTTATTT	CCACAACCGATACCGGATAC
YLLT10-5	GCTGCTCTACCGGATGTCTC	GGACCTGAATTGTGGCTCAT
YLLT10-6	ACACTAGCGACAGCATCACG	GGCTTATGAAGCCAGGAACA

表 4 用于构建回补载体的引物序列

Table 4 Primers sequences for constructing the complementary vector

Primer name	Sequence (5′→3′)
C-EcoRI-pYLLT10-F	CGGAATTCCGATTGGGCCTACTGGATGTTG
C-KpnI-pYLLT10-R	GGGGTACCCCGACGCCCTGAACCCTTATCT
C-KpnI-YLLT10-F	GGGGTACCCCATGACCACTGTGGCATCGCT
C-BamHI-YLLT10-R	CGGGATCCCCGCTATGATCCACTCTCACTTT

1.10 测定水稻根长及生物量

将 *yllt10* 突变体和 WT 使用不同氮浓度的水稻培养液培养 30 d 后，取样测定水稻根系长度。将水稻地上部分和地下部分在烘箱中 80 ℃烘干后，使用分析天平称量地上部分和地下部分的重量。每个处理设 3 个生物学重复。

2 结果与分析

2.1 *yllt10* 突变体叶色黄化、分蘖减少

WT 经过重离子束诱变后，获得了叶色黄化、分蘖减少的 *yllt10* 突变体。*yllt10* 突变体从苗期开始叶色呈现黄绿色，一直到成熟期(图 1A–1C)。为了进一步探究 *yllt10* 突变体与 WT 之间的表型差异，对 *yllt10* 突变体和 WT 的农艺性状进行了考察，发现 *yllt10* 突变体的有效分蘖数明显减少(表 5)，WT 平均有效分蘖数为 16 个，而 *yllt10* 突变体的平均有效分蘖数仅有 4 个。统计 *yllt10* 突变体和 WT 的结实率发现 *yllt10* 突变体的平均结实率为 46.70%，而 WT 的平均结实率为 84.30%。并且 *yllt10* 突变体的一次枝梗数、二次枝梗数和单株产量相对于 WT 均有不同程度的下降(表 5)。

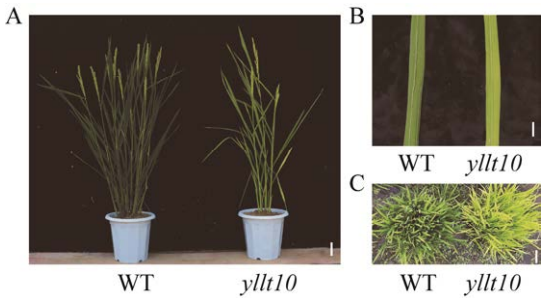

图 1 野生型与 *yllt10* 突变体不同时期的表型比较

A：抽穗期植株表型(bar=10 cm). B：抽穗期叶片表型(bar=1 cm). C：苗期植株在田间的表型(bar=2 cm)

Figure 1 Phenotypic comparison of wild-type and *yllt10* at different stages. A: Plant phenotype at heading stage (bar=10 cm). B: Phenotype of leaves at heading stage (bar=1 cm). C: Phenotypes of seedlings in the field (bar=2 cm).

表 5 野生型与 *yllt10* 突变体的主要农艺性状统计

Table 5 Statistical analysis of main agronomic traits of wild-type and *yllt10*

Traits	WT	*yllt10*
Plant height (cm)	102.66±1.05	102.74±1.49
Effective tiller number	16.00±0.97	4.00±0.71**
Panicle length (cm)	14.30±0.42	14.01±0.50
Number of primary branches	14.00±0.69	13.00±0.67*
Number of secondary branches	23.00±0.87	21.00±1.34**
Grain number per panicle	174.00±10.00	168.00±8.00**
1 000-grain weight (g)	24.86±0.81	24.32±0.46
Seed-setting rate (%)	84.30±3.05	46.70±5.53**
Grain yield per plant (g)	24.03±1.40	8.41±0.85**

n=10; * represents P<0.05, ** represents P<0.01 level, t-test.

2.2 *yllt10* 突变体光合色素含量下降、叶绿体结构异常

叶绿体是植物进行光合作用的主要场所，叶片细胞中的色素含量会直接影响叶片的颜色。由于 *yllt10* 突变体叶片的颜色比 WT 明显黄化，取分蘖期的叶片测定色素含量，发现 *yllt10* 突变体的叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素和总色素含量均明显低于 WT，其中叶绿素 b 的含量降低最为显著(图 2A)。叶绿素含量的降低常伴随着叶绿体结构的异常，透射电镜观察发现野生型叶片的叶绿体中具有多层规则的基粒类囊体薄膜，而在 *yllt10* 突变体叶片的叶绿体中类囊体薄膜数量显著减少，且嗜锇颗粒相对于野生型明显变大(图 2B−2E)。

2.3 *yllt10* 突变体叶片净光合速率下降

叶绿体结构和光合色素的变化将直接影响光合作用。在抽穗期使用 LI-6800 便携式光合仪对 *yllt10* 突变体及 WT 剑叶的净光合速率进行测定，结果表明 *yllt10* 突变体的净光合速率明显低于 WT (图 2F)。这表明 *yllt10* 突变体叶绿体结构发育异常以及光合色素含量的下降直接影响其光合作用的能力。

