

# 玉米叶色突变体遗传分析及基因定位

王 飞, 段世名, 李 彤, 王荣纳, 陶勇生

(河北农业大学农学院/国家玉米改良中心河北分中心/华北作物种质资源教育部重点实验室, 保定 071001)

**摘要:** 玉米叶色与叶绿体及结构相关, 调控光合产量, 因而对调控叶色基因的遗传研究或克隆将有助于玉米光合产量的遗传改良和植物光合作用理论机制的解析。本研究以玉米 W22::Mu 介导的综 31 为遗传背景的导入系群体为材料, 获得了细胞核单隐性基因控制、叶绿体结构和数目异常、色素缺失和 PSII 显著降低的叶色突变体。使用覆盖 B73 基因组的 SSR 标记将突变位点定位于约 2.95 Mb 区间 (bnlg1863 ~ umc2075)。基于区段标记开发和 1200 单株分离群体将突变位点精细定位于约 900 kb 区间 (B73 RefGen\_V4; S1 ~ S7 区间), 经区段内基因表达和功能分析获得了候选基因 *Zm00001d010000*, 该基因编码硫氧还蛋白, 与突变体表型形成相关。该研究将为光合产量的遗传改良和植物光合作用理论机制解析提供重要的基因或标记资源。

**关键词:** 玉米; 叶色; 突变体; 基因定位

## Fine Mapping and Candidate Gene Analysis of Leaf Color Mutant in Maize

WANG Fei, DUAN Shi-ming, LI Tong, WANG Rong-na, TAO Yong-sheng

(College of Agronomy, Hebei Agricultural University/ Hebei Sub-center of National Maize Improvement Center/  
North China Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Education Ministry, Baoding 071001)

**Abstract:** The leaf color of maize is associated to the content and structure of chloroplast, which is the compartment and of importance in photosynthesis. Genetic analysis and isolation of genes that control the leaf color will provide insights in the genetic improvement for photosynthetic yield and exploration of the theoretical mechanism. In this study, by screening for maize mutants generated by W22::Mu in introgression lines with genetic background of Z31, we obtained a leaf color mutant with the abnormal chloroplast, lack of pigment and the reduction of PSII, which was controlled by a single recessive locus. By the low-resolution genetic mapping using the SSR markers, this mutation locus was mapped to a 2.95 Mb interval (B73 RefGen\_V4; bnlg1863-umc2075). Furthermore, this locus was finely mapped to a ~900 kb interval (B73 RefGen\_V4; S1-S7) by 1200 individuals plants from BC<sub>6</sub>F<sub>2</sub> and developed SSR. Taking advantage of gene annotation and expression analysis, we identified a strong candidate gene *Zm00001d010000* that encodes for thioredoxin. Thus, the study could provide genetic material and the selection markers that become valuable in theoretical and applied research for increasing photosynthetic yield.

**Key words:** maize; leaf color; mutant; fine mapping

玉米是重要的粮食和饲料作物, 也是遗传学和育种学理论与实践应用的模式作物, 因而对玉米叶

色突变体进行遗传研究或基因克隆将为禾谷类作物光合产量的提高和遗传改良提供有益信息。叶色变

收稿日期: 2016-03-26 修回日期: 2018-04-09 网络出版日期: 2018-09-20

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180920.1435.001.html>

基金项目: 河北农业大学创新创业项目 (2017096); 国家粮食丰收增收科技创新专项 (2017YFD0300901-04)

第一作者研究方向为玉米遗传育种。E-mail: 462188997@qq.com

通信作者: 陶勇生, 研究方向为玉米遗传育种。E-mail: ysh tao2016@126.com

异决定于色素(主要包括:叶绿素和胡萝卜素)含量及比率<sup>[1]</sup>,而叶绿素决定植物功能叶片对光的吸收、传递和能量转换<sup>[2]</sup>,因而叶色变异调控光合效率。类胡萝卜素是一种辅助色素,能促进叶片光形态建成,调控 PSII 系统效率<sup>[3]</sup>。叶绿体是植物光合作用器官,其数目和结构变异将直接影响光合作用效率。因而对叶肉细胞的叶绿体数目及结构、色素含量和 PSII 效率的检测和评价,将为本研究叶色突变体遗传和突变位点候选基因预测提供帮助。

