

## 水稻POR基因的分离、定位与功能的初步研究

高小丽<sup>1,2</sup>, 李素娟<sup>2</sup>, 邵健丰<sup>2</sup>, 刘洪家<sup>2\*</sup>, 陶跃之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>杭州师范大学生命与环境科学学院, 浙江杭州310036; <sup>2</sup>浙江省农业科学院作物与核技术利用研究所, 浙江杭州310021

**摘要:** 本研究发现水稻 $yg13$  (*yellow green leaf3*)突变体苗期的叶片呈黄绿色; 在营养生长后期,  $yg13$ 叶片从叶尖开始严重褪绿色, 形成黄斑或白斑。图位克隆结果表明,  $YGL3$ 编码一个定位于叶绿体的原叶绿素酸酯氧化还原酶B (OsPORB), 转基因互补实验证实了图位克隆的结果。水稻基因组中存在两个POR基因 $OsPORA$ 和 $OsPORB$ 。RT-PCR分析表明,  $OsPORA$ 主要在新生的茎、叶和穗中表达, 而 $OsPORB$ 为组成型表达。亚细胞定位分析发现 $OsPORA$ 和 $OsPORB$ 为叶绿体定位蛋白。此外, 用35S启动子驱动 $OsPORA$ 表达能够完全互补 $yg13$ 的表型。虽然利用RNAi技术抑制 $OsPORA$ 表达的转基因水稻叶片与野生型呈现一样的表型, 但在 $yg13$ 背景下, 抑制 $OsPORA$ 的表达导致转基因水稻黄化致死, 说明 $OsPORA$ 和 $OsPORB$ 为叶绿素合成所必需的。以上研究结果说明 $OsPORA$ 和 $OsPORB$ 在功能上具有一定的冗余性, 但 $OsPORB$ 比 $OsPORA$ 的作用更重要, 揭示了OsPOR在叶绿素合成途径上保守性。

**关键词:** 水稻; 叶绿素合成; OsPOR; 图位克隆; 叶绿体

## Preliminary Study on Isolation, Mapping, and Function of NADPH: Protochlorophyllide Oxidoreductase (POR) Gene in Rice (*Oryza sativa*)

GAO Xiao-Li<sup>1,2</sup>, LI Su-Juan<sup>2</sup>, SHAO Jian-Feng<sup>2</sup>, LIU Hong-Jia<sup>2\*</sup>, TAO Yue-Zhi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310036, China; <sup>2</sup>Institute of Crops and Utilization of Nuclear Technology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021, China

**Abstract:** In this study, a mutant was identified and named as  $yg13$  (*yellow green leaf3*) as the leaves of the mutant are yellowish green at seedling stage and turning to yellow/white from the leaf-tip area during the late vegetative stages. The gene  $YGL3$  encoding OsPORB, a chloroplast protein, was isolated through map-based cloning and used to complement the  $yg13$  mutation successfully. The expression pattern and the relationship between  $OsPORA$  and  $OsPORB$ , two PORs existed in rice, were then investigated. It was found from RT-PCR that expression of  $OsPORB$  was constitutive while the high level expression of  $OsPORA$  was occurred only in neonatal stems, leaves and spikes. The analysis of subcellular localization provided evidence that both OsPORA and OsPORB are chloroplast protein. The mutated phenotype of  $yg13$  could be complemented by  $OsPORA$  driven by the 35S promoter. The inhibition for the expression of  $OsPORA$  was then conducted through RNAi for both wild type and  $yg13$  plants, the same phenotypic characteristics was observed from the transgenic plants of wild type but not the ones of  $yg13$ , illustrating that OsPORA and OsPORB are essential for chlorophyll synthesis. These results indicated that the function of OsPORA and OsPORB are redundant, OsPORB is more important, and the OsPORs are conservative during chlorophyll synthesis.

**Key words:** rice (*Oryza sativa*); chlorophyll synthesis; OsPOR; map-based cloning; chloroplast

植物叶绿素合成受阻往往导致叶色变浅, 如白化、黄化、黄转绿、条纹和斑马等表型。叶色突变体的表型可以发生在苗期、营养生长期和成熟期等各个阶段, 是研究叶绿素合成和叶绿体发育的良好材料。目前, 水稻中已发现了大量的叶色突变体, 其中大部分基因被克隆, 它们参与叶绿体发生发育或叶绿素合成等过程。

叶绿素是植物进行光合作用所必需的色素。叶绿素生物合成途径有很多酶参与, 其中任何一

个酶功能缺失都会阻止叶绿素的正常合成, 产生叶色突变体(Li等2014)。 $CDE(t)$ 基因编码谷氨酰tRNA合成酶, 催化谷氨酸与其特定的tRNA结合。 $cde1(t)$ 突变体在允许的低温(23 °C以下)条件生长时叶片的叶绿素含量正常; 当生长在允许的高温

