

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00223

一个新的水稻叶绿素缺失黄叶突变体的特征及基因分子定位

刘朝辉¹, 李小艳¹, 张建辉¹, 林冬枝^{1,2}, 董彦君^{1,2}

1. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234;
2. 上海师范大学遗传研究所, 上海 200234

摘要: 从粳稻“嘉花 1 号”⁶⁰Co γ 射线辐照的后代中筛选到一个叶绿素缺失黄叶突变体(y111), 与野生型“嘉花 1 号”相比该突变体表现为全生育期植株叶片呈黄色, 叶绿素含量以及净光合速率明显下降, 叶绿体发育不完善, 并且伴随着株高等主要农艺性状的变化。遗传分析表明, 该突变性状受一对隐性核基因(y111)控制。该突变体与籼稻“培矮 64S”杂交生产的F₂、F₃群体中的分离出突变体型 920 个单株作为定位群体, 利用 SSR 和 InDel 分子标记将 y111 基因定位在水稻第 11 染色体长臂上的 MM2199 和 ID21039 分子标记之间, 其物理距离约为 110 kb, 目前该区域内没有发现与水稻叶绿素合成/叶绿体发育相关已知功能基因。研究结果为今后对该基因的克隆和功能分析奠定了基础。

关键词: 水稻; 叶绿素缺失; 黄叶突变体; 基因定位

Characteristics and molecular mapping of a novel chlorophyll-deficient yellow-leaf mutant in rice

LIU Chao-Hui¹, LI Xiao-Yan¹, ZHANG Jian-Hui¹, LIN Dong-Zhi^{1,2}, DONG Yan-Jun^{1,2}

1. College of Life and Environment Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China;
2. Institute of Genetics, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

Abstract: A yellow-leaf mutant (y111) with chlorophyll-deficient in rice (*Oryza sativa* L.) was selected from the progeny of a japonica rice variety “Jiahua 1” treated with ⁶⁰Co γ -radiation. In comparison with the wild-type parent, “Jiahua 1”, the mutant had yellow-leaves at whole growth stages and displayed significantly decreased in chlorophyll content and net photosynthetic rate. Underdeveloped chloroplast and alterations of the major agronomic traits, such as plant-heights, were also observed in the mutant. Genetic analysis confirmed that the yellow-leaf mutant trait was controlled by a single recessive nuclear gene (y111). Using SSR and In/Del molecular markers and 920 F₂ and F₃ plants from the cross of y111 with the indica variety Peiai 64S, the y111 was mapped between the molecular markers MM2199 and InDel21039 with a physical dis-

收稿日期: 2011-10-09; 修回日期: 2011-11-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30970246, 30971552), 上海市科委项目(编号: 09DJ1400505, 0939191200, 10DZ2271800)和上海市教委项目(编号: J50401)资助

作者简介: 刘朝辉, 硕士研究生, 专业方向: 植物分子遗传学。Tel: 021-64321631; E-mail: zhaohui2009v@163.com

通讯作者: 林冬枝, 博士, 副教授, 研究方向: 分子生物学。E-mail: dzlin@shnu.edu.cn

网络出版时间: 2011-12-8 8:11:55

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20111208.0811.003.html>

tance of 110 kb on the long arm of chromosome 11, in which no known functional genes for chlorophyll synthesis or chloroplast development in rice has been found. These findings will provide a foundation for the cloning and functional analysis of this gene in the future.

Keywords: *Oryza sativa* L.; chlorophyll-deficient; yellow-leaf mutant; gene mapping

水稻(*Oryza sativa* L.)作为一种世界性的重要粮食作物以及禾本科模式植物受到了前所未有的关注。随着水稻全基因组测序工作的完成,为水稻基因克隆及其功能研究奠定了基础^[1,2]。利用水稻突变体进行基因克隆及其功能分析,是非常有效的方法之一^[3,4]。