叶色突变是植物发生频率较高的变异,是由细胞核基因或叶绿体基因或者二者互作共同控制的遗传<sup>[4]</sup>。研究表明,叶色变异受原质体分化、编码光系统蛋白的基因、叶绿体基因、蛋白质转运因子和多亚基复合物装配调控因子等相关基因调控<sup>[5]</sup>,预示了植物叶色遗传研究的复杂性和艰巨性。叶绿素途径和类胡萝卜素途径的基因全部被克隆<sup>[6-11]</sup>,而且已分离和克隆了至少 210 个与玉米叶色相关基因或 QTL 位点,其中 18 个与本研究突变体表型类似的叶色突变位点/基因被克隆(<https://www.maizegdb.org/>)。尽管这些为玉米叶色变异遗传研究提供指导,但可能还不完全,或许本研究将作为叶色变异遗传和生物学研究的一个重要补充。

本研究基于本课题组前期创制的叶色突变体<sup>[12]</sup>,属于细胞核单隐性基因控制,以及叶绿体结构异常、色素缺失和 PSII 显著降低的性状变异类型,与报道相似突变体存在差异,开展了该叶色突变体位点的精细定位,旨在为玉米叶色变异研究和作物光合作用理论机制提供有益信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

以玉米自交系综 31(Z31)与 W22::Mu 杂交经 M<sub>2</sub>表型鉴定获得叶色突变体(2008 年,保定),突变体家系野生型与 Z31 连续回交到 BC<sub>6</sub>F<sub>1</sub>,将其自交获得 BC<sub>6</sub>F<sub>2</sub>用于突变体的遗传分析(2011-2015 年,保定),以及生理生化指标、叶片亚细胞结构鉴定和观察。使用 BC<sub>6</sub>F<sub>2</sub>及其自交果穗后代用于突变位点定位(2015-2016 年,保定)。

### 1.2 叶肉细胞叶绿体数目和亚细胞结构观察及叶片色素含量鉴定

将 BC<sub>6</sub>F<sub>2</sub>室内种植取 3 叶期叶片,将清洗干净的叶片置于载玻片上,使用解剖刀片切割叶横切面,

切割叶片于光学显微镜下观察叶肉细胞的叶绿体数目;取 3 叶期叶片切成 1 mm × 2 mm,叶片使用戊二醛处理、1% 钨酸/Pipes 缓冲液固定、5 梯度乙醇脱水和 Epon812 包埋剂处理,全部流程和试剂配制按 Zavaleta-Mancera<sup>[13]</sup>的方法进行。LKB-V 型切片机(莱卡公司,德国)进行包埋叶片超薄切片,铀铅染色后置于日立 H-600 型电子显微镜(日立公司,日本)观察和成像。

取 3 叶期叶片使用 Biochemicals 叶绿素荧光仪(英国汉莎科学仪器公司,英国)测定光合系统 II(PS II)原初光能转化效率比值(Fv/Fm)。每个基因型测定 20 株,而且测定叶片位置保持处于相同或相近部位。测定前叶片暗处理 20 ~ 40 min。

取 3 叶期叶片各 3 株,分别为 0.1 g/株。叶片处理和提取液定容参照 Arnon<sup>[14]</sup>的流程。将提取液置于比色杯,以 95% 乙醇为参比液,使用 Beckman DU800 型分光光度计(Beckman 公司,美国)分别读取 665 nm、649 nm 和 470 nm 的 OD 值。按 Arnon<sup>[14]</sup>的 Lichtenhaler 法计算叶绿素 a 含量 $[A = (13.95 \times OD_{665} - 6.88 \times OD_{649}) \times v / (1000 \times w)]$ 、叶绿素 b 含量 $[B = (24.96 \times OD_{649} - 7.32 \times OD_{665}) \times v / (1000 \times w)]$ 和类胡萝卜素含量 $[(1000 \times OD_{470} - 2.05 \times A - 114 \times B) / 245]$ ,其中,OD、v 和 w 分别为光密度值、提取液总体积和鲜重。以上野生型和突变型株叶片均来自同一 BC<sub>6</sub>F<sub>2</sub>,而且每个单株取样部位均位于第 2 叶相同部位。

