

大豆黄绿叶突变体 NJ9903-5 性状表现与基因定位研究

孔可可,许孟歌,王亚琪,孔杰杰,Al-Amin G M,赵团结

(南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室(综合)/作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏 南京,210095)

摘要:叶色突变体既可用于作物叶绿素合成、降解和光合作用等研究,也可作为标记基因为作物育种利用。本文对一个新发现的大豆黄绿叶自发突变体 NJ9903-5 进行遗传鉴定。结果表明:从对生真叶开始,该突变体幼嫩叶呈黄色,随着生长叶片逐渐转变为绿色。黄化叶片叶绿体数目下降,基质片层减少且排列疏松,叶绿素 a、b、类胡萝卜素含量都极显著下降;其对株高、主茎节数、单株粒数、单株荚数有负效应,但对百粒重、蛋白质含量、油脂含量影响小,杂交后代中上述性状变异大。3 个杂交群体遗传分析表明该性状受一对隐性核基因控制,利用 F₂ 隐性个体将目标基因 *ycl* 定位在 SSR 标记 BARCSOYSSR_02_1445 和 BARCSOYSSR_02_1477 之间约 366 kb 区段,包含 36 个候选基因。测序分析发现在突变体中,叶绿体膜转运蛋白相关基因 Glyma. 02G233700 第 1 个外显子第 38 个碱基 G 缺失,移码突变导致蛋白翻译提前终止,结合前人研究结果,推测其为黄绿叶的目的基因 *ycl*。

关键词:大豆;叶绿素缺失突变;形态特点;遗传分析;基因定位

中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2017. 04. 0494

Gene Mapping and Character Performance of A Yellow-green Leaf Mutant NJ9903-5 in Soybean

KONG Ke-ke, XU Meng-ge, WANG Ya-qi, KONG Jie-jie, Al-Amin G M, ZHAO Tuan-jie

(Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/Key Laboratory for Biology and Genetic Improvement of Soybean (General), Ministry of Agriculture/National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

Abstract: Leaf color mutants are specific experimental materials in the study of chlorophyll synthesis, degradation and photosynthesis and can also be used as a marker trait in crop breeding. The results of the study on a spontaneous yellow-green seedling mutant NJ9903-5 showed that the young leaves from the opposite unifoliolate at VC growth stage to each trifoliolate ones exhibited yellow and gradually turn to green till mature. The number of chloroplast in yellow leaves decreased with less and loosely arranged stroma lamellae. Moreover, the contents of chlorophyll a, b and carotenoid significantly decreased. A large number of variations of seven agronomic and quality traits were found in two F₂ populations from the crosses between NJ9903-5 and normal parents. The mutant F₂ plants had significantly low values of plant height, number of nodes on main stem, pods and seeds number per plant in comparison with normal plants, while no significant differences were detected for 100-seed weight, protein and oil content. Genetic analysis revealed that the mutant trait was controlled by a recessive nuclear gene designated as *ycl*. The gene was mapped in a physical interval of 366 kb region between SSR markers BARCSOYSSR_02_1445 and BARCSOYSSR_02_1477 on chromosome 2. Among the 36 annotation genes in the region, Glyma. 02G233700, a predicted chloroplast membrane transport protein, was identified. Sequencing analysis showed that a deletion of G nucleotide at the 38 base of exon 1 was detected in the NJ9903-5, and the frame shift mutation of Glyma. 02G233700 can lead to a premature termination of the protein translation.

Keywords: Soybean (*Glycine max* L.); Chlorophyll deficient mutant; Morphological characteristics; Genetic analysis; Gene mapping

植物叶绿体是半自主型细胞器,其生长发育受核基因组和叶绿体基因组共同调控,其发育受许多基因调控^[1]。作为光合作用的细胞器,叶绿体中叶绿素含量与组成可影响作物的光合能力,其数量差异可在叶色上体现。植物中叶绿素缺失的叶色变异较常见,可分为白化、黄化、淡绿、绿白、白翠、黄绿、绿黄和条纹等类型^[2]。各种作物有许多叶色突变体报道,如水稻叶色突变体已有 180 个^[3],在玉米

中已定位的叶色突变基因有 210 个^[4]。黄绿苗随着叶片成熟叶色逐渐变绿,对植株生长的负效应相对较小,作为标记性状具有一定的育种利用价值^[5]。这类突变体是深入研究叶绿体发育及叶绿素合成与降解分子机理的特异材料^[6],对其深入研究,有助于研究叶绿素的生物起源、光合作用、叶绿体的进化及相关的生理、生化过程^[7]。

大豆种子中约含有 40% 蛋白质和 20% 油脂,在

收稿日期:2017-02-23
基金项目:国家自然科学基金(31271750,31571691);长江学者和创新团队发展计划(PCSIRT13073);江苏省现代作物生产协同创新中心项目(JCIC-MCP)。
第一作者简介:孔可可(1990-),男,硕士,主要从事大豆分子育种研究。E-mail: 2015101069@njau.edu.cn。
通信作者:赵团结(1969-),男,博士,教授,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: tjzhao@njau.edu.cn。