植物叶绿素缺失突变是理化诱变、辐射诱发与组织培养过程中存在的一种普遍现象,它最明显的特点是叶色发生了变异。叶色突变往往直接或间接影响叶绿素的合成和降解途径,因此叶色突变体又被称为叶绿素缺失突变体。在高等植物中,已对许多叶色突变体进行了研究,例如拟南芥^[5]、番茄^[6]、水稻^[7]、玉米^[8]、大麦^[9]等。叶绿素缺失突变体不但可以作为标记性状在杂种优势利用中加以应用,而且在植物光合作用、叶绿素生物合成途径、遗传转化、基因表达调控等基础研究中具有重要价值。目前,水稻除第 12 号染色体外,在其他染色体上已报道的叶绿素缺失突变相关的基因有 80 多个(<http://www.gramene.org/newsletters/rice-genetics/rgnl2/v12p93.html>),其中已进行较详细分子定位的基因有 10 多个,6 个基因被克隆^[10,11]。另外,水稻叶绿素缺失突变类型丰富,根据叶色不同可将水稻叶色突变体分为多种类型,即白化、黄叶、淡绿、深绿、常绿、条纹和斑马叶等^[12]。本研究从“嘉花 1 号”⁶⁰Co γ 射线辐照后代中发现一个新叶绿素缺失黄叶突变体,对该突变体的表型和生理特征以及主要农艺性状进行了观察,并对其进行遗传分析和基因定位,以期为该基因的克隆、功能分析及其育种应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

水稻叶绿素缺失黄叶突变体是由⁶⁰Co γ 射线诱变处理的粳稻“嘉花 1 号”产生的M₂群体后代中获得的,经多次自交繁殖和选择,该突变体的叶绿素

缺失黄叶性状以及各种农艺性状已稳定,暂命名为 yl11 突变体。

1.2 方法

1.2.1 突变体的表型观察

为调查突变体苗期叶色表现,将 yl11 突变体及其野生型嘉花 1 号种子在 25 °C 条件下催芽 4 d 后,播种在装有水稻土的培养皿内,放置在 32.0 °C、12 h/d、180 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照的培养箱(GXZ 智能型,宁波江南仪器厂)中培养,观察突变体的苗期叶色;而在海南和上海大田种植的观察自然条件生长的突变体叶片颜色。

1.2.2 光合色素含量及光合作用速率的测定

2010 年选取在上海师范大学植物园内种植生长的苗期及出穗期的突变体及野生型嘉花 1 号相同部位的叶片,参照高俊凤^[13]的方法提取叶片的叶绿素和类胡萝卜素,用 UV-754 分光光度计分别测定 663、645 和 470 nm 下的吸光值,然后计算叶绿素 a、b 和类胡萝卜素的含量。同时,移栽后每周使用快速非破坏性叶绿素计^[14] (SPAD-502, Minolta, 日本)测定顶部第一张完全展开叶最宽处的叶绿素相对含量 SPAD (Soil and Plant Analyzer Development) 值。另外,在抽穗期采用 GFS-3000 型便携式光合-荧光测定仪(德国 WALZ 公司)测定完全展开的第 2 叶的光合作用速率。实验均重复 3 次。

1.2.3 苗期叶绿体结构电镜观察

分别取 32.0 °C 下生长具有 14 d 苗龄的突变体和嘉花 1 号第 4 叶相同部位的叶片,用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸(用 0.2 mol/L pH 7.2 的磷酸缓冲液配制)于 4

下固定 5 h 后,冲洗后再固定于 1% 锇酸(pH 7.2)中 4 h,分别用 50%、70%、80%、95% 和 100% 的乙醇和丙酮进行系列脱水,最后用环氧树脂 SPURR 包埋-聚合,切成约 1 cm 厚的切片,经醋酸铀染色后用

Hitachi765 型透射电镜进行观察和拍照。

1.2.4 主要农艺性状调查

实验在上海师范大学植物园(2010 年)进行,移栽后每周一次调查突变体及嘉花 1 号株高变化,成熟后调查主要农艺性状,实验重复 3 次。

1.2.5 遗传分析和定位群体的构建

2008 年夏在上海 y111 突变体与广亲的籼稻培矮 64S 进行杂交, 同年冬季在海南省陵水县南繁基地加代种植, 获得 F_2 种子。为了扩大定位群体, 2009 年秋在上海收获目标基因区域为杂合型 F_2 单株上的 F_3 代种子。2009 年、2010 年将 F_2 以及 F_3 代种子在 25°C 下催芽 4 d 后, 播在装有水稻土的塑料盒内, 并放置在每天 12 h 的 $180\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照, 温度为 32.0°C 培养箱中, 两周后, 调查统计幼苗叶色。同时, 将筛选出的黄叶突变体幼苗放置在原光照培养箱内培养至 4 叶期, 用于 DNA 的提取。