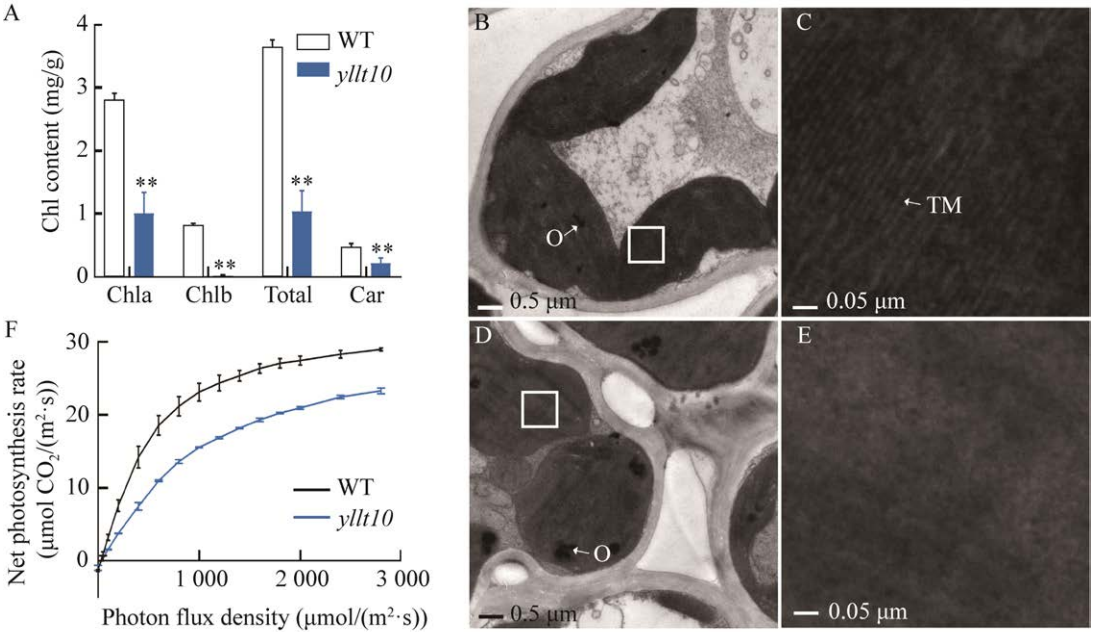

图 2　野生型与 *yllt10* 突变体的光合指标　A：光合色素含量. B：野生型的叶绿体超微结构(bar=0.5 μm). C：野生型的叶绿体超微结构的局部放大(bar=0.05 μm). D：*yllt10* 突变体的叶绿体超微结构(bar=0.5 μm). E：*yllt10* 突变体的叶绿体超微结构的局部放大(bar=0.05 μm). F：净光合速率曲线. O 代表嗜锇颗粒，TM 代表类囊体薄膜. **表示在 $P<0.01$ 水平上极显著，*t* 检验

Figure 2　Photosynthetic indexes of wild-type and *yllt10*. A: Photosynthetic pigment content. B: Chloroplast ultrastructure of wild-type (bar=0.5 μm). C: Local magnification of wild-type chloroplast ultrastructure (bar=0.05 μm). D: Chloroplast ultrastructure of *yllt10* (bar=0.5 μm). E: Local magnification of chloroplast ultrastructure of *yllt10* (bar=0.05 μm). F: Net photosynthesis rate curves. O represents osmiophilic globule, TM represents thylakoid membrane. ** represents $P<0.01$, *t*-test.

2.4　*yllt10* 突变体对氮素浓度的变化不敏感

氮素对植物的生长和发育起着关键的调控作用，其对水稻分蘖的影响尤为明显。在光合作用减弱的情况下，植物利用氮素的效率也会受到一定程度的影响[26]。在正常的氮素浓度条件下，*yllt10* 突变体的有效分蘖数相对于 WT 明显减少，因此推测 *yllt10* 突变体可能对氮素浓度的变化不敏感。利用不同氮素浓度的水稻培养液培养 *yllt10* 突变体和 WT，发现随着培养液中氮素浓度的降低，WT 分蘖数逐渐减少，而 *yllt10* 突变体的分蘖数则没有明显变化(图 3A−3C)；且 WT 根长变化趋势十分明显，而 *yllt10* 突变体的根长变化趋势较为平缓(图 3A、3B、3D)。对 *yllt10* 突变体和 WT 地上和地下部分的干重测定发现，随着培养液中氮素浓度的降低，WT 地上部分和地下部分干重明显减少，而 *yllt10* 突变体的地上部分和地下部分干重变化不明显(图 3E、3F)。测定不同氮素浓度的水稻培养液培养后的 WT 与 *yllt10* 突变体的光合色素含量后，发现随着氮素浓度不断降低，WT 与 *yllt10* 突变体的叶绿素 a 含量、总色素含量和类胡萝卜素含量均有不同程度的下降，但 *yllt10* 突变体的叶绿素 a 和总色素含量下降幅度与 WT 相比较小(图 4A、4C、4D)，且 *yllt10* 突变体的叶绿素 b 含量并未发生显著变化(图 4B)。