人民的经济生活上扮演着重要的角色。高产是当前大豆最主要育种目标,而提高叶光合效率是重要探索途径,对叶色变异的研究有助于揭示大豆叶绿体发育及光合作用机理研究,促进高光效育种工作。大豆叶绿体缺失突变体报道较多,国外已有超过 58 个大豆叶色突变体被鉴定出来,其中黄绿叶突变体约有 32 个,绝大部分是隐性单基因控制,还有一些为细胞质遗传^[8]。已有 20 多个控制叶绿素缺失的基因被发现,部分基因已被定位在 1、2、3、6、7、8、10、13、14、15 号染色体上^[9-12]。国内也有一些大豆叶绿素缺失突变体发掘与遗传报道,包括大豆细胞质遗传芽黄突变体 NJ89-3^[13]、Cyt-y₄^[14],由单隐性基因控制芽黄突变体吉农辐 77-01 和吉农辐 79-02^[15],胚胎致死黄化突变体 y₂₁^[16],具有较强抗氧化能力叶绿素缺失突变体 HS821^[17],高光能利用率叶绿素缺失突变体龙辐 82-00464^[18]等。近期通过构建大豆突变体库,也发掘出许多叶绿素缺失突变体^[19-20]。

大豆叶绿素缺失突变体 MinnGold、T219H(y11, Glyma13g30560)、CD-5(Glyma15g0868)、T378H(Glyma.03G230300, *GmPsbP*)、T379(Glyma.02G233700, *GmTic110*)等目标基因已被克隆,和镁螯合酶 I 亚基(Mg-chelatase I subunits)^[21]、叶绿体内膜转移蛋白、PsbP 蛋白^[10]有关。总体上,大豆叶色调控基因功能研究相对较少。本文对一个新发现的黄绿叶突变体 NJ9903-5 进行形态、生理生化分析和基因定位研究,以期大豆叶绿素合成与代谢分子调控机理及光合作用研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

NJ9903-5 选自 OT89-6 × 电白黑豆重组自交系群体一个 F_{2:6}家系的黄绿叶单株,其株型、籽粒形态与该家系正常叶色单株无明显差异,推测其为自发突变所致。经过多代自交观察,其黄绿叶表型遗传稳定。2014 年将叶色表现正常的 Williams 82、科丰 1 号、南农 1138-2 分别与 NJ9903-5 杂交,同年在海南繁殖科丰 1 号 × NJ9903-5 杂交种子;2015 年在南京农业大学江浦实验基地种植该组合 F₂代种子及 Williams 82 × NJ9903-5、南农 1138-2 × NJ9903-5 组合杂交种子;2016 年种植 NJ9903-5 × 科丰 1 号 F_{2:3}和其它两个组合 F₂种子及亲本。

1.2 性状调查与统计分析

1.2.1 遗传群体叶色 真叶期(VC)开始观察叶色。苗期黄化和正常绿叶差异明显,以 VC、V3 期调查结果确定植株为正常或黄化类型。采用卡平方检测分离比。

1.2.2 光合色素含量测定 在室内光照培养箱种

植突变体和野生型植株,VC ~ V3 期,分别随机选取 3 株按照 Lichtenthaler^[22]描述的方法测定幼嫩叶片光合色素含量。每株每次测定 4 次,取平均值。在 V4 期,测定真叶及各三出复叶的光合色素含量。采用 t 测验比较二者差异。

1.2.3 农艺品质性状 在 Williams 82 × NJ9903-5、南农 1138-2 × NJ9903-5 组合 F₂群体中,于成熟期分别随机挑选突变和正常个体各 20 株,按照邱丽娟等^[23]描述的方法考察株高、主茎节数、单株荚数、单株粒数、百粒重性状,使用瑞士 FOSS 公司生产的 1255 型 FOOD&FEED ANALYSE 近红外仪测定籽粒蛋白质和油分含量。采用 t 测验比较二者差异。

1.3 透射电子显微镜分析

在 VC 期,分别采取 NJ9903-5 和野生型植株同一部位的叶片,用 2.5% 戊二醛(用 25% 的戊二醛和磷酸缓冲溶液配置)固定,采取抽真空的方法使叶片下沉,4℃ 条件下放置 24 h 以上。磷酸缓冲溶液冲洗 3 次,1% 锇酸固定 1 h,磷酸缓冲溶液冲洗 3 次,用不同浓度梯度的乙醇和丙酮逐级脱水 5 min,最后用树脂包埋,切片后用醋酸铀染色,透射电镜下观察其形态结构。

1.4 基因定位和候选基因分析

利用 3 个组合 F₂群体进行基因定位。按照 CTAB 法提取亲本及 F₂单株叶片中的基因组 DNA。采用 Michelmores^[24]提出的分群分析法(bulked segregant analysis,BSA)来筛选突变基因的连锁标记。在科丰 1 号 × NJ9903-5 F₂群体中分别随机选取 10 个正常和突变个体,其 DNA 等量混合,分别创建正常(显性池)和突变(隐性)基因池。利用已公布的大豆遗传图谱,从中均匀挑选出 1 015 对 SSR 引物用于多态标记筛选,再用 F₂群体的隐性单株来验证多态标记是否连锁。进一步用 Williams 82 × NJ9903-5、南农 1138-2 × NJ9903-5 组合 F₂代隐性个体进行精细定位。