1.2.6 水稻 DNA 的提取

亲本及 F_2 、 F_3 遗传群体水稻植株的基因组 DNA 提取均采用 CTAB 法^[15], 并略作调整^[16]。

1.2.7 突变体基因的定位

首先选取 209 对 Gramene(<http://www.gramene.org/>)公布的微卫星分子标记(SSR)引物检测 y111 突变体和培矮 64S 的多态性, 然后选取在 12 条染色体上均匀分布的有多态性的分子标记引物, 利用这些分子标记检测 22 个 F_2 的突变单株进行连锁分析, 初步确定突变基因在染色体上的位置。接着进一步扩大 F_2 、 F_3 群体进行精细定位, 精细定位时采用的分子

标记引物有浙江大学沃森基因组科学研究院(<http://www.dnaresearchoxfordjournals.org>)开发的 SSR 引物和根据 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)公布的“日本晴”和“9311”的全基因组序列差异设计的 InDel 分子标记, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。25 μL 的 PCR 反应体系包括: 100 mmol/L Tris-HCl(pH 9.0)、100 mmol/L KCl、20 mmol/L MgSO_4 、80 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2.5 mmol/L dNTP、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物、5 U/mL *Taq* 酶和 20 ng 模板 DNA。使用 Eppendorf PCR 仪进行扩增, 反应体系条件为: 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 1 min, $52\sim 58^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min(复性温度随引物变化), 72°C 延伸 1 min, 32 个循环; 72°C 再延伸 10 min。反应产物用 2.5%~3.5% 琼脂糖凝胶电泳, 经溴化乙锭染色后在 UVP 凝胶成像仪上成像。然后, 根据已有分子标记的分析结果, 利用 MAPMAKER/EXP 3.0 作图软件^[17]进行遗传作图。

2 结果与分析

2.1 突变体的表型

与野生型植株相比, 突变体苗期叶色呈淡黄色, 从分蘖期开始叶色逐渐转变为与其野生型有明显区别的黄色, 但边缘仍为绿色, 而且成熟期叶片呈黄色, 有早衰现象出现(图 1)。

2.2 叶绿素缺失黄叶突变体的生理特征

通过对自然条件下生长的突变体与野生型的光合色素含量结果分析表明(表 1), 无论苗期和抽穗期,



图 1 *yl11* 突变体(左)与嘉花 1 号(右)在苗期(A)、中期(B)及成熟期(C)的表型

yl11 突变体的叶绿素和类胡萝卜素含量较野生型均明显降低, 其总叶绿素、叶绿素a和叶绿素b含量与野生型相比分别下降了 25.0%、9.62%、40.67%以上; 而类胡萝卜素在苗期比野生型增加了 13.07%, 在抽穗期比野生型下降了 21.05%; 叶绿素含量与类胡萝卜素的比值由野生型 8.31~10.10 下降到 6.70~7.51, 而叶绿素a/b则由野生型的 1.43~1.75 增加到 2.35~2.43, 表明 $yl11$ 黄叶突变性状主要是由叶绿素含量尤其叶绿素b的大幅度下降引起的, 是一个叶绿素缺失黄叶突变体。利用快速非破坏性叶绿素计 (SPAD-502, Minolta, 日本)对叶绿素相对含量SPAD值的测定结果表明, 突变体的全生期叶片叶绿素含量都明显低于野生型嘉花 1 号(图 2), 这与苗期观察结果相一致。另外, 在抽穗期, 嘉花 1 号的净光合速率为 $10.15 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 突变体为 $3.62 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 突变体的基因突变可能影响了叶绿素的合成, 进而导致了净光合速率降低。