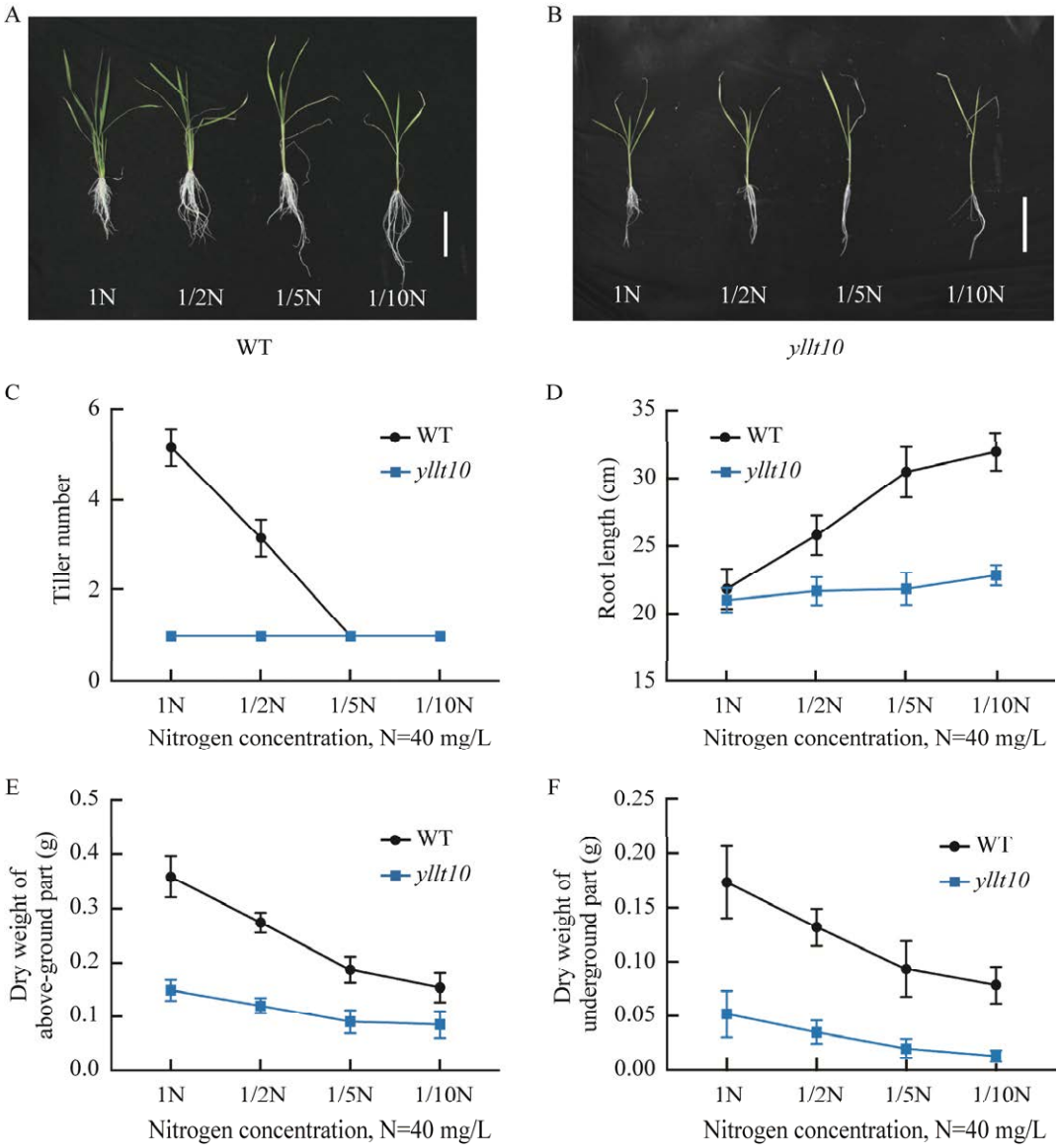

图 3 不同氮素浓度处理后野生型与 *yllt10* 突变体的根长及地上、地下部分干重比较 A：野生型植株(bar=20 cm). B：*yllt10* 突变体植株(bar=20 cm). C：分蘖数统计结果. D：根长统计结果. E：地上部分干重. F：地下部分干重

Figure 3 Root length and dry weight of above-ground and underground part comparison of wild-type and *yllt10* after treatment with different N concentrations. A: Wild-type plants (bar=20 cm). B: *yllt10* plants (bar=20 cm). C: Tiller number. D: Root length. E: Dry weight of above-ground part. F: Dry weight of underground part.

2.5 *yllt10* 突变表型的遗传分析

将 *yllt10* 突变体与 WT ‘科辐粳 7 号’进行杂交，F_1 代植株表现为野生型。F_1 代自交获得的 F_2 代群体中出现了明显的表型分离，除了野生型植株外，还分离出叶色黄化、分蘖减少的突变型植株。F_2 代中野生型植株为 216 株，突变型植株有 63 株，野生型单株与突变型单株的数量比例接近 3:1 (χ^2=0.86；χ^2<3.84 时，P>0.05)，