引物序列来自 SoyBase(<http://soybase.org/>),并由英骏(Invitrogen)生物技术(上海)有限公司合成。*Taq* DNA Polymerase、dNTP Mix 及 DNA Ladder(50 bp)均购自天根生化科技(北京)有限公司。PCR 总体系为 10 μL 包括:3.0 μL 10 ng·μL⁻¹ DNA 模板、1.5 μL 10 × Buffer、0.8 μL 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂、0.2 μL 2.5 mmol·L⁻¹ dNTP、0.1 μL 5 U·μL⁻¹ *Taq* DNA polymerase、1.4 μL ddH₂O、3.0 μL 2 pmol·μL⁻¹引物。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s,共 33 次循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。取 1 μL 加入溴酚蓝的 PCR 产物点样于 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶中,在 220 V 恒定电压下电泳 45 ~ 60 min,硝

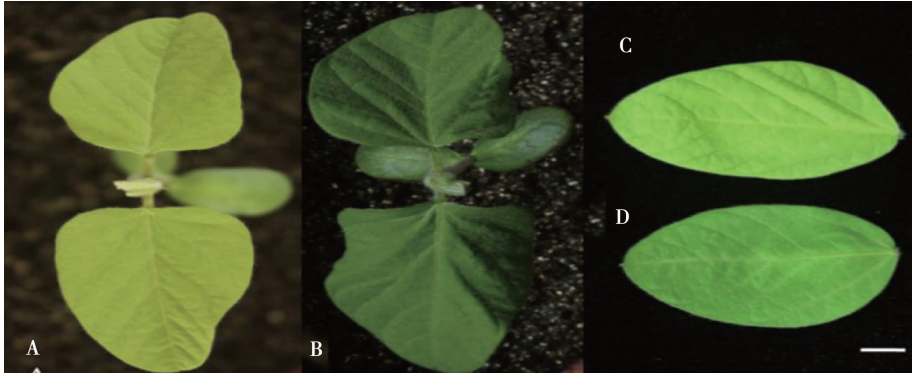
酸银染色观察。

利用 Phytozome (<http://www.phytozome.net>) 上的注释信息对候选基因进行分析。利用 Primer Premier 5.0 软件设计测序引物(正向:5'-AACCACTCC-ACTCTTCTCTACT-3'和 5'-ATTCGGA CTGGTAAACG-3';反向:5'-CTGAATGAGCTGCTTCAAC-3'和 5'-CAGCACTGCACTCATCTCTAT-3'),采用高成功率 PCR 酶 KOD FX(TOYOBO 日本公司)扩增突变体的编码序列,通过测序来确定碱基的差异。

2 结果与分析

2.1 NJ9903-5 叶色表型特征

在田间正常生长条件下,对称真叶即表现出黄化表型,之后新长出的幼嫩叶均也表现为黄化,随着植株的生长,老熟叶片逐渐转绿,结荚期所有叶片均为正常绿色。表明 NJ9903-5 具有黄绿苗特点。从图 1 可见,光温培养箱中生长的 NJ9903-5 呈明显黄色,与野生型差异明显。



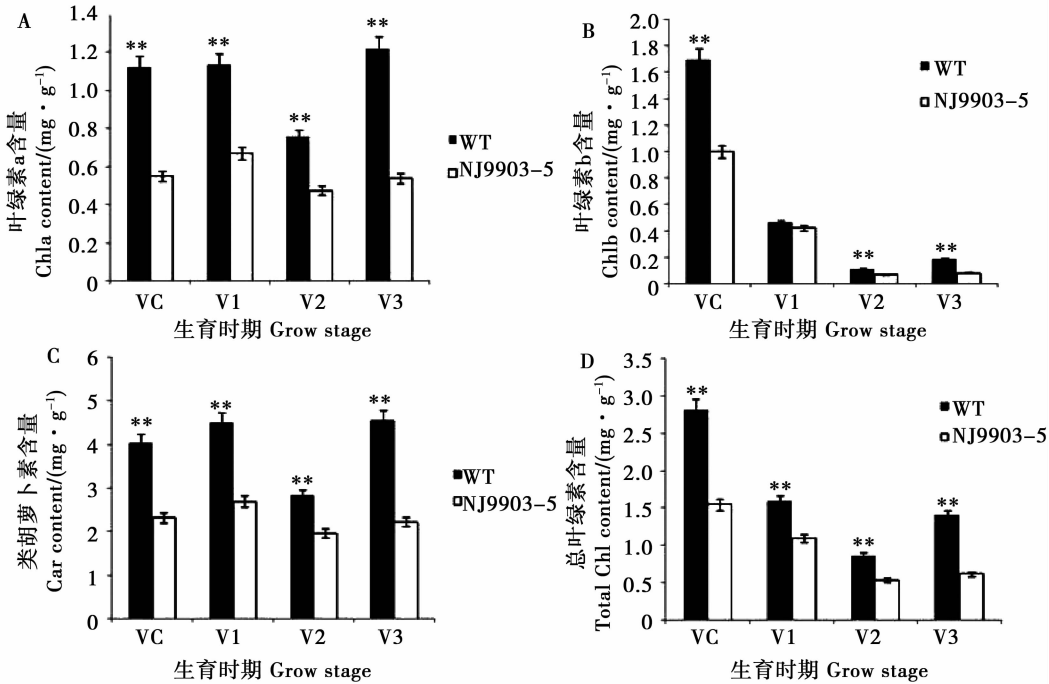
A, B:真叶表型;C, D:第二片复叶中间小叶。标尺=1 cm
A, B: Opposite unifoliate leaves; C, D: Leaflet of the second trifoliate leave. Bar = 1 cm.