收稿 2015-03-06 修定 2015-05-14

资助 国家自然科学基金(31171530)。

\* 通讯作者(E-mail: lhjzju@aliyun.com; Tel: 15857135706)。

条件(26 °C以上)时, 叶片为黄绿色(Liu等2007)。镁离子螯合酶(magnesium chelatase)由ChLI、ChLD和ChLH三个亚基组成, 催化 $Mg^{2+}$ 插入原卟啉IX中, 形成 $Mg^{2+}$ -原卟啉IX (MgProto)的反应过程。*chl1* (ChLD)和*chl9* (ChLI)突变体都呈现浅黄绿色的叶片。*chl1*叶片浅黄绿色只出现在苗期, 而*chl9*则整个生育期叶片都是浅黄绿色(Zhang等2006), 此外, 缺失ChLH蛋白的水稻T-DNA插入突变体是致死的, 叶绿素含量只有野生型的1% (Jung等2003)。水稻*ylc1* (*young Leaf Chlorosis 1*)和*ylc2* (*young Leaf Chlorosis 2*)突变体苗期具有黄绿色的叶片, 生长后期叶绿素逐渐恢复, 但新生的叶片仍然为黄色(Zhou等2013; Li等2014)。*YLC1*编码一个具有DUF3353功能域的叶绿体蛋白(Zhou等2013), *YLC1*与拟南芥的CPP1 (CHAPERONE-LIKE PROTEIN OF POR1)高度同源, 而CPP1能够以分子伴侣的方式稳定POR蛋白(Lee等2013)。*YLC2*编码血红素加氧酶OsHO2 (Heme Oxygenase 2), OsHO2不具有血红素加氧酶的活性, 主要参与四吡咯生物合成的调控(Li等2014)。水稻*yg11* (*yellow green leaf1*)和*yg12* (*yellow green leaf2*)突变体的表型非常相似, 发育的早期(3~4叶期)具有黄绿叶的表型, 从分蘖期到抽穗期黄绿叶逐渐转为接近正常的绿色(Wu等2007; Chen等2013)。*YGL1*编码叶绿素合成酶, 催化叶绿素合成的最后一步反应, 即叶绿素酸酯经过酯化反应转变为叶绿素(Wu等2007)。而*YGL2*编码HO1 (Heme Oxygenase 1), 催化血红素合成光敏色素前体胆绿素(biliverdin)。此外, 由于光敏色素的合成受阻, *yg12*突变体还具有提早开花的表型(Chen等2013)。

叶绿素合成途径中唯一需要光的反应是NADPH-原叶绿素酸酯氧化还原酶POR (NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase), 催化原叶绿素酸酯(protochlorophyllide)转变成叶绿素酸酯(chlorophyllide)的过程(Griffiths 1978)。目前已经在很多物种中发现POR基因, 如烟草、大麦和拟南芥等(Masuda等2002; Zavaleta-Mancera等1999; Holtorf等1995; Armstrong等1995; Benli等1991; Oosawa等2000)。大麦*nyb* (*nanchong yellow barley*)是一个叶绿素缺失突变体, *nyb*突变体中成熟的POR蛋白大大减少, 但是*nyb*的突变基因还不清楚(Yuan等

2010)。拟南芥*porb*和*porc*突变体的表型正常, 但是它们的双突变体具有苗期黄化致死的表型(Masuda等2003)。水稻中有OsPORA和OsPORB两个同工酶, *fgl* (*faded green leaf*)突变体在营养生长的早期叶片为浅绿色, 生长后期叶片从叶尖开始出现严重的褪色, 形成黄斑或白斑, 图位克隆的结果发现*FGL*编码OsPORB (Sakuraba等2013)。虽然对OsPORA的组织表达已进行了详尽的研究(Sakuraba等2013), 但是OsPORA的功能, 以及OsPORA和OsPORB的关系还不清楚。本研究运用遗传学和分子生物学等手段解析了水稻POR基因在叶绿素合成中的功能。

## 材料与方法

### 1 植株材料

*yg13*水稻突变体筛选自 $^{60}Co\gamma$ 对‘日本晴’ (*Oryza sativa* L. subsp. *Japonica* cv. Nipponbare)种子进行辐射诱变的突变体库。水稻种子经催芽后, 播种到装有水稻培养液的黑体的网纱上, 将黑体放置于光照培养箱(QHX-350BS-III)中, 温度设置为24 °C, 24 h持续光照, 光照强度为250  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

### 2 方法

#### 2.1 光合色素含量测定的方法

分别取光照培养箱生长10 d的野生型和*yg13*突变体的植株, 水田生长至抽穗期(主穗)和成熟期(生长90 d)的自上而下的第一叶(剑叶)和第二叶, 光照培养箱生长10 d的OsPORA和OsPORB转基因互补植株, 进行叶绿素含量测定。方法采用张其德法(Lichtenthaler和Wellbum 1983; Liu等2010), 分光光度计型号为岛津UV-1800。

#### 2.2 图位克隆

以*yg13*突变体为母本与籼稻‘Kasalath’ (*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. Kasalath)杂交,  $F_1$ 自交收获 $F_2$ 定位群体, 进行表型鉴定、遗传学分析和基因定位。选取 $F_2$ 定位群体中的20个突变型单株进行初定位, 精细定位选用1 627个 $F_2$ 突变型单株, 根据日本晴与kasalath的BAC末端序列信息, 利用Primer Premier 6.0设计STS (sequence tagged sites)标记(表3)。

#### 2.3 互补突变体植株方法

OsPORA、OsPORB互补载体构建方法如下: 以水稻叶片cDNA为模板, 利用Kod plus (上海力耕

实业有限公司)扩增*OsPORA*、*OsPORB*的cDNA全长,上下游引物分别添加(*KpnI XbaI*; *BamHI XbaI*)限制性酶切位点。PCR产物回收连接到pJet载体,测序。用相应的限制性酶将pJET1.2/blunt上的目的序列切出,连接到以相同方式酶切的pCAMBIA1301-35S-NOS的载体中。pCAMBIA1301在*EcoRI*和*SacI*之间加入了CaMV 35S启动子,在*PstI*和*HindIII*之间加入了NOS-3终止子,改造为pCAMBIA1301-35S-NOS。构建好的载体,转入农杆菌EHA105中,然后用农杆菌介导的方法转染*yg13*突变体愈伤组织,得到转基因植株。