表明该突变体的表型由单隐性基因控制。

2.6 *yllt10* 突变基因的精细定位

为了确定 *yllt10* 突变基因在染色体上的位置，以 *yllt10* 突变体与‘93-11’杂交的 F_2 代突变植株作为定位群体，通过图位克隆技术对 *YLLT10* 基因进行定位。随机选取 F_2 代中 21 个突变型单株的叶片，使用 CTAB 法提取基因组 DNA，再利用水稻 12 条染色体上在两个亲本间具有多态性的 SSR 标记进行 PCR 分析，发现 10 号染色体上的两个标记 JSR20 和 JSR28 与突变表型存在连锁。为了扩大定位群体，将 F_2 代的野生型单株进行自交，从其 F_3 代群体中获得 258 个突变型单株，加上 F_2 代突变型单株共计 321 株，继续对目的基因进行精细定位，最终将该基因锁定在 J4 和 J5 两个分子标记之间，物理距离为 32 kb (图 5A)。对定位区间内的注释基因进行分析，发现该区间内一个基因 LOC_Os10g41780 是已报道的控制叶色的 *pale green leaf* (*PGL*)基因[27-28]。将 *yllt10* 突变体和 WT 的 *PGL* 基因进行 PCR 扩增后测序，发现 *yllt10* 突变体中 *PGL* 基因的第 1 个外显子上有 1 个碱基 G 发生缺失(图 5B)，造成移码突变，导致其编码蛋白在第 105 位氨基酸处翻译提前终止(图 5C)。

2.7 *YLLT10* 基因编码叶绿素 a 加氧酶

光合色素主要包括叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素。通过叶绿素循环，叶绿素 a 和叶绿素 b 之间可以相互转化，*YLLT10* 基因编码一个叶绿素 a 加氧酶 CAO1 (chlorophyllide a oxygenase 1)，其催化叶绿素 a 转化为叶绿素 b[29]。由于 *yllt10*

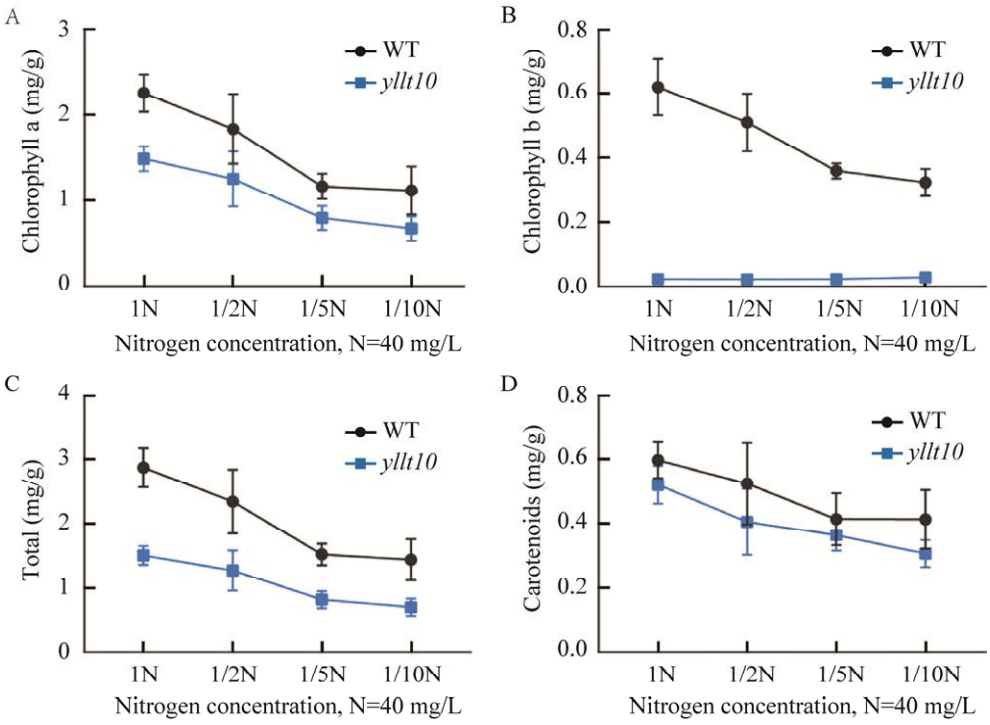

图 4 不同氮素浓度处理后野生型与 *yllt10* 突变体的光合色素含量 A：叶绿素 a 含量. B：叶绿素 b 含量. C：总色素含量. D：类胡萝卜素含量

Figure 4 Photosynthetic pigment content of wild-type and *yllt10* after treatment with different nitrogen concentrations. A: Chlorophyll a content. B: Chlorophyll b content. C: Total pigment content. D: Carotenoid content.