图1 NJ9903-5 (A,C) 和野生型 (B,D) 幼苗叶色表现

Fig.1 Leaf color of NJ9903-5 mutant (A, C) and its wild-type plants (B, D)

叶色变化可以体现光合色素的改变。从图 2 可见,从对生真叶到第 3 片复叶,突变体嫩叶的叶绿素 a、类胡萝卜素、总叶绿素含量均显著低于野生型,除

第一片复叶,其它叶位的叶绿素 b 也显著低于野生型。表明 NJ9903-5 黄化叶的光合色素含量显著降低。



A:叶绿素 a;B: 叶绿素 b;C: 类胡萝卜素;D: 叶绿素总量。*表示 0.01 水平上 t 测验差异显著。

A: Chlorophyll a content; B: Chlorophyll b content; C: Carotenoid content; D: Total chlorophyll content. ** significantly different at P < 0.01 by t-test.

图2 野生型和 NJ9903-5 不同叶位幼嫩叶的光合色素含量

Fig.2 Photosynthetic pigments contents of different young leaves in NJ9903-5 and its wild type (WT)

随着植株生长,不同叶位的叶片逐渐转绿。在 V4 期测定真叶及各三出复叶的光合色素含量,突变体叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素、总叶绿素含量略低于野生型。在不同的叶片中,叶绿素 a 和类胡

萝卜素与野生型相比差异较大,叶绿素 b 略有差异。在野生型和突变体中,从真叶到第四片三出复叶,叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素、总叶绿素含量整体逐渐升高。

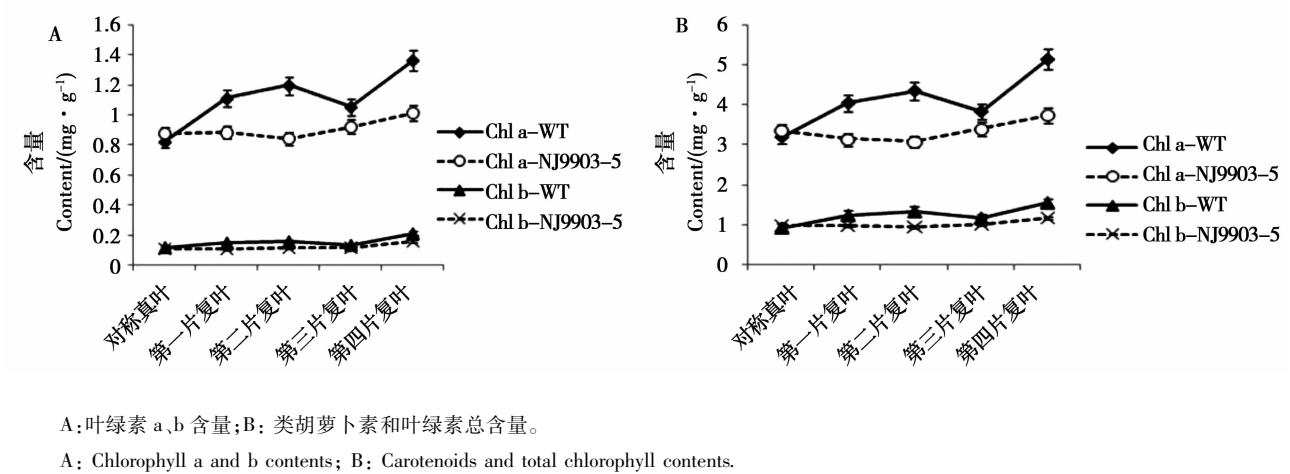
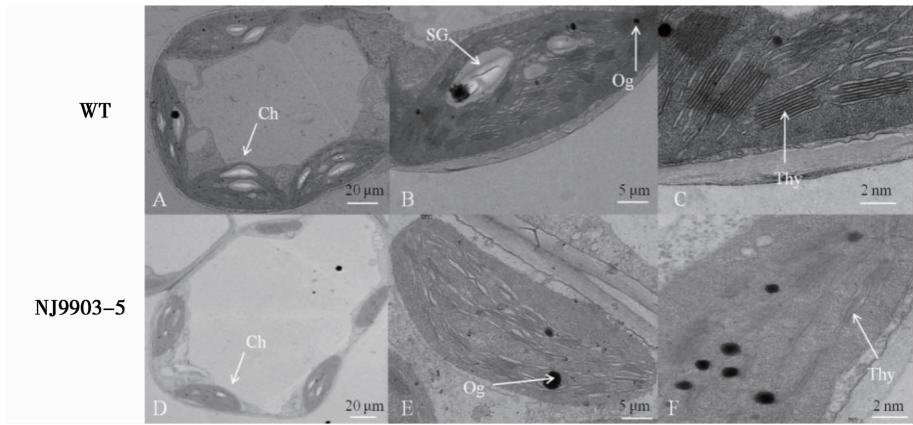


图 3 NJ9903-5 和野生型 V4 期不同叶位光合色素的含量
Fig. 3 Photosynthetic pigment contents of leaves on different position in NJ9903-5 and the wild type

对 NJ9903-5 和野生型幼嫩真叶进行透射电镜观察,发现突变体的叶绿体数量比野生型少。突变体中叶绿体嗜饿小体增多,基粒模糊,基质片层明

显减少且较为疏松,而野生型叶绿体基质浓厚,类囊体丰富,基粒垛叠整齐且排列紧密(图 4)。该结果表明,早期叶绿体的发育受到了影响。



Ch:叶绿体; SG: 淀粉颗粒; Og: 嗜饿小体; Thy: 类囊体片层。
Ch: Chloroplast; SG: Starch granule; Og: Osmiophilic granule; Thy: Thylakoid lamellar.