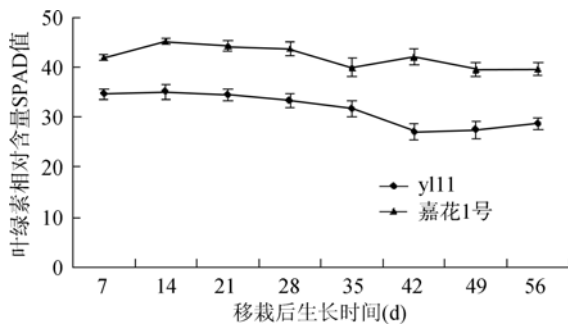


图 2 突变体及野生型展开叶的叶绿素相对含量 SPAD 值变化

2.3 突变体叶绿体超细微结构

利用透射电镜对野生型和突变型的叶绿体进行了观察发现, 野生型的叶绿体内部具有明显的类囊

体基粒片层结构, 数量丰富, 类囊体垛叠整齐规则, 排列紧凑; 突变型叶片的叶绿体发育不正常, 类囊体基粒片层结构排列疏松且不规则(图 3)。这表明该突变不但叶绿素合成受阻而且影响其叶绿体正常发育。

2.4 突变体的主要农艺性状

对在上海实验田种植的 *yl11* 突变体和野生型嘉花 1 号的株高调查表明: 移栽后野生型亲本的株高一直明显高于突变体的株高, 并存在随着生育进程差异越明显(数据略), 成熟时突变体的株高比嘉花 1 号降低了 27.64%(表 2); 但在海南种植的突变体株高下降更为显著, 只有野生型的一半左右(图 1C)。另外, 突变体的穗长明显变短(16.9%), 结实率、千粒重、每穗着粒数也分别比嘉花 1 号下降 10.56%、17.42%、51.58%, 而单株有效穗数却增加了 30.00%。

2.5 突变体的遗传分析

突变体与矮 64S 进行杂交生产所有 F_1 个体都表现为正常表型, F_2 群体发生了叶色差异明显的正常绿苗和黄叶苗的分离。随机调查了 381 株 F_2 植株, 发现野生型植株为 298 株, 突变型黄叶株 83 株, 经 χ^2 测验, 其分离比例符合 3:1 ($\chi^2=1.93 < \chi^2_{0.05}=3.84$), 表明该突变体的叶绿素缺失黄叶性状由 1 对隐性核基因控制, 命名为 *yl11*。

2.6 突变体的基因定位

利用筛选到的 43 对有多态性的 SSR 引物对 22 株突变体 F_2 植株进行连锁分析, 结果发现位于水稻第 11 染色体上的分子标记 RM206 和 RM209 与该突变性状连锁, 表明突变基因 *yl11* 位于水稻第 11 染色体上。利用新设计的 SSR 和 InDel 分子标记(表 3)对 176 株突变型 F_2 植株, 将突变基因 *yl11* 位于

表 1 *yl11* 突变体与野生型嘉花 1 号叶片光合色素与净光合速率

性状	苗期		抽穗期	
	<i>yl11</i>	嘉花 1 号	<i>yl11</i>	嘉花 1 号
叶绿素 (mg/g)	1.32±0.09	1.76±0.03	1.15±0.26	1.62±0.21
叶绿素 a (mg/g)	0.94±0.07	1.04±0.02	0.80±0.20	1.03±0.11
叶绿素 b(mg/g)	0.39±0.03	0.73±0.03	0.35±0.07	0.59±0.10
叶绿素 a/b	2.43±0.15	1.43±0.06	2.35±0.34	1.75±0.11
类胡萝卜素 (mg/g)	0.20±0.02	0.17±0.01	0.15±0.03	0.19±0.01
叶绿素/类胡萝卜素	6.70±0.39	10.10±0.95	7.51±0.57	8.31±0.57