### 1.3 叶色突变位点定位及候选基因预测

采用 CTAB 法<sup>[15]</sup>提取 BC<sub>6</sub>F<sub>2</sub>单株 DNA。利用均匀覆盖 B73 基因组的 963 对 SSR(SSR, simple sequence repeat)标记筛选突变型与 Z31 间差异标记,以 BC<sub>6</sub>F<sub>2</sub>野生型为对照,使用 6.00% 聚丙烯酰胺凝胶电泳和 0.33% 硝酸银染检测 PCR 产物<sup>[16]</sup>。基于突变型与 Z31 间差异标记,参照基因组 B73 RefGen\_V4 开发新的 SSR 标记获得突变位点的标记区间。SSR 位点寻找使用 SSR Hunter 软件<sup>[17]</sup>,引物设计使用 Primer Premier 5.0(<http://www.premierbiosoft.com/>),使用这些 SSR 标记检测目标区段染色体交换系用于突变位点的精细定位。基于精细定位区间 B73 RefGen\_V4 的基因注释、突变体光合作用参数评价和它们在叶片表达数据确认候选基因。基因表达数据来源 maizeGDB(<http://www.maizegdb.org/>)。区间具有编码基因和叶片中表达基因被视为候选基因。使用 BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)分析候选基因功能。

2 结果与分析

2.1 突变体遗传分析、叶绿体及结构观察、叶片色素含量及 PSII 值

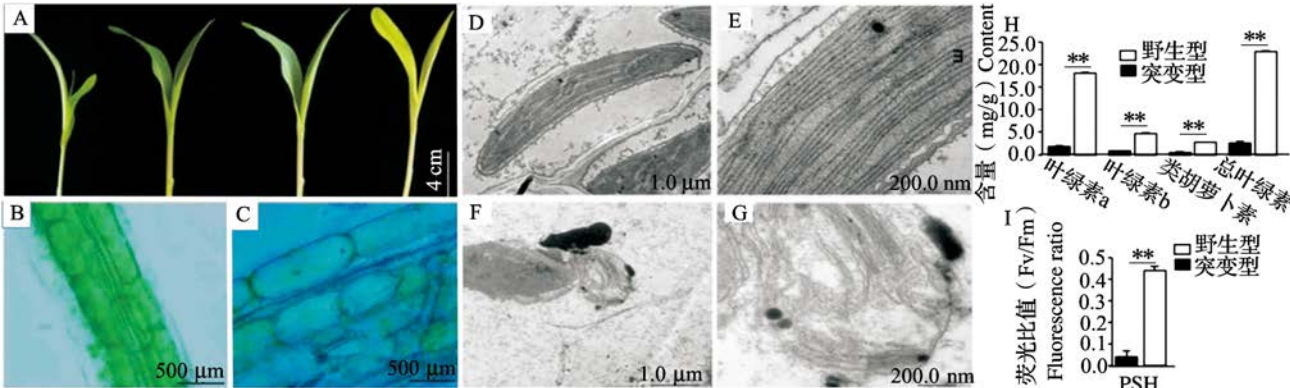
利用分离群体苗期叶片表型遗传分析说明突变性状属于细胞核隐性单基因控制(表 1 和图 1A)。叶肉细胞切片显微镜检测显示:突变型相对野生型具有较少数量的叶绿体(图 1B、C)。叶肉细胞亚细胞结构观察表明:突变型相对于野生型的叶绿体较小且数量少,类囊体片层排列紊乱、基粒较少(图 1D、G),因而该突变体属于叶绿体结构变异类型。叶片色素含量检测表明:突变型与野生型叶片中叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素、

总叶绿素含量存在极显著差异( $P < 0.01$ ,图 1H),说明该突变体属色素合成缺陷类型;叶绿素荧光仪检测突变型的 PSII 值相对野生型较低( $P < 0.01$ ,图 1I),说明突变型叶片 PS II 系统光能转换和捕光效率较低。