图 4 NJ9903-5 和野生型幼嫩真叶叶绿体超微结构

Fig. 4 Chlorophyll ultrastructure of the unifoliate leaves in wild type and NJ9903-5

2.2 农艺、品质性状表现

从表 1 可见,2 个组合中突变体植株的百粒重、蛋白质含量、油脂含量与正常叶色植株均无显著差异。株高、单株荚数、单株粒数则存在极显著差异,主茎节数在南农 1138-2 × NJ9903-5 组合中存在极显著差异,在 Williams 82 × NJ9903-5 组合中为显著差异。表明叶色变化对突变体植株生长产生了影

响,导致植株变小,而对籽粒性状的影响相对较小。2 个群体中突变体株高、主茎节数、单株荚数、单株粒数均存在较多变异,南农 1138-2 × NJ9903-5 组合中黄绿叶植株 4 个性状的变异系数分别是 9.3%、14.0%、39.3%、43.3%,而 Williams 82 × NJ9903-5 组合中则为 14.8%、14.7%、37.9%、32.3%,从中可选出综合性状优良的黄绿叶个体。

表 1 2 个组合叶色正常和突变体植株 7 个农艺、品质性状比较

Table 1 Performance of 7 agronomic and quality traits between normal and mutant plants in two F₂ populations

性状 Trait	Nannong1138-2 × NJ9903-5		Williams82 × NJ9903-5	
	正常株 Normal	突变株 Mutant	正常株 Normal	突变株 Mutant
株高 Plant height /cm	50.40 ± 3.70	38.80 ± 3.61 **	54.67 ± 5.01	45.40 ± 6.72 **
主茎节数 Node number on main stem	18.73 ± 1.83	16.00 ± 2.24 **	19.80 ± 2.04	18.33 ± 2.69 *
单株荚数 Number of pod per plant	32.00 ± 8.81	23.07 ± 9.07 **	43.33 ± 12.25	25.73 ± 9.74 **
单株粒数 Number of seed per plant	54.87 ± 23.00	34.60 ± 14.97 **	77.67 ± 29.55	41.33 ± 13.33 **
百粒重 100-seed weight /g	12.78 ± 3.30	11.77 ± 2.33	10.22 ± 2.20	10.67 ± 1.83
蛋白质含量 Seed protein content/%	46.12 ± 0.36	45.54 ± 0.48	42.13 ± 1.56	38.83 ± 0.88
油脂含量 Seed oil content /%	18.28 ± 0.69	18.14 ± 0.46	20.20 ± 0.47	21.48 ± 0.42

*, ** 分别表示在 $P=0.05, 0.01$ 水平上差异显著。
*, ** indicates significant difference at $P=0.05, 0.01$ levels by t -test, respectively.

2.3 黄绿叶遗传分析

正常叶色亲本科丰 1 号、Williams 82、南农 1138-2 与 NJ9903-5 杂交 F₁ 植株叶色均表现正常绿色,表明该黄绿叶为隐性性状。F₂ 群体中出现叶色分离(表 2),在科丰 1 号 × NJ9903-5 组合中,正常叶色植株 53 株,黄绿苗有 18 株,经卡平方测验符合正常:黄绿苗为 3:1 的分离比($\chi^2=0.04, P=0.95$),对

该组合 19 个绿叶 F₂ 单株进行后代测验,结果 13 行分离,6 行不分离,符合 2:1 ($\chi^2=0.86, P=0.87$) 的基因型分离比例,而 F₂ 黄绿叶植株衍生的 F_{2:3} 株行均表现黄绿苗。Williams 82 × NJ9903-5 和南农 1138-2 × NJ9903-5 组合 F₂ 群体均符合 3:1 的分离比(表 2)。综上,推断 NJ9903-5 黄化性状受单个隐性基因控制,命名为 *ygl*。

表 2 3 个组合 F₂ 群体叶色分离比例测验结果

Table 2 Segregation ratio and Chi-square test of normal to mutant plants in 3 F₂ populations

组合	总株数	正常株数	突变株数	$\chi^2_{3:1}$ 值	P 值
Combination	No. of total plant	No. of normal plant	No. of mutant plant	$\chi^2_{3:1}$ value	P value
科丰 1 号 × NJ9903-5 Kefeng 1 × NJ9903-5	71	53	18	0.04	0.95
Williams 82 × NJ9903-5	500	379	121	0.13	0.68
南农 1138-2 × NJ9903-5 Nannong1138-2 × NJ9903-5	550	420	130	0.48	0.46

2.4 突变基因精细定位

用均匀分布于大豆 20 条染色体上的 1 015 对 SSR 引物对科丰 1 号 × NJ9903-5 显隐池进行多态标记的筛选。结果发现 2 号染色体上的 Satt041、Satt703、Satt459 标记在两个基因池间出现多态。利用 18 个 F₂ 隐性单株及第 2 号染色体上的多态标记,将 *ygl* 基因初定位于标记 Satt546 和 Sat_069 之间(图 5)。进一步利用 Williams 82 × NJ9903-5 和南农 1138-2 × NJ9903-5 组合 F₂ 隐性单株,分别将目标基因 *ygl* 精细定位于 Sat_139 和 BARCSOYSSR_02_1477、BARCSOYSSR_02_1445 和 Sat_069 之间。取其交集部分,最终将基因 *ygl* 定位于 BARCSOYSSR_