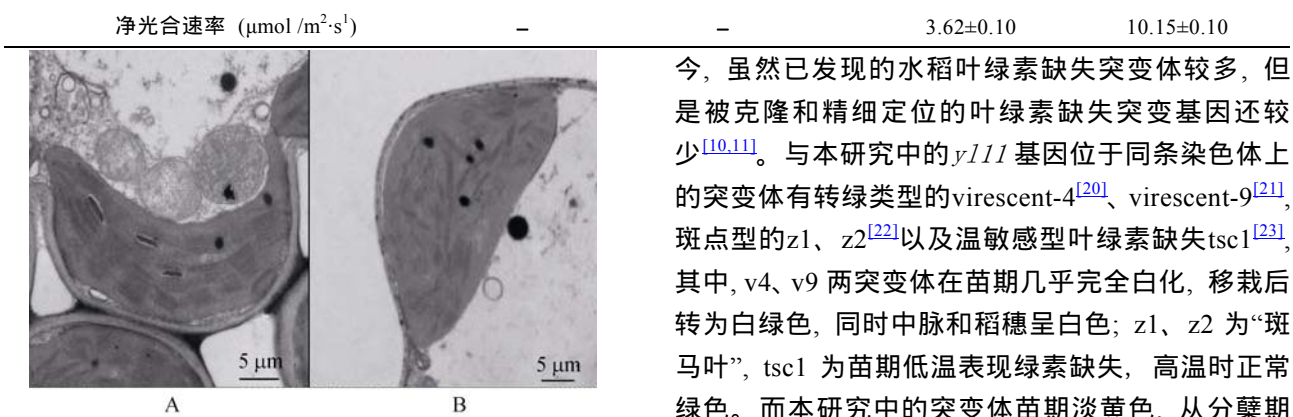


图 3 野生型嘉花 1 号(A)与 *yll1* 突变体(B)叶绿体超细微结构

表 2 *yll1* 突变体与其野生型亲本嘉花 1 号的农艺性状比较(上海 2010 年)

性状	<i>yll1</i>	嘉花 1 号	比野生型增减 (%)
株高/cm	55.5	76.7	-27.6
穗长/cm	8.8	10.5	-16.9
结实率/%	81.3	90.8	-10.6
千粒重/g	21.8	26.4	-17.4
每穗粒数	32.1	66.3	-51.6
每株有效穗数	13.0	10.0	+30.0

MM2199 与 InDel21501 之间, 其遗传距离分别为 5.1 cM 和 9.6 cM, 然后进一步加上 744 株突变型F₃定位群体, 最终将目的基因 *yll1* 定位在分子标记 MM2199 与 ID21039 之间的 110 kb 范围内(图 4), 跨越 AC136149 和 AC108871 两个 BAC 克隆群。

3 讨论

叶绿素合成和叶绿体的发育的遗传调控机理, 一直是植物遗传和分子生物学研究的热点^[18,19]。迄

今, 虽然已发现的水稻叶绿素缺失突变体较多, 但是被克隆和精细定位的叶绿素缺失突变基因还较少^[10,11]。与本研究中的 *yll1* 基因位于同条染色体上的突变体有转绿类型的 *virescent-4*^[20]、*virescent-9*^[21]、斑点型的 *z1*、*z2*^[22] 以及温敏感型叶绿素缺失 *tsc1*^[23], 其中, *v4*、*v9* 两突变体在苗期几乎完全白化, 移栽后转为白绿色, 同时中脉和稻穗呈白色; *z1*、*z2* 为“斑马叶”, *tsc1* 为苗期低温表现叶绿素缺失, 高温时正常绿色。而本研究中的突变体苗期淡黄色, 从分蘖期开始逐渐转变为黄色, 并伴随株高显著下降、千粒重下降、每穗粒数减少, 有效穗明显增加。因此, *yll1* 突变体是一个新型水稻叶绿素缺失黄叶突变体。在水稻叶绿素缺失突变体中, 叶绿素 b 含量下降的突变是较为常见的突变性状^[24~26]。Terao 等^[27,28] 根据叶绿素 a/b 的比值大小将水稻叶绿素缺失突变体分为 3 类: 叶绿素 a/b 值介于 6~10 的突变体、叶绿素 a/b 值介于 10.0~15.6 的突变体, 不含叶绿素 b 或叶绿素 a/b 值接近或超过 20 的突变体。但林钰琼等^[29] 认为水稻叶绿素缺失突变体中叶绿素 a/b 值是呈连续变化的; 汪斌等^[30] 也发现水稻叶绿素 a/b 值是一个数量性状, 主要受 6 个 QTL 控制。本研究中突变体的叶绿素 a/b 值由野生型亲本的 1.43~1.75 增加到 2.35~2.43, 与叶绿素总量下降一样主要由叶绿素 b 含量(40.67% 以上)下降造成, 进而导致了该突变体的净光合速率降低以及主要农艺性状的改变。以前也报道, 一些水稻叶绿素缺失突变体中具有植株矮化特征^[31,32], 但本研究中突变体在海南种植时株高下降更为显著, 可能与水稻的生长环境有关, 至于植株矮化是不是 *yll1* 基因的一因多效的现象还有待进一步研究。