表 1 分离群体的遗传分析  
Table 1 The genetic analysis in segregation population

群体 Population	年份 Years	野生型/突变型 Wild/mutant	卡方值 $\chi^2$ -value
BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub>	2012	180/55	0.32
BC <sub>6</sub> F <sub>2</sub>	2015	246/80	0.04

$\chi^2_{1,0.05}$  阈值 = 3.84



A:自左到右分别为 W22::Mu,Z31,以及同一个 BC<sub>6</sub>F<sub>2</sub> 的野生型和突变型;B、C:分别为野生型和突变型的叶肉细胞(500 μm);  
D、E:野生型叶片亚细胞结构(1 μm 和 200 μm);F、G:突变型叶片亚细胞结构(1 μm 和 200 μm);H、I: \*\* 极显著差异  
A:from left to right-W22::Mu,Z31,wild and mutant type from a same BC<sub>6</sub>F<sub>2</sub>,respectively,  
B and C:mesophyll cells for wild and mutant type(500 μm),D and E:the leaf subcellular structure for wild type(1 μm and 200 μm),  
F and G:the subcellular structure for mutant type(1 μm and 200 μm),H and I: \*\* significant difference

图 1 突变体表型、叶绿体及结构和色素含量检测

Fig.1 The phenotypic variation of chloroplast-abnormal mutant

2.2 叶色突变位点定位

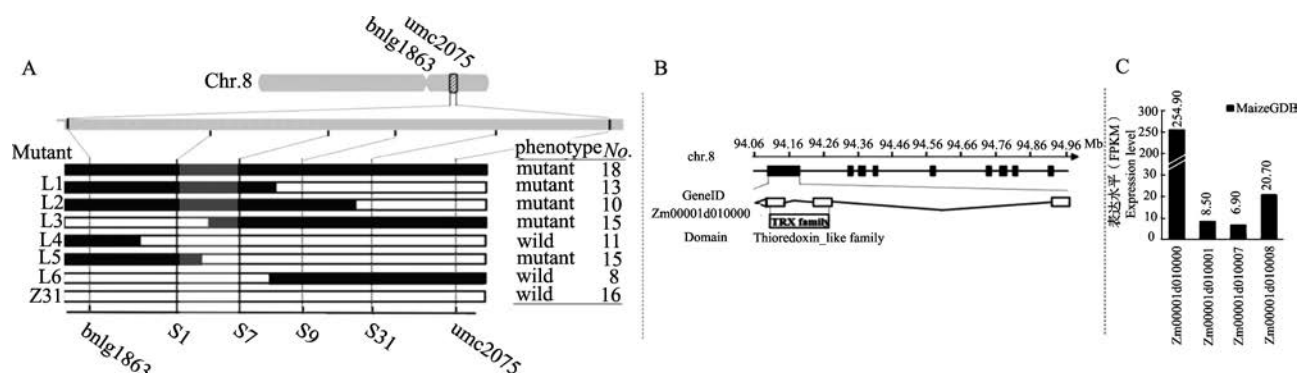
利用覆盖 B73 基因组的 963 对 SSR 标记检测突变型(BC<sub>6</sub>F<sub>2</sub>)与 Z31 间差异,获得了它们基因组间差异位于 bnlg1863 ~ umc2075 区间,物理距离为 2.95 Mb(B73 RefGen\_V4)(图 2A)。基于 B73 基因组序列设计 SSR 引物筛选获得了 4 个多态性标记(表 2)。与此同时,使用 6 个多态性标记检测约 1200 单株 BC<sub>6</sub>F<sub>2</sub> 群体,获得了 6 个染色体交换事件,将突变位点定位于 S1 ~ S7 间,物理距离为 900 kb(B73 RefGen\_V4)(图 2A),含有 9 个编码基因。其中 4 个基因是在苗期叶片中表达(图 2B),Zm00001d010000 在苗期的叶片中高表达,其他 3 个基因在苗期叶片中的表达量均较低(图 2C),因

