

水稻白化复绿突变体白 784 的生理特性 分析及基因精细定位

王付华¹,王 亚^{1*},王青林²,尹海庆^{1**},王生轩¹,陈献功¹,
孙建军¹,王越涛¹,付 景¹,白 涛¹,周 柯¹

(1. 河南省农业科学院 粮食作物研究所,河南 郑州 450002;2. 信阳市农业科学院,河南 信阳 464000)

摘要:为探讨水稻白化复绿突变体白 784 的生理特性和相关遗传机制,研究了不同温度处理下白 784 的表型和生理特性,结果表明,白化表型受温度控制,20、22、24 ℃低温处理使白 784 叶片的色素合成不同程度受阻,叶片呈白化表型;与对照相比,白 784 的叶绿素 a、b 和类胡萝卜素含量显著下降,20 ℃处理(10 d)白 784 叶绿素 a、叶绿素 b 较对照分别下降 95.18% ($P < 0.01$)、86.86% ($P < 0.01$);22 ℃处理(14 d)白 784 叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素较对照分别下降 96.19% ($P < 0.01$)、93.25% ($P < 0.01$)、92.76% ($P < 0.01$);24 ℃处理(12 d)白 784 叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素较对照分别下降 86.17% ($P < 0.05$)、91.67% ($P < 0.01$)、95.30% ($P < 0.01$);26 ℃处理(12 d)白 784 叶色绿化,叶绿素 a、b 和类胡萝卜素含量较对照分别下降 27.63%、25.70%、27.17% ($P > 0.05$);28 ℃处理(12 d)白 784 叶色与正常无异,叶绿素 a、b 和类胡萝卜素含量较对照差异不显著;表明 24~26 ℃是白 784 叶色白化的敏感温度。同时构建 F₂ 作图群体(白 784 × 郑州早粳),进行遗传分析和基因定位,结果表明,该突变体温敏白化性状受 1 对隐性核基因控制;利用 424 个 SSR 分子标记将 *Abi6* 初步定位在水稻第 6 号染色体上,位于标记 RM5988 ~ RM6071,与标记的遗传距离分别为 2.4、9.7 cM;进一步扩大 F₂ 群体,在 F₂、F₃ 群体白化单株中寻找目标区段发生重组的个体,利用 InDel 标记分析目标区段杂合单株的标记基因型,将 *Abi6* 定位在 InDel 标记 Y15420 ~ Y15648,标记间物理距离约 278 kb。

关键词:水稻;白化复绿;白 784;精细定位

中图分类号:S511 文献标志码:A 文章编号:1004-3268(2015)10-0017-07

Physiological Characters Analysis and Gene Fine Mapping of Green-revertible Albino Mutation Line Bai 784

WANG Fuhua¹,WANG Ya^{1*},WANG Qinglin²,YIN Haiqing^{1**},WANG Shengxuan¹,CHEN Xiangong¹,
SUN Jianjun¹,WANG Yuetao¹,FU Jing¹,BAI Tao¹,ZHOU Ke¹

(1. Institute of Cereal Crop, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;
2. Xinyang Academy of Agricultural Sciences, Xinyang 464000, China)

Abstract: In order to study the physiological characters and relative genetic mechanism of green-revertible albino mutation line Bai 784, the phenotype and physiological characters were studied under different temperature. The results showed that the albino phenotype was controlled by temperature. Under the tem-

收稿日期:2015-03-26
基金项目:河南省农业科学院发展专项资金项目;河南省重大科技专项(121100110200);河南省水稻产业技术创新团队首席专家项目(S2010-04);河南农业科学院农业科技创新项目(201315619)
作者简介:王付华(1966-),男,湖南祁阳人,副研究员,博士,主要从事水稻分子育种工作。
E-mail:wangfuhuahunan@yahoo.com.cn
* 与第一作者同等贡献。
** 通讯作者:尹海庆(1965-),男,河南南阳人,研究员,主要从事水稻育种工作。E-mail:yinhq98@163.com

perature of 20 °C, 22 °C, 24 °C, pigment synthesis of the mutant seedling was hindered, and the mutant seedling showed albino phenotype. Compared with the control, the content of chlorophyll a, b significantly decreased by 95.18%, 86.86% respectively under 20 °C for 10 d; the content of chlorophyll a, b and carotenoid significantly decreased by 96.19%, 93.25%, 92.76% respectively under 22 °C for 14 d; the content of chlorophyll a, b and carotenoid decreased by 86.17%, 91.67%, 95.30% respectively under 24 °C for 12 d; the mutation line turned green, and the chlorophyll a, b and carotenoid content decreased by 27.63%, 25.70%, 27.17% respectively under 26 °C for 12 d; the mutant leaf color was nearly the same as the control under 28 °C for 12 d, and there was no difference in the chlorophyll a, b and carotenoid content between mutant and control, indicating that 24–26 °C was the sensitive temperature for albino of leaf. The gene fine mapping was done with F₂ mapping population of Bai 784 × Zhengzhouzaojing, and the results showed that the albino phenotype was controlled by a single nuclear recessive gene (*Abt6*), which was mapped on chromosome 6 between SSR markers RM5998 and RM6071 with a genetic distance of 2.4 cM and 9.7 cM respectively. Screening F₂ and F₃ progenies for lines whose marker genotype was heterozygous in target interval, with which and some new InDel markers the target gene was delimited to a 278 kb interval between Y15420 and Y15648.