#### 2.4 *OsPORA*和*OsPORB*蛋白的亚细胞定位

我们将*OsPORA*、*OsPORB*的cDNA分别融合EYFP (enhanced yellow fluorescent protein)连接到pCAMBIA1301-35S-NOS载体上,瞬时转染水稻原生质体。水稻原生质体的制备方法:取7~10 d的水稻苗的茎、鞘组织,在0.6 mol·L<sup>-1</sup>甘露醇溶液中横切成0.5 mm小段,用MES (10 mmol·L<sup>-1</sup> MES, pH 5.7, 10 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA)酶液酶解4~5 h后,加入等体积的W5溶液(154 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 125 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 5 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 2 mmol·L<sup>-1</sup> MES, pH 5.7)过滤,离心,收集沉淀,加入MMG溶液(0.4 mol·L<sup>-1</sup>甘露醇, 15 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 4 mmol·L<sup>-1</sup> MES, pH 5.7)浓缩得到原生质体。取100 μL原生质体加入5~10 μg质粒进行转化,室温暗培养,过夜,用激光扫描共聚焦显微镜拍照,详见Zhang等(2011)方法。

#### 2.5 *OsPORA*的RNA干涉植株创建

*OsPORA*干涉表达载体构建方法如下:利用Kod plus扩增*OsPORA* 219 bp的cDNA片段,PCR产

物回收连接到pJET1.2/blunt载体,测序。219 bp的cDNA片段正向和反向连接到玉米的*NIR1*基因的第2个内含子的两端,整个表达盒再克隆到pCAMBIA1301-35S-NOS中。构建好的载体,转入农杆菌EHA105中,然后用农杆菌介导的方法分别转染‘日本晴’和*yg13*突变体的愈伤组织,得到转基因植株。

#### 2.6 RT-PCR分析方法

为了研究*OsPORA*和*OsPORB*的表达水平,对相关的植株进行RT-PCR分析。总RNA采用Trizol (Invitrogen, USA)提取。反转录反应体系为25 μL,经过DNAase I处理的3 μg总RNA,以OligdT18为引物,利用M-MLV反转录酶(Promega, USA),合成cDNA。PCR反应体系为20 μL,取1 μL cDNA为模板。*OsPORA*和*OsPORB*采用Kod plus DNA聚合酶,反应条件为95 °C 预热2 min, 27个循环(98 °C 10 s, 60 °C 30 s, 68 °C 1 min 30 s), 68 °C 延伸10 min, 取10 μL PCR产物,在1%的琼脂糖胶上电泳检测。*OsActin*采用2×Specific Tag Master Mix (近岸蛋白科技有限公司),反应条件为94 °C 预热5 min, 27个循环(95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 延伸7 min, 取10 μL PCR产物,在1%的琼脂糖胶上电泳检测。

#### 2.7 引物

*yg13*突变体突变基因定位所用引物在表1中列出。*OsPORA*、*OsPORB*互补*yg13*突变体, *OsPORA*、*OsPORB*蛋白的亚细胞定位, *OsPORA*抑制表达植株的创建, RT-PCR所用引物在表1中列出。

### 实验结果

#### 1 *yg13*突变体的表型分析

我们从<sup>60</sup>Coγ射线诱变的水稻(‘日本晴’)突变

表1 RT-PCR所用引物

Table 1 Primers of RT-PCR

引物	前引物序列(5'→3')	后引物序列(5'→3')
<i>OsPORA</i> 互补	GGTACCACACTCACACCAATGGCTCT	TCTAGAGACAGGCCTCTCTCACTGAA
<i>OsPORB</i> 互补	GGATCCCCTTCGCTGCAGAGGAAAA	TCTAGACCATCCCATGATCCACCAGT
<i>OsPORA</i> 蛋白定位	GAGCTCATGGCTCTCCAAGTTCAGGC	GGTACCGACGAGGCCGACGAGCTTCT
<i>OsPORB</i> 蛋白定位	GGATCCATGGCTCTCCAGGCGGCCA	GGATCCCCTGATCGTGATCGGCCAAG
<i>OsPORA</i> RNAi正向	GGATCCACACTCACACCAATGGCTCT	CTGCAGCTTCTCCCGTCCGCCCTT
<i>OsPORA</i> RNAi反向	CTCGAGACACTCACACCAATGGCTCT	CTCGAGACACTCACACCAATGGCTCT
RT-PCR <i>OsPORA</i>	ACACTCACACCAATGGCTCT	GACAGGCCTCTCTCACTGAA
RT-PCR <i>OsPORB</i>	CACTTCGCTGCAGAGGAAAA	CCATCCCATGATCCACCAGT
RT-PCR <i>OsActin</i>	GCATCTCTCAGCACATTCCA	CTGGTACCCTCATCAGGCAT



体库中筛选到1个黄绿叶突变体, 命名为*yg13* (*yellow green leaf3*)。 *yg13* 苗期叶片为黄绿色(图1-A), 营养生长后期叶片从叶尖开始逐渐褪色, 形成黄斑或白斑, 并且叶片的褪色程度与其衰老程度相关(图1-B)。对光照培养箱中生长10 d的野生型和*yg13*突变体叶片的光合色素含量测定(表2)发现, *yg13*突变体的总光合色素含量为野生型的62.5%,

叶绿素a含量下降34.6%, 叶绿素b含量下降56.6%, 类胡萝卜素含量下降15.8%。抽穗期*yg13*突变体的色素含量与野生型没有明显差异。而到成熟期, *yg13*突变体第一叶的总色素含量只有野生型的57.4%, 第二叶的总色素含量也只有野生型的51.8% (表2)。苗期、抽穗期和成熟期的叶绿素a/b值都增加。