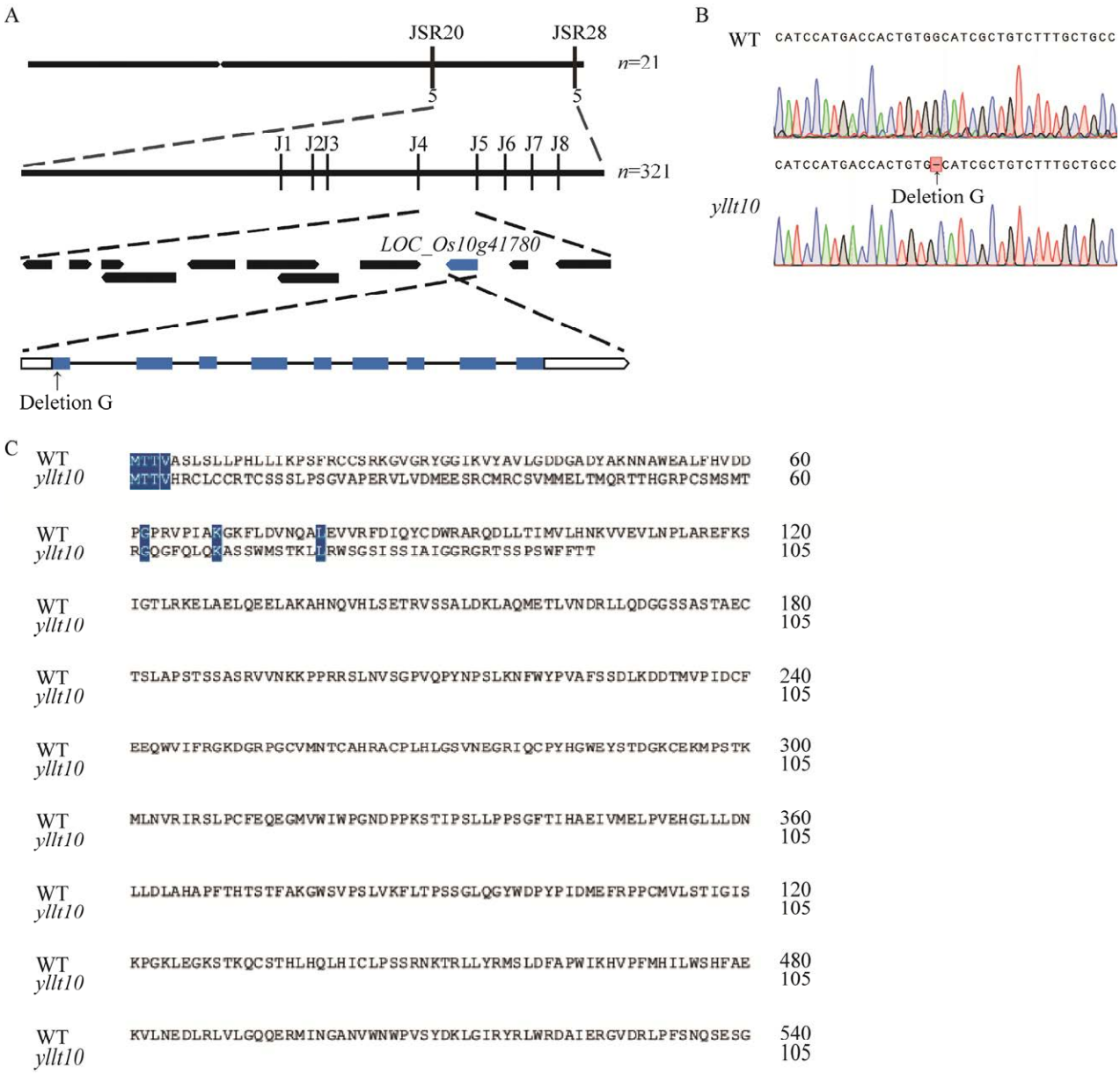

图 5 *YLLT10* 基因的精细定位遗传图谱与候选基因序列分析 A：*YLLT10* 基因的图位克隆. B：*YLLT10* 基因突变位点的测序结果. C：YLLT10 蛋白的序列比对

Figure 5 Fine mapping genetic linkage map and candidate gene sequence analysis of *YLLT10* gene. A: Map-based cloning of the *YLLT10* gene (n is the number of F_2 mutant singletons used for localization analysis, and the number under the marker indicates the number of exchange events detected by the marker). B: Sequencing results of the mutation site of the *YLLT10* gene. C: Amino acid sequence comparison of the YLLT10 protein.

突变体的 *YLLT10* 基因发生了功能缺失型突变，导致 *yllt10* 突变体叶绿素 b 的合成受到影响。将水稻 *PGL* 基因的 CDS 序列回补至 *yllt10* 突变体后，与 *yllt10* 突变体相比，回补材料的分蘖数增加(图 6A、6B)，光合色素含量显著上升，其各表型恢复至野生型水平(图 6D)。

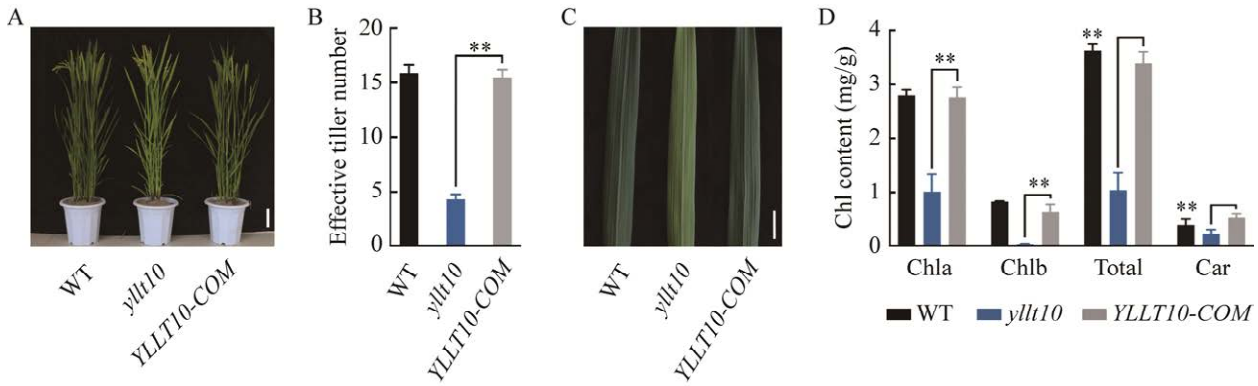

图 6　野生型、*yllt10* 突变体与 *YLLT10* 基因回补材料的表型与光合色素含量对比　A：抽穗期植株表型(bar=20 cm). B：有效分蘖数. C：叶片表型(bar=1 cm). D：光合色素含量. **表示在 $P<0.01$ 水平上极显著，*t* 检验

Figure 6　Comparison of phenotype and photosynthetic pigment content between wild-type, *yllt10* and the *YLLT10* gene complementary plant. A: Plant phenotype at heading stage (bar=20 cm). B: Effective tiller number. C: Phenotype of leaves (bar=1 cm). D: Photosynthetic pigment content. ** represents $P<0.01$, *t*-test.