表 3 新设计的分子标记引物

引物名称	引物序列(5'→3')	引物位置
ID120753	GCCTTTCTGCTGGTCCTC GTTTCGGCGTTGGTCAGT	AC109644
MM2199	AGAGGATGAACACTACAGGGCAAGC GTGAGGTGGGAACATAATCCATCG	AC136149
ID 21039	CCCAGCCTTCTATTTCTTTTCA TTAGTTTACTGTCCACCATCACG	AC108871
ID21214	CCTGTTGCCATTGTCTAA GATCGGTGGTTATGTTTG	AC109929
ID21427	AGCATGCGGCCTAATAGCTTCGACA CTTATGGCTGATTCCAAGTTACCGC	AC137589

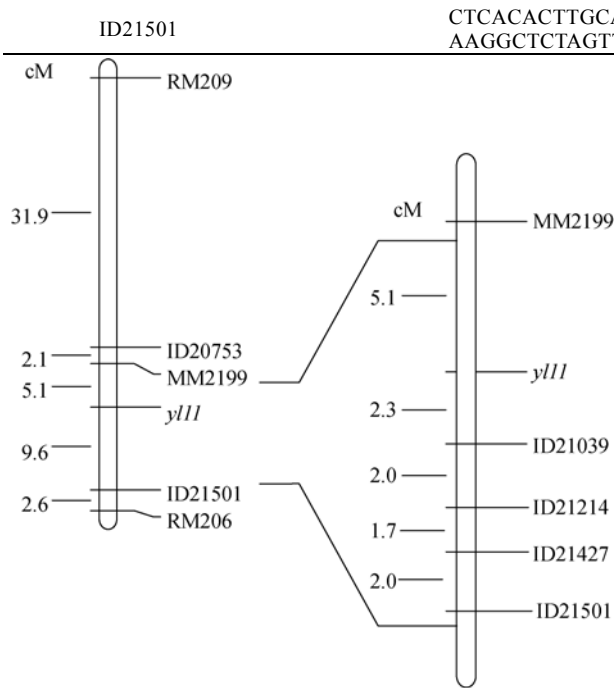


图 4 叶绿素缺失突变黄叶基因 *yIII* 在水稻第 11 染色体长臂上的分子连锁图

本研究将 *yIII* 基因定位在第 11 染色体上的 MM2199 和 ID21039 分子标记之间 110 kb 内, 跨越 AC136149 和 AC108871 两个 BAC 克隆群, 利用 Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice/#search>) 网站预测该区域内的候选基因, 结果显示该区段共注释有 15 个候选基因, 但没有发现与叶绿素合成或叶绿体发育相关的已知功能基因, 说明 *yIII* 基因是一个影响水稻叶绿素合成/叶绿体发育相关新基因。今后将在此基础上扩大定位群体, 在该目标基因区域发展新的分子标记, 以便为该基因的克隆及功能研究提供理论基础。对 *yIII* 基因的克隆及功能研究将有助于加深我们对水稻叶绿体发育及叶绿素合成途径的调控分子机理的理解。

参考文献(References):