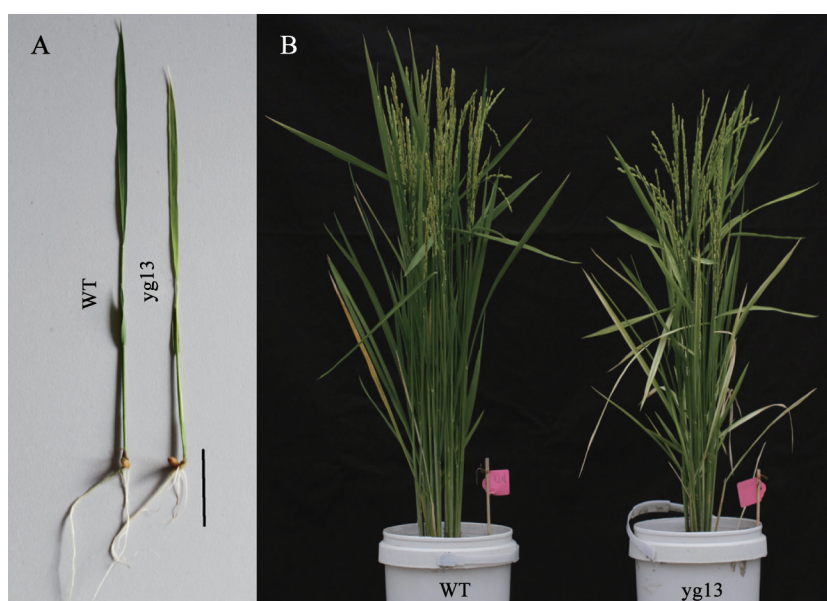


图1 不同生长时期*yg13*突变体的表型

Fig.1 Phenotypic characterization of *yg13* mutant in different growth stages

A: 光照培养箱生长10 d; B: 田中生长90 d。

表2 不同生长时期*yg13*突变体的光合色素含量

Table 2 Photosynthetic pigment contents of *yg13* mutant in different growth stages

生长时期	植株	叶绿素a含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	叶绿素b含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	类胡萝卜素含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	总色素含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	叶绿素a/b
苗期	WT	975.47±108.13	350.86±47.09	196.13±24.77	1522.47±107.53	3.05±0.027
	<i>yg13</i>	638.37±44.32	152.37±9.77	160.19±13.13	950.94±66.72	4.18±0.056
抽穗期	WT第一叶	2474.48±89.33	765.78±28.88	482.15±19.38	3722.43±136.63	3.23±0.015
	<i>yg13</i> 第一叶	2342.13±67.99	609.82±24.84	517.94±12.27	3469.89±103.48	3.85±0.039
	WT第二叶	2317.73±156.37	711.65±49.29	456.11±32.13	3485.49±237.69	3.26±0.012
	<i>yg13</i> 第二叶	2315.93±52.21	606.58±14.97	485.26±10.55	3407.78±75.83	3.82±0.056
成熟期	WT第一叶	2174.15±149.20	705.40±51.11	412.98±25.61	3292.54±225.09	3.09±0.011
	<i>yg13</i> 第一叶	1275.43±72.40	329.09±21.87	286.86±9.20	1891.39±102.81	3.89±0.087
	WT第二叶	1991.38±83.25	653.43±26.04	416.45±18.82	3061.26±127.97	3.05±0.022
	<i>yg13</i> 第二叶	1077.53±134.25	275.21±30.47	234.17±32.29	1586.91±196.50	3.88±0.067

苗期: 光照培养箱生长10 d; 抽穗期: 主穗完全抽出; 成熟期: 田间生长90 d。

## 2 *YGL3*基因的图位克隆

遗传分析表明*yg13*突变表型为单隐性核基因

控制。初定位选取*yg13*突变体与籼稻‘Kasalath’构建的F<sub>2</sub>定位群体中的22个突变型个体, 利用近似均

均匀分布于12条染色体上的120个SSR标记进行连锁分析,将*YGL3*基因定位到标记STS1和STS2之间。精细定位利用新发展的8个STS标记(表3),对 $F_2$ 定位群体中的1 647个突变型个体进行连锁分析,成功的将目标基因定位到105.5 kb的区间。对该区间的候选基因进行测序分析,发现*OsPORB*基因的第4个外显子发生了单碱基的缺失突变(图2)。构建了以35S为启动子的和*OsPORB*互补载体,转化*yg13*突变体,能够完全互补*yg13*的突变表型(图3-A),对转基因互补植株的光合色素含量进行测定,发现叶绿素恢复到正常水平(图3-B)。这些结果说明*yg13*的突变表型是由*OsPORB*发生单碱基的缺失突变造成的。此外,我们用35S启动子驱动*OsPORB*的同源基因*OsPORA*表达,能够全面互补*yg13*的表型(图3)。

### 3 *OsPOR*组织表达模式分析

水稻中有2个POR基因*OsPORA*和*OsPORB*。为了

确定*OsPOR*的组织表达模式,分别取生长10 d的野生型的根、茎和叶;抽穗期的穗、倒数1~5叶提取RNA,进行半定量RT-PCR分析。*OsPORA*在根中微弱表达,茎和叶中高表达;抽穗期时的穗中高表达,而在第一叶表达最强,其它叶片中表达逐渐下降,说明*OsPORA*在新生的组织中表达最强,在衰老的组织表达逐渐下降(图4)。*OsPORB*在所有检测的组织中除根外都表现为组成型的高表达(图4)。为了检测*OsPORB*突变是否影响其在突变体中的表达,对生长2周的野生型和*yg13*突变体的根、茎、叶中这两个基因进行RT-PCR分析,发现*OsPORB*的缺失突变并不改变*OsPORB*在突变体中的表达,对*OsPORA*的表达也没有影响(图5)。