02_1445 和 BARCSOYSSR_02_1477 之间,物理距离约为 366 kb(图 5)。

2.5 候选基因分析

ygl 定位区段包含 36 个候选基因。根据候选基因功能注释,发现基因 Glyma.02g233700 和叶绿体膜转运蛋白有关。通过设计特异性引物,从 NJ9903-5 扩增出 Glyma.02g233700 基因的 CDs 片段。测序结果和 Williams 82 比较发现,NJ9903-5 突变体在 Glyma.02g233700 基因的第一个外显子区域内,第 38 个碱基 G 缺失,导致第 13 位氨基酸由精氨酸变成亮氨酸而且移码导致蛋白翻译提前终止,最终形成了一个包含原有 12 个氨基酸和 108 个新形

成氨基酸残基的蛋白(图 6)。碱基的突变引起氨基酸的改变,进而改变蛋白的结构域,最终体现在功能上的变化。Glyma. 02g233700 是一个与叶绿体膜

转运蛋白有关的基因,推测此基因的功能改变导致了叶色改变。

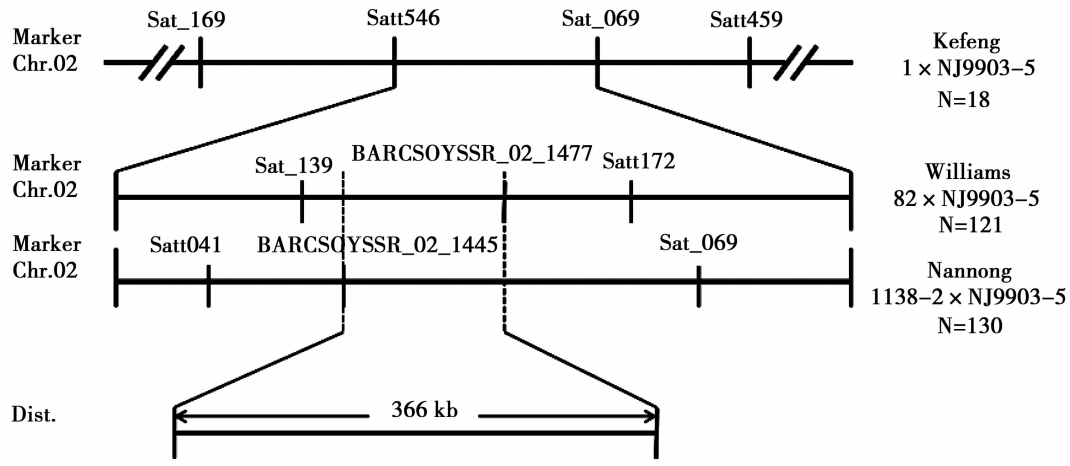


图 5 NJ9903-5 黄绿叶基因 *ygl* 的精细定位
Fig. 5 Fine mapping of the *ygl* gene in NJ9903-5

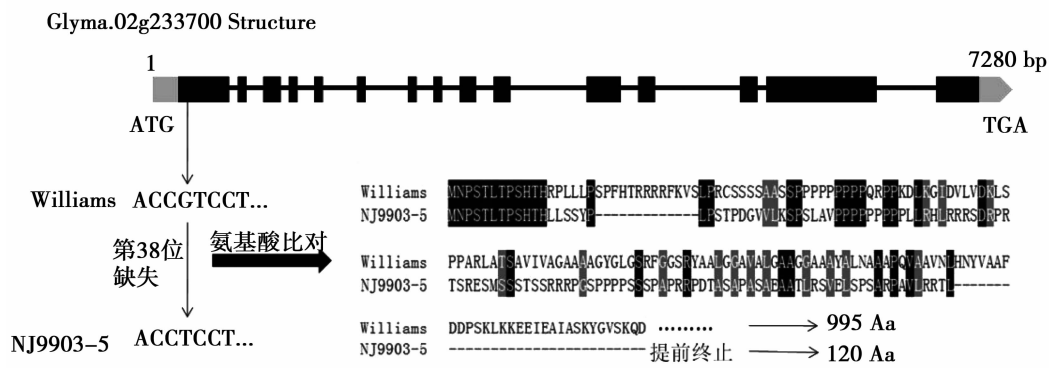


图 6 Glyma. 02g233700 基因结构及蛋白比对
Fig. 6 Gene structure and alignment protein of Glyma. 02g233700

3 讨 论

叶绿素在植物光合作用中扮演着重要的角色,深入了解叶绿素合成的相关基因,明确其表达调控机制,可为培育高光效的作物品种、提高作物产量奠定理论基础。从 19 世纪 30 年代就开始了叶色突变体的研究,发现叶色突变是一种遗传学现象,并与光合色素的合成与降解、叶绿体发育、血红素代、其它叶绿体蛋白等的异常有关。引起叶色变异的机理较多,叶色黄化突变与光合色素合成、代谢相关,是目前发现的最多的一类^[25],是光合作用、光形态建成、激素生理作用、抗性机制等研究的理想材料^[3]。NJ9903-5 从苗期开始表现黄化,其光合色