3　讨论

光合作用效率是影响水稻产量的重要因素。叶色是水稻植株光合色素种类和含量的外在表现，调控水稻叶色的基因通常与光合色素的合成、降解和叶绿体的发育等生理过程紧密相关[30]。本研究中的 *yllt10* 突变体的叶绿素含量显著降低，尤其是叶绿素 b 的含量下降最为明显，进而导致叶片黄化的表型，因此该突变体可能属于叶绿素 b 缺陷型突变体，对于研究叶绿素 b 的合成有着重要意义。*yllt10* 突变体的目标基因 *CAO1* 编码叶绿素 a 加氧酶，主要在叶绿素循环中发挥作用。通过叶绿素循环，叶绿素 a 和叶绿素 b 之间可以相互转化，CAO 是目前已知的唯一催化叶绿素 a 转化为叶绿素 b 的酶[31-32]。叶绿素的生物合成起始于谷氨酰-tRNA (glutamyl-tRNA)被还原为谷氨酰-1-半醛(glutamate-1-semialdehyde)，随后通过 11 个酶促反应生成叶绿素 a 的前体物质植物叶绿素酸酯 a (chlorophyllide a)，在叶绿素合酶(chlorophyll synthase)的作用下将植物醇侧链连接到叶绿素酸酯 a (chlorophyllide a)上完成叶绿素 a (chlorophyll a)的生物合成[31]。叶绿素酸酯 a 是叶绿素 b 生物合成的中间体，有研究表明，叶绿素 a 加氧酶 CAO 通过两步氧合反应将叶绿素酸酯 a 的 7-甲基(7-methyl group)转化为甲酰(formyl group)，从而生成植物叶绿素酸酯 b (chlorophyllide b)，在叶绿素合酶的作用下叶绿素酸酯 b 能在叶绿体内被快速转化为叶绿素 b[29]。光合色素的合成与降解是一个动态的过程，单一色素合成受阻就会影响整个光合作用。叶绿体起源于前质体，由叶绿体外膜、类囊体和基质组成。观察 *yllt10* 突变体的叶绿体结构发现其类囊体片层明显减少，由此推断 *YLLT10* 基因除了调控叶绿素 b 的合成外还会影响叶绿体结构的发育。

水稻的有效分蘖能直接影响水稻的产量。水稻的有效分蘖主要受到基因、激素以及环境因素的共同调控。近年来，诸多调控水稻分蘖的基因被相继报道，例如 *MOC1* (*MONOCULM1*)基因和 *MOC3* (*MONOCULM3*)基因，*MOC1* 基因编码能够与赤霉素信号通路中的 DELLA 蛋白 SLR1 (SLENDER1)结合的 GRAS 蛋白，该

基因不仅可以控制茎的长度，还能控制分蘖的数量[33-34]。水稻理想株型 *IPA1* (*IDEAL PLANT ARCHITECTURE1*)基因编码的 SPL14 蛋白可以通过促进下游靶基因 *TB1* (*TEOSINTE BRANCHED 1*)和 *D53* (*DWARF 53*)的表达来调控水稻的分蘖[35-36]。生长素、细胞分裂素、赤霉素和独脚金内酯均能影响水稻的分蘖数。植物激素位于由多种调节信号构成的中心位置，在促进植物分枝发育的过程中发挥重要作用。此外，环境因素如氮素、温度和干旱等都会影响水稻分蘖。氮素是构成蛋白质、核酸等生物必需化合物的重要元素，在植物的生长发育过程中以调控因子的形式参与调节。研究表明氮素与生长素通过控制 *isopentenyltransferase* (*IPT*)基因的表达从而影响细胞分裂素的合成来调控水稻的分蘖[37]。除此之外，当氮素浓度升高时，与细胞分裂素相关的基因表达量上升，其含量与分蘖芽的伸长呈正相关[38]。

本研究中的 *yllt10* 突变体表型是由于 *CAO1*/*PGL* 基因的功能缺失突变所导致的，据以往研究，*CAO1* 基因编码叶绿素 a 加氧酶，该基因突变后影响叶绿素 b 的合成进而导致水稻叶片黄化[29]。在此基础上，本研究还发现水稻 *yllt10* 突变体对氮素浓度的变化不敏感，这可能是导致 *yllt10* 突变体分蘖显著减少的原因，推测 *YLLT10* 基因可能在水稻利用氮素的过程中发挥作用。

4 结论

水稻 *yllt10* 突变体的叶色发黄、分蘖数显著减少，其叶绿体结构异常，光合色素含量与光合效率均低于 WT 对照，且 *yllt10* 突变体的叶绿素 b 含量极低。*YLLT10* 基因位于水稻的 10 号染色体上，其编码的叶绿素 a 加氧酶 1 在叶绿素循环中可将叶绿素 a 转化为叶绿素 b。*yllt10* 突变体中该基因的第 1 个外显子上有 1 个碱基的缺失，从而导致 YLLT10 蛋白的翻译提前终止。*yllt10* 突变体对氮素浓度的变化不敏感，推测其少分蘖可能是氮素利用率低所致。

REFERENCES

[1] LONG SP. Photosynthesis engineered to increase rice yield[J]. Nature Food, 2020, 1: 105.