### 4 *OsPOR*为叶绿体定位蛋白

为了确定*OsPOR*是否定位到叶绿体,分别构建了以35S为启动子的*OsPORA*和*OsPORB*与EYFP

表3 本研究开发的部分多态性STS标记

Table 3 Part of polymorphic STS markers developed in this study

标记名称	前引物序列(5'→3')	后引物序列(5'→3')	所在BAC
STS1	GTACCCAGCGAGCACTGAAT	GGGACGGAGGTAGTATCTTGC	AC068950
STS2	CCACCGAGGTAGTACATGAATTC	CTTCTTTCATCGTTACCTGGCT	AC079888
STS3	CTGAATGCAGCAAGCACAAG	GACCACCAATTCACATTGA	AC068950
STS4	TCAACTTAGGAGGGGATAACCA	GGTTTTGGGCATCACGTATC	AC068950
STS5	AGTGTTACAATGGGTGTGTTC	GTTAGCGGGTGGTCAACAGT	AC092489
STS6	GGTCATTGGATGGACCAACT	CTCCGAATCCATCCGAAATA	AC068923
STS7	GTGTCAAACCCACCGTTT	GCAGCTGACATTTGTGACCA	AC068923
STS8	AACTGGTGCTTGCCGTGTTT	AGAAACCCGTCATCTACCCA	AC079888

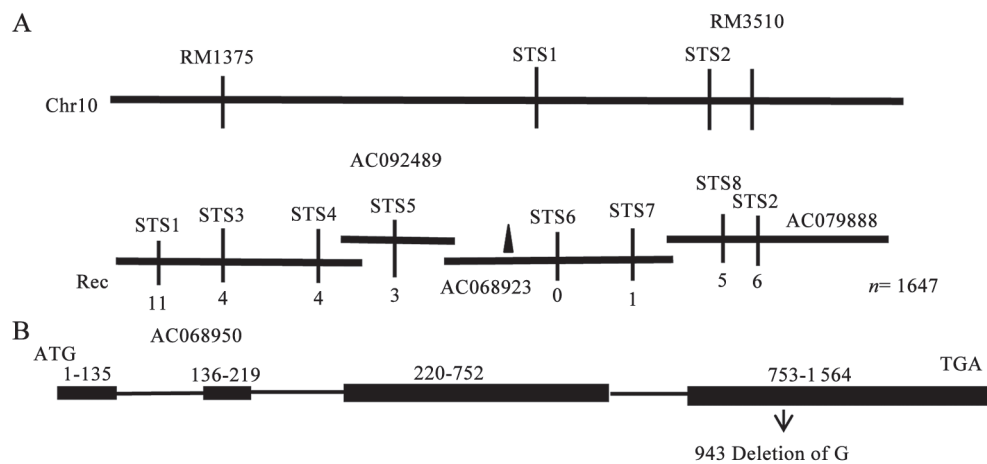


图2 *YGL3*基因的精确定位和*OsPORB*基因结构示意图

Fig.2 The fine mapping of the *YGL3* locus and the structure diagram of *OsPORB*

A: *YGL3*基因的精确定位; B: *OsPORB*基因结构示意图。n为 $F_2$ 群体中突变型单株的数目;▲代表*OsPORB*基因。

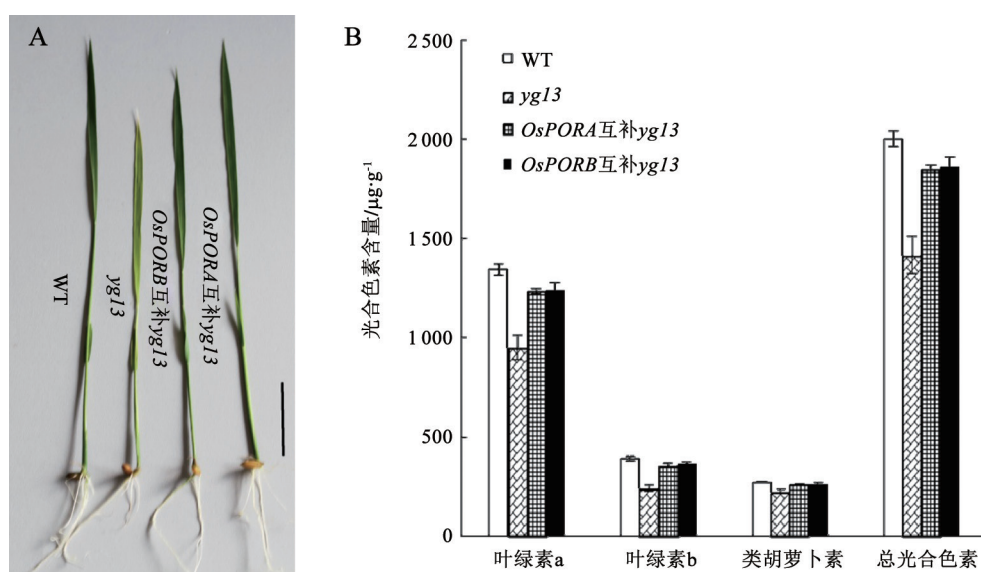
图3 *OsPORA*和*OsPORB*互补*yg13*突变体的表型和光合色素含量

Fig.3 Phenotypic characterization and photosynthetic pigment contents of *yg13* mutant that *OsPORA* and *OsPORB* complements