- [1] Yu J, Hu SN, Wang J, Wong GK, Li SG, Liu B, Deng YJ, Dai L, Zhou Y, Zhang XQ, Cao ML, Liu J, Sun JD, Tang JB, Chen YJ, Huang XB, Lin W, Ye C, Tong W, Cong LJ, Geng JN, Han YJ, Li L, Li W, Hu GQ, Huang XG, Li WJ, Li J, Liu ZW, Li L, Liu JP, Qi QH, Liu JS, Li L, Li T, Wang XG, Lu H, Wu TT, Zhu M, Ni PX, Han H, Dong W, Ren XY, Feng XL, Cui P, Li XR, Wang H, Xu X, Zhai WX, Xu Z, Zhang JS, He SJ, Zhang JG, Xu JC, Zhang KL, Zheng XW, Dong JH, Zeng WY, Tao L, Ye J, Tan J, Ren XD, Chen XW, He J, Liu DF, Tian W, Tian CG, Xia HA, Bao QY, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao WM, Li P, Chen W, Wang XD, Zhang Y, Hu JF, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang GY, Xiong YQ, Li ZJ, Mao L, Zhou CS, Zhu Z, Chen RS, Hao BL, Zheng WM, Chen SY, Guo W, Li GJ, Liu SQ, Tao M, Wang J, Zhu LH, Yuan LP, Yang HM. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 2002, 296(5565): 79–92. DOI
- [2] Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang RL, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong JP, Miguel T, Paszkowski U, Zhang SP, Colbert M, Sun WL, Chen LL, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). *Science*, 2002, 296(5565): 92–100. DOI
- [3] 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. *Nature*, 2003, 422(6932): 618–621. DOI
- [4] 马艺沔, 刘璐, 朱晨光, 孙昌辉, 徐波, 方军, 唐九友, 罗安定, 曹守云, 李古坡, 钱前, 薛勇彪, 储成才. 利用一多功能 T-DNA 标签系统创制水稻突变体. *遗传学报*, 2009, 36(5): 267–276. DOI
- [5] Noutoshi Y, Ito T, Shinozaki K. *Albino and pale green 10* encodes BBMII isomerase involved in histidine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(7): 1165–1172. DOI
- [6] Isaacson T, Ronen G, Zamir D, Hirschberg J. Cloning of *tangerine* from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell*, 2002, 14(2): 333–342. DOI
- [7] Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G, Kuntz M. Mutations in the *Arabidopsis* gene *IMMUTANS* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell*, 1999, 11(1): 57–68. DOI