[2] 杜文凯, 袁素霞, 胡凤荣. 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 WK, YUAN SX, HU FR. Research progress on molecular mechanisms of the leaf color mutation[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(6): 1888-1897 (in Chinese).

[3] 邓晓娟, 张海清, 王悦, 舒志芬, 王国槐, 王国梁. 水稻叶色突变基因研究进展[J]. 杂交水稻, 2012, 27(5): 9-14, 30.
DENG XJ, ZHANG HQ, WANG Y, SHU ZF, WANG GH, WANG GL. Research advances on rice leaf-color mutant genes[J]. Hybrid Rice, 2012, 27(5): 9-14, 30 (in Chinese).

[4] FALBEL TG, STAEHELIN LA. Partial blocks in the early steps of the chlorophyll synthesis pathway: a common feature of chlorophy b-deficient mutants[J]. Physiologia Plantarum, 1996, 97(2): 311-320.

[5] LI J, YOKOSHO K, LIU S, CAO HR, YAMAJI N, ZHU XG, LIAO H, MA JF, CHEN ZC. Diel magnesium fluctuations in chloroplasts contribute to photosynthesis in rice[J]. Nature Plants, 2020, 6: 848-859.

[6] QIU ZN, CHEN DD, HE L, ZHANG S, YANG ZN, ZHANG Y, WANG ZW, REN DY, QIAN Q, GUO LB, ZHU L. The rice *white green leaf 2 gene* causes defects in chloroplast development and affects the plastid ribosomal protein S9[J]. Rice, 2018, 11(1): 39.

[7] MOCHIZUKI N, BRUSSLAN JA, LARKIN R, NAGATANI A, CHORY J. *Arabidopsis genomes uncoupled 5* (*GUN5*) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(4): 2053-2058.

[8] ZHANG HT, LI JJ, YOO JH, YOO SC, CHO SH, KOH HJ, SEO HS, PAEK NC. Rice *Chlorina-1* and

Chlorina-9 encode ChlD and ChlI subunits of Mg-chelatase, a key enzyme for chlorophyll synthesis and chloroplast development[J]. Plant Molecular Biology, 2006, 62(3): 325-337.

[9] KUSABA M, ITO H, MORITA R, IIDA S, SATO Y, FUJIMOTO M, KAWASAKI S, TANAKA R, HIROCHIKA H, NISHIMURA M, TANAKA A. 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.

[10] MAKINO A, SUZUKI Y, ISHIYAMA K. Enhancing photosynthesis and yield in rice with improved N use efficiency[J]. Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology, 2022, 325: 111475.

[11] ZHANG ZG, CUI XA, WANG YW, WU JX, GU XF, LU TG. The RNA editing factor WSP1 is essential for chloroplast development in rice[J]. Molecular Plant, 2017, 10(1): 86-98.

[12] YONEDA A, WITTMANN BJ, KING JD, BLANKENSHIP RE, DANTAS G. Transcriptomic analysis illuminates genes involved in chlorophyll synthesis after nitrogen starvation in *Acaryochloris* sp. CCMEE 5410[J]. Photosynthesis Research, 2016, 129(2): 171-182.

[13] ZHANG WF, TAN LB, SUN HY, ZHAO XH, LIU FX, CAI HW, FU YC, SUN XY, GU P, ZHU ZF, SUN CQ. Natural variations at *TIG1* encoding a TCP transcription factor contribute to plant architecture domestication in rice[J]. Molecular Plant, 2019, 12(8): 1075-1089.

[14] 刘永强, 李威威, 刘昕禹, 储成才. 水稻分蘖氮响应调控机理研究进展[J]. 遗传, 2023, 45(5): 367-378.
LIU YQ, LI WW, LIU XY, CHU CC. Molecular mechanism of tillering response to nitrogen in rice[J]. Hereditas (Beijing), 2023, 45(5): 367-378 (in Chinese).

[15] LI XY, QIAN Q, FU ZM, WANG YH, XIONG GS, ZENG DL, WANG XQ, LIU XF, TENG S, HIROSHI F, YUAN M, LUO D, HAN B, LI JY. Control of tillering in rice[J]. Nature, 2003, 422: 618-621.

[16] WANG Y, REN T, LU JW, MING R, LI PF, HUSSAIN S, CONG RH, LI XK. Heterogeneity in rice tillers yield associated with tillers formation and nitrogen fertilizer[J]. Agronomy Journal, 2016, 108(4): 1717-1725.

[17] ZHOU W, YAN FJ, CHEN Y, REN WJ. Optimized nitrogen application increases rice yield by improving the quality of tillers[J]. Plant Production Science, 2022, 25(3): 311-319.

[18] RONG CY, LIU YX, CHANG ZY, LIU ZY, DING YF, DING CQ. Cytokinin oxidase/dehydrogenase family genes exhibit functional divergence and overlap in rice growth and development, especially in control of tillering[J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(11): 3552-3568.

[19] ZHANG JY, LIU YX, ZHANG N, HU B, JIN T, XU HR, QIN Y, YAN PX, ZHANG XN, GUO XX, HUI J, CAO SY, WANG X, WANG C, WANG H, QU BY, FAN GY, YUAN LX, GARRIDO-OTER R, CHU CC, et al. *NRT1.1B* is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37: 676-684.