A: 互补植株的表型; B: 互补植株的光合色素含量测定。

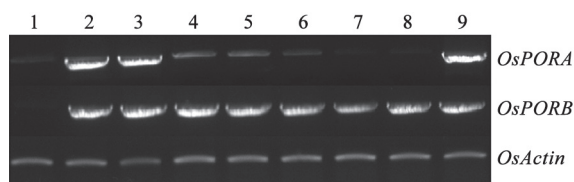
图4 *OsPORA*和*OsPORB*在各组织中的表达

Fig.4 Expression of *OsPORA* and *OsPORB* in each organs

1~3分别为生长10 d野生型的根、茎、叶; 4~6依次为抽穗期野生型的倒数1~5叶和穗。

(enhanced yellow fluorescent protein)融合的表达载体, 瞬时转化水稻原生质体, 发现*OsPORA*和*OsPORB*特异的定位到叶绿体(图6), 是叶绿体定位蛋白。

### 5 *OsPORA*的功能分析

*OsPORA*和*OsPORB*是两个同工型的POR蛋

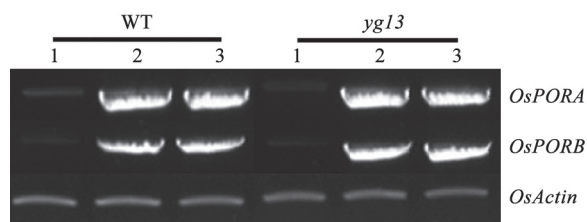
图5 野生型与*yg13*突变体中*OsPORA*、*OsPORB*的表达

Fig.5 Expression of *OsPORA* and *OsPORB*

in wild type and *yg13* mutant  
1~3分别为生长2周的根、茎、叶。

白, 为了阐明*OsPORA*的功能, 构建了*OsPORA*的RNA干涉表达载体, 分别转化‘日本晴’和*yg13*突变体。转化水稻‘日本晴’共获得了20株独立的阳性转基因苗, 这些转基因苗的表型和‘日本晴’完全相同, 叶片也为正常的绿色(图7)。RT-PCR分析发现*OsPORA*的表达被明显抑制(图8), 说明抑制*OsPORA*的表达不影响水稻叶绿素的正常合成。对转化*yg13*突变体的转基因苗进行鉴定, 发现阳性转基因苗为黄化苗, 并且不能存活(图9和10), 说明*OsPORA*和*OsPORB*功能缺失, 叶绿素合成完全受阻。

### 讨论

我们筛选到一个<sup>60</sup>Coγ射线诱变的叶色突变体*yg13*。图位克隆结果证明*OsPORB*是突变基因。这些结果说明*yg13*与*fgl*是等位的(Sakuraba等2013), 但突变位点不同。此外, 我们对*OsPORA*和*OsPORB*的组织表达模式、亚细胞定位和功能进行了研究。

*OsPORA*和*OsPORB*是水稻中的两个同工型蛋白, 但是它们的表达模式完全不同。我们的实验结果发现*OsPORA*主要在幼苗和新生的叶表达, 而*OsPORB*在各个组织中为组成型表达(图5), 这与Sakuraba等(2013)的报道是一致的。*OsPORA*和*OsPORB*表达模式与大麦的*HvPORA*和*HvPORB*的

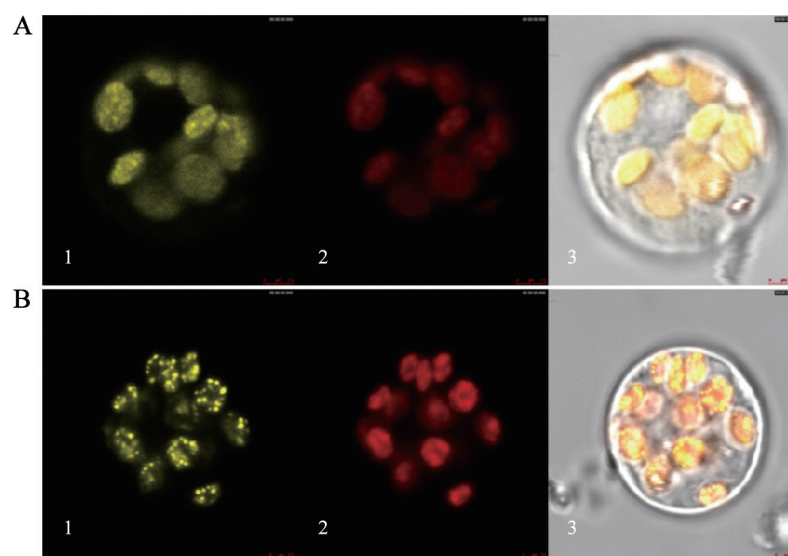


图6 OsPORA、OsPORB在水稻原生质体中的亚细胞定位

Fig.6 Subcellular localization of OsPORA and OsPORB in rice protoplast

A: OsPORA-EYFP; B: OsPORB-EYFP. 1: 黄色荧光信号, 2: 叶绿体自发红色荧光信号, 3: 图1和2的重叠。

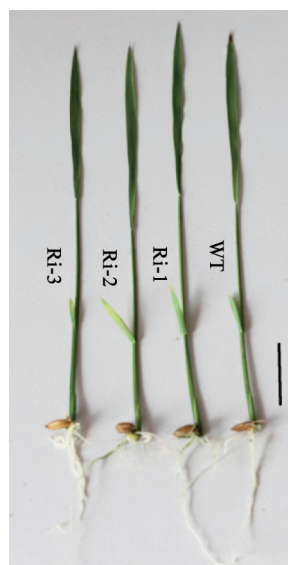


图7 野生型中*OsPORA*干涉植株的表型

Fig.7 Phenotypic characterization of suppressive wild type with *OsPORA*

表达模式相似, *HvPORA*在黄化苗大量表达, 见光后迅速降低; 而*HvPORB*在整个叶片发育过程中组成型表达(Holtorf等1995)。拟南芥中有3个POR蛋白, 从表达模式上看, *AtPORA*在幼苗发的育早期表达, *AtPORC*在幼苗发的育后期表达, *AtPORB*为组成型表达(Masuda等2003; Sakuraba等2013)。与