- [8] Lonosky PM, Zhang XS, Honavar V G, Dobbs DL, Fu AG, Rodermel SR. A proteomic analysis of maize chloroplast biogenesis. *Plant Physiol*, 2004, 134(2): 560–574. [DOI](#)
- [9] Rzeznicka K, Walker CJ, Westergren T, Kannangara CG, Wettstein DV, Merchant S, Gough SP, Hansson M. Xantha-1 encodes a membrane subunit of the aerobic Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase involved in chlorophyll biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(16): 5886–5891. [DOI](#)
- [10] Zhang HT, Li JJ, Yoo JH, Yoo SC, Cho SH, Koh HJ, Seo HS, Pack NC. 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*, 2006, 62(3): 325–337. [DOI](#)
- [11] Wu ZM, Zhang X, He B, Diao LP, Sheng SL, Wang JL, Guo XP, Su N, Wang LF, Jiang L, Wang CM, Zhai HQ, Wan JM. A chlorophyll-deficient rice mutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiol*, 2007, 145(1): 29–40. [DOI](#)
- [12] 张力科, 高用明. 水稻叶色突变体及其基因定位和克隆的研究进展. *作物杂志*, 2009, (2): 12–16. [DOI](#)
- [13] 高俊凤. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2006: 74–76. [DOI](#)
- [14] Dwyer LM, Tollenaar M, Houwing L. A nondestructive method to monitor leaf greenness in corn. *Can J Plant Sci*, 1991, 71(2): 505–509. [DOI](#)
- [15] Muray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8(19): 4321–4326. [DOI](#)
- [16] 张向前, 邹金松, 朱海涛, 李晓燕, 曾瑞珍. 水稻早熟多子房突变体 *fon5* 的遗传分析和基因定位. *遗传*, 2008, 30(10): 1349–1355. [DOI](#)
- [17] Lincoln S, Daly M, Lander E. Constructing genetics maps with MAPMAKER/EXP 3.0. Whitehead Institute Technical Report. 3rd ed. Cambridge, Massachusetts: Whitehead Institute, 1992. [DOI](#)
- [18] 杨权海, 陆巍, 胡茂龙, 王春明, 张荣铄, Yano M, 万建民. 水稻叶片叶绿素和过氧化氢含量的QTL检测及上位性分析. *遗传学报*, 2003, 30(3): 245–250. [DOI](#)
- [19] Chen T, Zhang YD, Zhao L, Zhu Z, Lin J, Zhang SB, Wang CL. Fine mapping and candidate gene analysis of a green-revertible albino gene *gra(t)* in rice. *J Genet Genomics*, 2009, 36(2): 117–123. [DOI](#)
- [20] Gothandam KM, Kim ES, Cho H, Chuang YY. OsPPR1, a pentatricopeptide repeat protein of rice is essential for the chloroplast biogenesis. *Plant Mol Biol*, 2005, 58(3): 421–433. [DOI](#)
- [21] Kim SR, Lee J, Jun SH, Park S, Kang HG, Kwon S, An G. Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Mol Biol*, 2003, 52(4): 761–773. [DOI](#)
- [22] Parks BM, Quail PH. Phytochrome-deficient *hy1* and *hy2* long hypocotyl mutants of *Arabidopsis* are defective in phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant Cell*, 1991, 3(11): 1177–1186. [DOI](#)
- [23] Dong YJ, Dong WQ, Shi SY, Jin QS. Identification and genetic analysis of a thermo-sensitive seedling-colour mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Breed Sci*, 2001, 51(1): 1–4. [DOI](#)
- [24] Hsu BD, Lee JY. The photosystem II heterogeneity of chlorophyll *b*-deficient mutants of rice: a fluorescence induction study. *Aust J Plant Physiol*, 1995, 22(2): 195–200. [DOI](#)
- [25] Polle JE, Benemann JR, Tanaka A, Melis A. Photosynthetic apparatus organization and function in the wild type and a chlorophyll *b*-less mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. Dependence on carbon source. *Planta*, 2000, 211(3): 335–344. [DOI](#)
- [26] 龚红兵, 陈亮明, 刁立平, 盛生兰, 林添资, 杨图南, 张荣铄, 曹树青, 翟虎渠, 戴新宾, 陆巍, 许晓明. 水稻叶绿素 *b* 减少突变体的遗传分析及其相关特性. *中国农业科学*, 2001, 34(6): 686–689. [DOI](#)
- [27] Terao T, Yamashita A, Kamh S. Chlorophyll *b*-deficient mutants of rice I. absorption and fluorescence spectra and chlorophyll *a/b* ratios. *Plant Cell Physiol*, 1985, 26(7): 1361–1367. [DOI](#)
- [28] Falbel TG, Staehelin LA. Partial blocks in the early steps of the chlorophyll synthesis pathway: A common feature of chlorophyll *b*-deficient mutants. *Physiol Plant*, 1996, 97(2): 311–320. [DOI](#)
- [29] 林钰琼, 刘松, 傅亚萍, 于永红, 胡国成, 斯华敏, 孙宗修. T-DNA插入水稻突变体库的叶绿素和净光合速率变化. *中国水稻科学*, 2003, 17(4): 369–372. [DOI](#)
- [30] Wang B, Lan T, Wu WR, Li WM. Mapping of QTLs controlling chlorophyll content in rice. *Acta Genet Sin*, 2003, 30(12): 1127–1132. [DOI](#)
- [31] Liu WZ, Fu YP, Hu GC, Si HM, Zhu L, Wu C, Sun ZX. Identification and fine mapping of a thermo-sensitive chlorophyll deficient mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 2007, 226(3): 785–795. [DOI](#)
- [32] 胡景涛, 张甲, 李园园, 付崇允, 郑静, 陈家彬, 胡燕, 李仕贵. 水稻白色中脉 *Oswm2* 的遗传分析与分子标记定位. *遗传*, 2008, 30(9): 1201–1206. [DOI](#)