[20] YU J, XUAN W, TIAN YL, FAN L, SUN J, TANG WJ, CHEN GM, WANG BX, LIU Y, WU W, LIU XL, JIANG XZ, ZHOU C, DAI ZY, XU DY, WANG CM, WAN JM. Enhanced OsNLP4-OsNiR cascade confers nitrogen use efficiency by promoting tiller number in rice[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(1): 167-176.

[21] WU K, WANG SS, SONG WZ, ZHANG JQ, WANG Y, LIU Q, YU JP, YE YF, LI S, CHEN JF, ZHAO Y, WANG J, WU XK, WANG MY, ZHANG YJ, LIU BM, WU YJ, HARBERD NP, FU XD. Enhanced sustainable green revolution yield via nitrogen-responsive chromatin modulation in rice[J]. Science, 2020, 367(6478): eaaz2046.

[22] LIU YQ, WANG HR, JIANG ZM, WANG W, XU RN, WANG QH, ZHANG ZH, LI AF, LIANG Y, OU SJ, LIU XJ, CAO SY, TONG HN, WANG YH, ZHOU F, LIAO H, HU B, CHU CC. Genomic basis of geographical adaptation to soil nitrogen in rice[J]. Nature, 2021, 590: 600-605.

[23] 赵灿, 刘光明, 戴其根, 许轲, 高辉, 霍中洋. 氮肥对水稻产量、品质和氮利用效率的影响研究进展[J]. 中国稻米, 2022, 28(1): 48-52, 57.
ZHAO C, LIU GM, DAI QG, XU K, GAO H, HUO ZY. Research progress on the effects of nitrogen fertilizer on rice yield, quality and nitrogen use efficiency[J]. China Rice, 2022, 28(1): 48-52, 57 (in Chinese).

[24] 杨敏文. 化学科技活动一则 分光光度法测定叶片叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量[J]. 化学教学,

2002(8): 44-45.
YANG MW. Determination of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids in leaves by spectrophotometry[J]. Education In Chemistry, 2002(8): 44-45 (in Chinese).

[25] LI S, TIAN YH, WU K, YE YF, YU JP, ZHANG JQ, LIU Q, HU MY, LI H, TONG YP, HARBERD NP, FU XD. Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture[J]. Nature, 2018, 560: 595-600.

[26] ZHANG CC, ZHOU CZ, BURNAP RL, PENG L. Carbon/nitrogen metabolic balance: lessons from cyanobacteria[J]. Trends in Plant Science, 2018, 23(12): 1116-1130.

[27] LEE S, KIM JH, YOO ES, LEE CH, HIROCHIKA H, AN G. Differential regulation of chlorophyll a oxygenase genes in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2005, 57(6): 805-818.

[28] YANG YL, XU J, HUANG LC, LENG YJ, DAI LP, RAO YC, CHEN L, WANG YQ, TU ZJ, HU J, REN DY, ZHANG GH, ZHU L, GUO LB, QIAN Q, ZENG DL. *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.

[29] TANAKA A, ITO H, TANAKA R, TANAKA NK, YOSHIDA K, OKADA K. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(21): 12719-12723.

[30] MA XZ, SUN XQ, LI CM, HUAN R, SUN CH, WANG Y, XIAO FL, WANG Q, CHEN PR, MA FR, ZHANG K, WANG PR, DENG XJ. Map-based cloning and characterization of the novel yellow-green leaf gene *ys83* in rice (*Oryza sativa*)[J]. Plant Physiology and Biochemistry: PPB, 2017, 111: 1-9.

[31] TANAKA R, TANAKA A. Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1807(8): 968-976.

[32] RÜDIGER W. Biosynthesis of chlorophyll b and the chlorophyll cycle[J]. Photosynthesis Research, 2002, 74(2): 187-193.

[33] SHAO GN, LU ZF, XIONG JS, WANG B, JING YH, MENG XB, LIU GF, MA HY, LIANG Y, CHEN F, WANG YH, LI JY, YU H. Tiller bud formation regulators MOC1 and MOC3 cooperatively promote tiller bud outgrowth by activating *FON1* expression in rice[J]. Molecular Plant, 2019, 12(8): 1090-1102.

[34] ZHANG ZY, SUN XM, MA XQ, XU BX, ZHAO Y, MA ZQ, LI GL, KHAN NU, PAN YH, LIANG YT, ZHANG HL, LI JJ, LI ZC. *GNP6*, a novel allele of *MOC1*, regulates panicle and tiller development in rice[J]. The Crop Journal, 2021, 9(1): 57-67.

[35] SPRINGER N. Shaping a better rice plant[J]. Nature Genetics, 2010, 42: 475-476.

[36] LIU MM, SHI ZY, ZHANG XH, WANG MX, ZHANG L, ZHENG KZ, LIU JY, HU XM, DI CR, QIAN Q, HE ZH, YANG DL. Inducible overexpression of *Ideal Plant Architecture1* improves both yield and disease resistance in rice[J]. Nature Plants, 2019, 5: 389-400.

[37] SAKAMOTO T, SAKAKIBARA H, KOJIMA M, YAMAMOTO Y, NAGASAKI H, INUKAI Y, SATO Y, MATSUOKA M. Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice[J]. Plant Physiology, 2006, 142(1): 54-62.

[38] SAKAKIBARA H, TAKEI K, HIROSE N. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(9): 440-448.

(本文责编　陈宏宇)