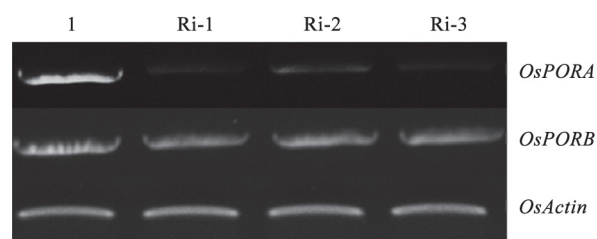


图8 野生型中*OsPORA*干涉植株的*OsPORA*和*OsPORB*的表达

Fig.8 Expression of *OsPORA* and *OsPORB* in the suppressive wild type with *OsPORA*

1为生长2周的野生型; Ri-1、Ri-2和Ri-3分别为生长2周的*OsPORA*干涉植株。

水稻不同的是组成型表达的*AtPORB*为高光抑制, 而*AtPORC*是高光诱导的(Masuda等2003; Sakuraba等2013)。说明单子叶和双子叶中POR蛋白的数量和功能分工还是不同的。此外, 我们还对生长10d的幼苗的根和抽穗期的穗中的*OsPOR*的表达进行了分析, 发现*OsPOR*在根中只有微弱表达, 而在发育的穗中*OsPOR*强烈表达, 表明*OsPOR*主要在地上组织表达。

POR蛋白是叶绿素合成的最关键的酶之一, 叶绿素合成发生在叶绿体中, 而POR是由核基因编码的, 在细胞质的核糖体上合成, 经过加工成熟后运输到质体, 聚集到白化体(etiooplasts)的内膜(Ry-



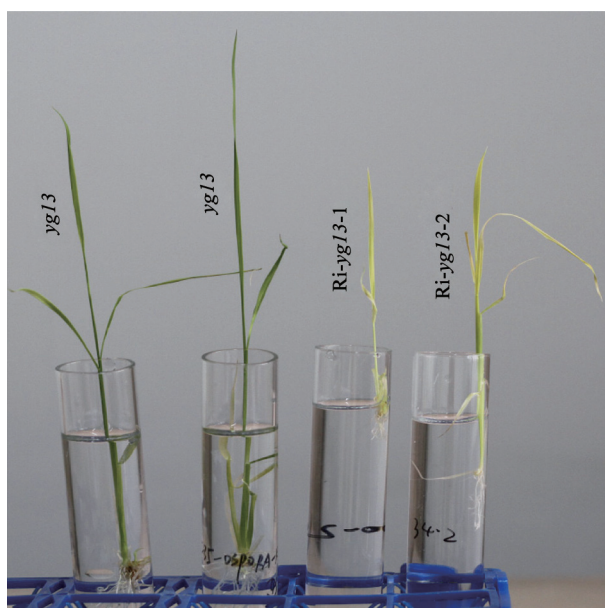


图9 *yg13*突变体中*OsPORA*干涉植株的表型  
Fig.9 Phenotypic characterization of *yg13* mutant that *OsPORA* is suppressed

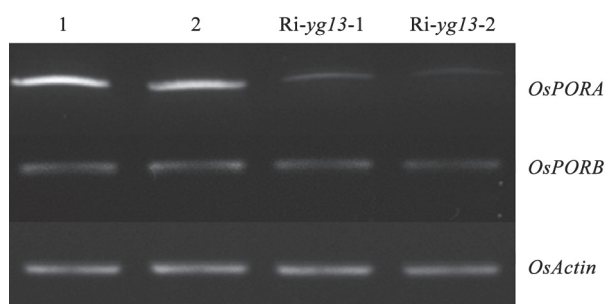


图10 *yg13*突变体中*OsPORA*干涉植株的*OsPORA*、*OsPORB*的表达

Fig.10 Expression of *OsPORA* and *OsPORB* in the *yg13* mutant that *OsPORA* is suppressed

1、2为*yg13*突变体; Ri-*yg13*-1和Ri-*yg13*-2为*OsPORA*干涉植株。

berg和Sundqvist 1988)和叶绿体上(Teakle和Griffiths 1993; Dahlin等1995)。OsPORA和OsPORB分别与EYFP的融合蛋白特异的定位到叶绿体,证明OsPOR是叶绿体定位蛋白。更加精细的亚细胞定位分析,有助于阐明OsPOR的功能。

水稻中有OsPORA和OsPORB两个同工型的蛋白,目前已经发现2个OsPORB的突变体(*fgl*和*yg13*),35S为启动子的*OsPORA*能够完全互补*yg13*的突变表型,证明了它们的功能是相同的,这与组成型表达的*AtPORA*能够完全互补*atporbatproc*双突

变体的突变表型相似(Paddock等2010)。RNAi方法抑制*OsPORA*的表达并不影响水稻叶绿素的正常合成,说明*OsPORB*可以互补*OsPORA*的缺失,这可能也是尚未发现*OsPORA*突变体的原因之一。

在*yg13*背景下抑制*OsPORA*的表达,能够完全阻断叶绿素的合成。拟南芥单个*AtPORB*或*AtPORC*突变没有异常表型,但它们的双突变体具有苗期黄化致死的表型(Masuda等2003)。说明水稻中OsPORA和OsPORB与拟南芥中AtPORB和AtPORC是各自叶绿素合成所必需的。