素含量低于野生型,叶绿体 a 和胡萝卜素显著降低。对 NJ9903-5 两个杂交组合的 F₂ 群体分析,发现其后代变异较大,有望选出综合性状优良的黄绿叶个体,为培育高光效的作物品种提供种质资源。

绿色植物叶绿素合成是一个由许多酶参与的复杂过程。从谷氨酰 - tRNA (Glu-tRNA) 开始到叶绿素 b 的合成结束共包括 16 步,由 20 多个基因编码的 16 种酶完成^[26]。叶绿体合成或降解过程任何一个环节发生突变都可能影响叶绿素的合成,从而引起叶色变异。前人通过比较理化诱变剂诱发单位叶绿素合成缺陷突变体和幼苗生长突变体的频率,认为约有 700 个位点与叶绿素突变有关^[27]。相同的叶色突变性状可能是不同的基因突变引起的,

而同一个基因发生不同突变也可能导致不同的突变表型,如番茄叶色突变体 *au* 和 *yg-2*^[28]。大豆是二倍体化的古四倍体,叶绿素缺失突变表现出较复杂的遗传调控特点。T138 冷凉环境下表现的黄化性状受 2 对隐性重叠基因控制^[29]。大豆叶色突变体 T219H 和 CD-5 的表型相似,经典遗传分析表明是由 2 个不同的基因引起,基因克隆结果则表明其分别由位于 13 和 15 号染色体的 2 个同源基因控制^[21]。进一步研究发现大豆中 4 个和镁螯合酶 I 亚基有关的同源基因 *GmCHL1* (Glyma13g30560)、*GmCHL2* (Glyma15g08680)、*GmCHL3* (Glyma07g32550)、*GmCHL4* (Glyma13g24050) 中,任一基因的非同义突变均可导致叶绿素合成受阻,虽然他们在功能上冗余,但相互之间可能存在互作^[30]。

ycl 的预测目标基因 Glyma. 02G233700 编码位于叶绿体内膜的转运蛋白,已报道其与大豆叶色黄化有关^[10]。与 Williams 82 相比,在 T379 黄化突变体中 Glyma. 02G233700 基因第 334 ~ 337 位的 4 个碱基缺失,导致编码蛋白提前终止。本研究发现 NJ9903-5 中该基因在第 38 位缺失一个碱基,导致翻译蛋白提前终止。可见 NJ9903-5 黄绿叶基因 *ycl* 可能是与已报道 T379 目标位点的新等位基因。

4 结 论

NJ9903-5 表现黄绿叶特性,叶色变化与光合色素含量对应,对株高、产量有一定的负效应,但不影响百粒重及蛋白质、油脂含量。该性状受一对隐性核基因控制,定位于第 2 染色体短臂含 36 个注释基因、约为 366 kb 区段。序列分析发现突变体的叶绿体膜转运蛋白相关基因 Glyma. 02G233700 存在移码突变,导致蛋白翻译提前终止。

参考文献

[1] Mullet J E. Chloroplast development and gene expression[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1988, 39(1): 475-502.

[2] Awan M A, Konzak C F, Rutger J N, et al. Mutagenic effects of sodiumazide in rice[J]. Crop Science, 1980, 20(5): 663-668.

[3] 初志战, 刘小林, 陈远玲, 等. 一个水稻白化致死突变基因的精细定位和遗传研究[J]. 中国水稻科学, 2016, 30(2): 136-142. (Chu Z Z, Liu X L, Chen Z L, et al. Genetic analysis and gene mapping of an albino lethal mutant in rice[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2016, 30(2): 136-142.)

[4] 徐冬平, 汪瀚宇, 张采波, 等. 一个新的玉米黄化突变体的初步研究[J]. 核农学报, 2012, 26(7): 988-993. (Xu D P, Wang H Y, Zhang C B, et al. The preliminary study of a novel yellow-green leaf mutant in maize[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2012, 26(7): 988-993.)

[5] Zhao Y, Wang M L, Zhang Y Z, et al. A chlorophyll - reduced

seedling mutant in oilseed rape, *Brassica napus*, for utilization in F₁ hybrid production [J]. Plant Breeding, 2000, 119 (2): 131-135.

[6] Hörtensteiner S. Chlorophyll degradation during senescence[J]. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57: 55-77.

[7] Reinbothe C, El Bakkouri M, Buhr F, et al. Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(11): 614-624.

[8] Shoemaker R C, Cody A M, Palmer R G. Characterization of a cytoplasmically inherited yellow foliar mutant (cyt-Y3) in soybean [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1985, 69(3): 279-284.

[9] Palmer R G, Peeiffer T W, Buss G R, et al. Qualitative genetics in soybeans: Improvement, production, and uses [M]//Shible R M, Harper J E, Wilson R F, et al. Madison Wisconsin, USA, 2004:171-173.

[10] Sandhu D, Atkinson T, Noll A, et al. Soybean proteins GmTic110 and GmPsbP are crucial for chloroplast development and function [J]. Plant Science, 2016, 252: 76-87.

[11] Zhang H, Zhang D, Han S, et al. Identification and gene mapping of a soybean chlorophyll - deficient mutant [J]. Plant Breeding, 2011, 130(2): 133-138.

[12] Reed S, Atkinson T, Gorecki C, et al. Candidate gene identification for a lethal chlorophyll-deficient mutant in soybean[J]. Agronomy, 2014, 4(4): 462-469.