此将 Zm00001d010000 作为玉米叶色突变位点的候选基因,具有硫氧还蛋白超家族功能(图 2B),与突变体表型形成密切相关。

表 2 用于精细定位开发的 SSR 标记  
Table 2 Thenewly-generated SSR primers for fine mapping

名称 Names	正向/反向 Forward/Reverse
S1	CCAGTGTATTTGTCGTGCG/AAGGCAGGGAGAGTAGGAGA
S7	AGGGCTATTTGTATTCCGC/ATTGTTGGCTAACCGAGG
S9	GCAGTTTCTCACAGCCTTACA/GATTCTTCGCATCCACACAT
S31	AAATCAGTAGCCCGTATCTCC/GGTCGCAAGTAAGTGACGA





A: L1 ~ L6 分别表示 6 个染色体重组事件。黑框和白框分别表示来自突变型和 Z31 的基因型。No. 表示群体数量;  
B: 黑框表示精细定位区段内的编码基因, 白框表示候选基因; C: 精细定位区段编码基因在叶片中的表达  
A: L1 ~ L6 represent the genotype of recombination events, black and white boxes represent from mutant type and Z31, respectively.  
No. represent numbers of population, B: black and white boxes represent the genes inside fine mapping interval and structure  
of candidate gene, C: expression of all encoding genes inside fine mapping interval in leaves at the seedling stage

图 2 叶色突变体位点的精细定位及候选基因结构和表达

Fig. 2 Fine mapping and cloning of the chloroplast-abnormal mutant

### 3 讨论

#### 3.1 叶色突变体定位的科学性

本研究获得细胞核单隐性基因控制的叶色突变, 表型变异与野生型差异显著, 而且课题组又使用 Z31 作为轮回亲本构建了含突变位点的 W22::Mu 介导入系 BC<sub>6</sub>, 为突变表型准确鉴定和群体单株遗传背景“噪音”降低奠定了基础, 因而可显著提高突变位点定位的准确性和灵敏度<sup>[18]</sup>。导入系与 Z31 间的基因组差异评价使用了来源于共享 B73 数据库 (<http://www.maizegdb.org/>) 的 SSR 标记, 而且广泛应用于 QTL 位点定位<sup>[19]</sup>。与此同时, 我们用于精细定位区间的 SSR 标记开发、表型鉴定和精细定位区段内跨叠系构建方法也是被广泛应用的, 而且是科学的和有效的方法<sup>[20-21]</sup>。所以, 本研究结果具有准确性和科学性。

#### 3.2 候选基因 *Zm00001d010000* 与突变体叶色变异的关联

经连锁分析我们获得了控制叶色突变体的候选基因 *Zm00001d010000*, 编码硫氧还蛋白。硫氧还蛋白属于约 220 个氨基酸的小分子蛋白。植物叶绿体含有包括硫氧还蛋白的多种硫氧还蛋白酶系统<sup>[22]</sup>。硫氧还蛋白能与 Mg<sup>2+</sup> 整合酶 CHLI 亚基互作, 而 Mg<sup>2+</sup> 整合酶调控 Mg<sup>2+</sup> 与叶绿素合成前体原卟啉 IX 的整合<sup>[23-24]</sup>, 因而 *Zm00001d010000* 变异影响了叶绿素合成, 进而出现突变体色素含量降低的表型; 硫氧还蛋白经 PLN1 蛋白调控叶绿体基因转录和叶绿

体发育<sup>[25]</sup>, 因而 *Zm00001d010000* 变异可能出现突变体 PSII 值降低和叶绿体结构异常。我们推测 *Zm00001d010000* 是调控光合作用的多功能复合体, 更精确功能机制需要进一步验证。