### 参考文献

- Armstrong GA, Runge S, Frick G, Sperling U, Apel K (1995). Identification of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductases A and B: a branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 108: 1505~1517
- Benli M, Schulz R, Apel K (1991). Effect of light on the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 16: 615~625
- Chen H, Cheng Z, Ma X, Wu H, Liu Y, Zhou K, Chen Y, Ma W, Bi J, Zhang X et al (2013). A knockdown mutation of YELLOW-GREENLEAF2 blocks chlorophyll biosynthesis in rice. *Plant Cell Rep*, 32: 1855~1867
- Dahlin C, Sundqvist C, Timko MP (1995). The *in vitro* assembly of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase in pea chloroplasts. *Plant Mol Biol*, 29: 317~330
- Frick G, Su Q, Apel K, Armstrong GA (2003). An Arabidopsis *porB porC* double mutant lacking light-dependent NADPH: protochlorophyllide oxidoreductases Band C is highly chlorophyll-deficient and developmentally arrested. *Plant J*, 35: 141~153
- Griffiths WT (1978). Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes. *Biochem J*, 174: 681~692
- Holtorf H, Reinbothe S, Reinbothe C, Berezina B, Apel K (1995). Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 3254~3258
- Jung KH, Hur J, Ryu CH, Choi Y, Chung YY, Miyao A, Hirochika H, An G (2003). Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the T-DNA gene-trap system. *Plant Cell Physiol*, 44: 463~472
- Lee JY, Lee HS, Song JY, Jung YJ, Reinbothe S, Park YI, Lee SY, Pai HS (2013). Cell growth defect factor1/CHAPERONE-LIKE-PROTEIN OF POR1 plays a role in stabilization of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25: 3944~3960
- Li Q, Zhu FY, Gao X, Sun Y, Li S, Tao Y, Lo C, Liu H (2014). Young Leaf Chlorosis 2 encodes the stroma-localized heme oxygenase 2 which is required for normal tetrapyrrole biosynthesis in rice. *Planta*, 240: 701~712
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983). Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc T*, 603: 591~592



- Liu HJ, Lau E, Lam MP, Chu H, Li SJ, Huang G, Guo P, Wang JQ, Jiang LW, Chu IK et al (2010). OsNOA1/RIF1 is a functional homolog of AtNOA1/RIF1: implication for a highly conserved plant GTPase essential for chloroplast function. *New Phytol*, 187: 83~105
- Liu W, Fu Y, Hu G, Si H, Zhu L, Wu C, Sun Z (2007). Identification and fine mapping of a thermos-sensitive chlorophyll deficient mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 226: 785~795
- Masuda T, Fusada N, Shiraiishi T, Kuroda H, Awai K, Shimada H, Ohta H, Takamiya K (2002). Identification of two differentially regulated isoforms of protochlorophyllide oxidoreductase (POR) from tobacco revealed a wide variety of light- and development-dependent regulations of POR gene expression among angiosperms. *Photosynth Res*, 74: 165~172
- Masuda T, Fusada N, Oosawa N, Takamatsu K, Yamamoto YY, Ohta M, Nakamura K, Goto K, Shibata D, Shirano Y et al (2003). Functional analysis of isoforms of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR), PORB and PORC, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 44: 963~974
- Oosawa N, Masuda T, Awai K, Fusada N, Shimada H, Ohta H, Takamiya K (2000). Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 474: 133~136
- Paddock TN, Mason ME, Lima DF, Armstrong GA (2010). *Arabidopsis* protochlorophyllide oxidoreductase A (PORA) restores bulk chlorophyll synthesis and normal development to a porBporC double mutant. *Plant Mol Biol*, 72: 445~457
- Ryberg M, Sundqvist C (1988). The regular ultrastructure of isolated prolamellar bodies depends on the presence of membrane-bound NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase. *Physiol Plant*, 73: 218~226
- Sakuraba Y, Rahman ML, Cho SH, Kim YS, Koh HJ, Yoo SC, Paek NC (2013). The rice faded green leaf locus encodes protochlorophyllide oxidoreductase B and is essential for chlorophyll synthesis under high light conditions. *Plant J*, 74: 122~133
- Teakle GR, Griffiths WT (1993). Cloning, characterization and import studies on protochlorophyllide reductase from wheat (*Triticum aestivum*). *Biochem J*, 296: 225~230
- Wu Z, Zhang X, He B, Diao L, Sheng S, Wang J, Guo X, Su N, Wang L, Jiang L et al (2007). A chlorophyll-deficient ricemutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiol*, 145: 29~40
- Yuan M, Yuan S, Zhang ZW, Xu F, Chen YE, Du JB, Lin HH (2010). Putative mutation mechanism and light responses of a protochlorophyllide oxidoreductase-less barley mutant NYB. *Plant Cell Physiol*, 51: 1361~1371
- Zavaleta-Mancera HA, Franklin KA, Ougham HJ, Thomas H, Scott IM (1999). Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. I. Reappearance of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase and light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *J Exp Bot*, 50: 1677~1682
- Zhang H, Li J, Yoo JH, Yoo SC, Cho SH, Koh HJ, Seo HS, Paek NC (2006). Rice Chlorina-1 and Chlorina-9 encode ChlD and ChlI subunits of Mg-chelatase, a key enzyme for chlorophyll synthesis and chloroplast development. *Plant Mol Biol*, 62: 325~337
- Zhang Y, Su J, Duan S, Ao Y, Dai J, Liu J, Wang P, Li Y, Liu B, Feng D et al (2011). A highly efficient rice greent is suepro to plast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. *Plant Methods*, 7 (1): 30~44
- Zhou K, Ren Y, Lv J, Wang Y, Liu F, Zhou F, Zhao S, Chen S, Peng C, Zhang X et al (2013). Young Leaf Chlorosis 1, a chloroplast-localized gene required for chlorophyll and lutein accumulation during early leaf development in rice. *Planta*, 237: 279~292