[13] 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(2): 144-148. (Ma G R, Liu Y B, Gai J Y. Discovery of cytoplasmically inherited virescent mutant of soybean[J]. Acta Agronomica Sinica, 1994, 20(2): 144-148.)

[14] 孙志强, 于海利. 一个新的大豆细胞质黄化突变体的初步研究. 大豆科学, 1992, 11(2): 120-126. (Sun Z Q, Yu H L. A preliminary study on a cytoplasmically inherited yellow foliar mutant in soybean[J]. Soybean Science, 1992, 11(2): 120-126.)

[15] 李国权, 李梦, 吴殿武. 辐射诱变大豆叶绿素缺失突变及其遗传分析[J]. 吉林农业大学学报, 1987, 9(3): 46-51. (Li G Q, Li M, Wu D W. The induced mutation of chlorophyll deletion of soybean through radiation and its genetic analysis[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 1987, 9(3): 46-51.)

[16] 余建章, 荐立, 朱国玉. 大豆胚胎致死黄化突变沈农 2015 (y21) 的遗传研究[J]. 遗传, 1986, 8(3): 13-16. (Yu J Z, Jian L, Zhu G Y. Gentic studies with Shennong 2015, a lethal yellow mutant (y21) in soybean[J]. Hereditas, 1986, 8(3): 13-16.)

[17] 苍晶, 于龙凤, 王豫颖, 等. 大豆叶绿素缺失突变体 HS 821 的农艺性状和生化特性 [J]. 核农学报, 2007, 21(1): 9-12. (Cang J, Yu L F, Wang Y Y, et al. Agronomic and biochemical characters of chlorophyll deficient mutant HS 821 of soybean[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2007, 21(1): 9-12.)

[18] 于佰双, 王培英. 大豆叶绿素缺失突变体的鉴定和利用 [J]. 核农学通报, 1990, 4(3): 121-122. (Yu B S, Wang P Y. Identification and utilization of soybean chlorophyll deficient mutants [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 1990, 4(3): 121-122.)

[19] 韩锁义, 杨玛丽, 陈远东, 等. 大豆“南农 94-16”突变体库的构建及部分性状分析 [J]. 核农学报, 2008, 22(2): 131-135. (Han S Y, Yang M L, Chen Y D, et al. Construction of mutant library for sorbean “Nannong 94-16” and analysis of some

charactes[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2008, 22 (2): 131-135.)

[20] Li Z, Jiang L, Ma Y, et al. Development and utilization of a new chemically - induced soybean library with a high mutation density [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2016, 59(1): 60-74.

[21] Campbell B W, Mani D, Curtin S J, et al. Identical substitutions in magnesium chelatase paralogs result in chlorophyll-deficient soybean mutants [J]. G3: Genes | Genomes | Genetics, 2015, 5 (1): 123-131.

[22] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids; Pigments of photosynthetic biomembranes [J]. Methods in Enzymology, 1987, 148: 350-382.

[23] 邱丽娟, 常汝镇, 刘章雄. 大豆种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京:中国农业出版社, 2006;32-48. (Qiu L J, Chan R Z, Liu Z X. Descriptors and data standard for soybean[M]. Beijing:China Agriculture Press, 2006;32-48.)

[24] Michelmore R W, Paran 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, 1991, 88(21): 9828-9832.

[25] 葛常伟, 胡江, 张晓勤, 等. 水稻叶色突变研究进展[J]. 杭州师范大学学报: 自然科学版, 2014, 13(3): 307-312. (Ge C W, Hu J, Zhang X Q, et al. Research advances in rice leaf color mutations[J]. Journal of Hangzhou Normal University : Natural Science Edition, 2014, 13(3): 307-312.)

[26] Beale S I. Green genes gleaned [J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(7): 309-312.

[27] 邢才, 王贵学, 黄俊丽, 等. 植物叶绿素突变体及其分子机理的研究进展[J]. 生物技术通报, 2008, 24(5): 10-12 (Xing C, Wang G X, Huang J L, et al. Research on chlorophyll mutation of plants and molecular mechanism [J]. Biotechnology Bulletin, 2008, 24(5): 10-12.)

[28] Terry M J, Kendrick R E. Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore- deficient aurea and yellow-green-2 mutants of tomato[J]. Plant Physiology, 1999, 119(1): 143-152.

[29] Kato K K, Palmer R G. Duplicate chlorophyll-deficient loci in soybean[J]. Genome, 2004, 47(1): 190-198.

[30] Li Q, Fang C, Duan Z, et al. Functional conservation and divergence of *GmCHL1* genes in polyploid soybean[J]. The Plant Journal, 2016, 88(4): 584-596.

欢迎订阅 2018 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办的大豆专业领域学术性期刊,也是被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

《大豆科学》为双月刊,16 开本,国内外公开发行,国内每期定价:20.00 元,全年 120.00 元,邮发代号:14-95。国外每期定价:20.00 美元(含邮资),全年 120.00 美元,国外代号:Q5587。全国各地邮局均可订阅,也可向编辑部直接订购。

热忱欢迎广大科研及有关企事业单位刊登广告,广告经营许可证号:2301030000004。

地址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号《大豆科学》编辑部(邮编:150086)

电话: 0451-86668735

网址: www.haasep.cn

E-mail: ddkxbjb@126.com