#### 参考文献

- [1] Mochizuki N, Tanaka R, Grimm B, Masuda T, Moulin M, Smith A G, Tanaka A, Terry M J. The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle. *Trends in Plant Science*, 2010, 15 (9): 488-498
- [2] 刘贞琦, 刘振业, 马达鹏, 曾淑芬. 水稻叶绿素含量及其与光合速率关系的研究. *作物学报*, 1984, 10(1): 57-64
- [3] Franco A C, Matsubara S, Orthen B. Photoinhibition, carotenoid composition and the co-regulation of photochemical and non-photochemical quenching in neotropical savanna trees. *Tree Physiology*, 2007, 27(5): 717-725
- [4] 吴军, 陈佳颖, 赵剑, 林冬枝, 董彦君. 2 个水稻温敏感叶色突变体的光合特性研究. *中国农学通报*, 2012, 28(21): 16-21
- [5] 徐培洲, 李云, 袁澍, 张红宇, 彭海, 林宏辉, 汪旭东, 吴先军. 叶绿素缺乏水稻突变体中光系统蛋白和叶绿素合成特性的研究. *中国农业科学*, 2006, 39(7): 1299-1305
- [6] 史典义, 刘忠香, 金危危. 植物叶绿素合成、分解代谢及信号调控. *遗传*, 2009, 31(7): 698-704
- [7] 杨伟峰. *Mutator* 转座子介导的玉米叶色突变体侧翼序列的克隆及遗传分析. 保定: 河北农业大学, 2012
- [8] Xing S, Miao J, Li S, Qin G, Tang S, Li H, Gu H, Qu L J. Disruption of the *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR)* gene results in albino, dwarf and defects in trichome initiation and stomata closure in *Arabidopsis*. *Cell Research*, 2010, 20 (6): 688-700
- [9] Tripathy B C, Pattanayak G K. Chlorophyll biosynthesis in higher plants. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, 2012, 34: 63-94
- [10] Bolivar D W. Recent advances in chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research*, 2006, 90(2): 173-194
- [11] 王平荣, 张帆涛, 高家旭, 孙小秋, 邓晓建. 高等植物叶绿素生物合成的研究进展. *西北植物学报*, 2009, 29(3): 629-636
- [12] Yang W F, Tian Y H, Wang T T, Wang R N, Tao Y S. Isolating

- and confirming the *MuDR*-inserted flanking sequences of maize. *Cytology & Genetics*, 2017, 51 (2) : 142-148
- [13] Zavaleta-Mancera H A, Ortega-Ramírez L G, Jiménez-García L F, Sánchez-Vivero G, Alarcón A. Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure in *Azolla filiculoides* Lam. *Microscopy and Microanalysis*, 2016, 22 (S3) : 1206-1207
- [14] Aron D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in beta vulgaris. *Plant Physiology*, 1949, 24 (1) : 1-15
- [15] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8 (19) : 4321-4325
- [16] Santos F R, Pena S D, Epplen J T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genetics*, 1993, 90 (6) : 655-656
- [17] Kanto T, Takehara T, Katayama K, Ito A, Mochizuki K, Kuzushita N, Tatsumi T, Sasaki Y, Kasahara A, Hayashi N. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.) : Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research*, 2001, 11 (8) : 1441-1452
- [18] Wang L, Zhang Z, Wei L, Zhang D F, Teng F, Tao Y S, Zheng Y L. The residual background genome from a donor within an improved line selected by marker-assisted selection: impact on phenotype and combining ability. *Plant Breeding*, 2009, 128 (5) : 429-435
- [19] Lander E S, Botstein D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 1989, 121 (1) : 185-199
- [20] 詹晶晶, 邢文慧, 田玉焕, 范子洋, 陶勇生. 基于掖 478 导入系的玉米百粒重 QTL 鉴定. *植物遗传资源学报*, 2015, 16 (5) : 955-960
- [21] Zhan J J, Wang F, Xing W, Liu J, Fan Z, Tao Y S. Fine mapping and candidate gene prediction of a major QTL for kernel number per ear in maize. *Molecular Breeding*, 2018, 38 (3) : 27. doi:org/10.1007/s11032-018-0787-0
- [22] Schürmann P, Buchanan B B. The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2008, 10 (7) : 1235-1274
- [23] Balmer Y, Koller A, Del V G, Manieri W, Schürmann P, Buchanan B B. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *PNAS*, 2003, 100 (1) : 370-375
- [24] Luo T, Fan T, Liu Y, Rothbart M, Yu J, Zhou S, Grimm B, Luo M. Thioredoxin redox regulates ATPase activity of magnesium chelatase CHL1 subunit and modulates redox-mediated signaling in tetrapyrrole biosynthesis and homeostasis of reactive oxygen species in pea plants. *Plant Physiology*, 2012, 159 (1) : 118-130
- [25] Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M, Greiner E, Ustün S, Melzer M, Petersen K, Lein W, Börnke F. Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner; evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, 2010, 22 (5) : 1498-1515