Key words: rice; green-revertible albino; Bai 784; fine mapping

植物叶色突变广泛存在于自然界中。由于突变基因往往会对叶绿素的合成和降解造成影响, 改变叶绿素含量, 所以叶色突变也称为叶绿素缺陷突变^[1]。大多数水稻叶色突变体的显著特征是叶色失常, 多数在苗期表达, 出现诸如白化、黄化、浅绿、条纹、斑点等叶色表型, 其中白化、黄化的叶色突变体出现最多^[2-3]。随着研究的不断深入, 叶色突变体越来越受到人们的重视, 它的应用也越来越广泛。基础研究方面, 叶色突变体是研究光合系统结构与功能及光能利用的理想材料, 对叶绿素生物合成, 叶绿体结构、功能、遗传、分化、发育及激素生理研究具有重要意义^[4]。生产上, 叶色突变性状由于极易被识别, 且通常在苗期表达, 将其作为标记性状导入不育系可以部分解决目前杂交制种过程中种子纯度低的问题^[5]; 另外, 一些叶色突变体具有特殊的优良性状, 可以为作物遗传育种提供优异的种质资源^[6]。例如, 目前对茶叶、烟草等经济作物的研究表明, 叶绿素的缺失也会使其具有特殊的优良品质^[7-8]。

叶绿体来源于原始光合细菌, 有自己的基因组, 包括约 40 个光合作用相关基因和约 60 个质体蛋白合成相关基因^[9]。同时超过 3 000 个叶绿体构成必需蛋白由核基因编码^[10-11], 在胞质中翻译后转运至叶绿体, 叶绿体的发育、形成涉及到叶绿体和核 2 个细胞器遗传信息交流的协调, 是一个被精细调节的复杂过程^[12], 且质体基因往往经过复杂的转录后修饰^[13], 这些过程中任何差错都可能导致对叶绿体的伤害, 产生叶色变异。

植物发生叶色突变的分子机制目前有以下几种观点^[14-19]: (1) 叶绿素合成和降解途径中相关基因的突变; (2) 血红素→光敏色素生色团生物合成途径中基因突变; (3) 编码叶绿体蛋白的基因突变; (4) 与光合系统无直接关系的基因突变。目前高等植物的叶色突变机制研究多见于拟南芥, 而水稻则明显滞后。叶色突变性状大多是由单隐性核基因控制的质量性状。迄今为止, 至少发现了 163 个水稻叶色突变材料, 有超过 134 个突变基因定位在染色体上, 其中有 124 个基因定位在相应染色体的分子标记之间, 已克隆的叶色突变基因有 35 个, 这些基因分别参与叶绿素合成或降解过程、叶绿体发育调控和类胡萝卜素生物代谢途径等^[20]。

白化复绿这类叶色突变, 主要表现为苗期白化, 随后叶色逐渐转绿, 最终叶色恢复正常。因此, 这类突变体是适合研究叶绿素生物合成和叶绿体发育的重要遗传材料^[21], 是一种既具有理论研究价值, 在水稻遗传育种中也具有潜在应用价值的突变类型。白 784 是在籼稻材料中发现的一个能够稳定遗传的白化复绿材料, 目前已证实该突变表型受温度控制, 但其生理和遗传机制尚不明了。本研究拟对白 784 的生理特性进行观察, 并通过基因精细定位解析相关性状的遗传机制, 为后续基因克隆及其在水稻叶绿素合成、叶绿体发育过程中的功能分析奠定良好的基础, 并为水稻高光效生理研究和白化复绿性状在生产上的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

水稻白化复绿突变体白 784 来源于籼稻高代育种材料中的自然变异,经多代自交已遗传稳定,以籼稻突变体白 784 与粳稻品种郑州早粳杂交, F_1 自交构建 F_2 分离群体。

1.2 白 784 叶色表型鉴定及叶绿素、类胡萝卜素含量测定

取干净、饱满一致的白 784 种子播种于营养钵(直径 14 cm,高 13 cm)中,然后分别放置在 20、22、24、26、28 ℃ 的光照培养箱中培养,其他生长条件保持一致,其中,光照时间为 6:00—19:00,光照强度为 7 500 lx,相对湿度为 75%,以白 784 非白化姊妹系为对照。从 2 叶期开始观察叶色的变化。

在 4 叶期取第 2、3 叶 的叶片 0.2 g,剪碎后浸泡在 30 mL 80% 丙酮中,于 4 ℃ 避光浸提 48 h,中间振荡多次,最后定容至 50 mL。用紫外可见分光光度计 UV-1700(SHIMADZU)测定 663 nm、646 nm 和 470 nm 下的吸光值,分别记为 A_{663} 、 A_{646} 、 A_{470} ,重复 6 次。按 Lichtenthaler^[22] 的方法,测定和计算叶片单位鲜质量叶绿素和 β -胡萝卜素的含量。叶绿素 a 含量(Ca) = $12.21A_{663} - 2.81A_{646}$;叶绿素 b 含量(Cb) = $20.13A_{646} - 5.03A_{663}$;类胡萝卜素含量(Cx) = $(1\,000A_{470} - 3.27Ca - 104Cb) \div 229$ 。

1.3 遗传分析和基因定位

根据 22 ℃ 温度下水稻 4 叶期幼苗的叶色随机选取 10 株典型白化单株、10 株绿苗,建立 DNA 池,

利用集团分离分析法(BSA)找寻与叶色表型连锁的标记。根据分子标记分析结果, F_2 分离群体中与白化转绿亲本带型一致的单株记为 1,与亲本郑州早粳带型一致的单株记为 2,杂合单株记为 3,缺失单株记为 0,以 MAPMAKER(EXP 3.0)作图软件^[23] 构建分子标记连锁图谱。以根据籼稻 9311、粳稻日本晴基因组序列开发的 InDel 标记进行精细定位。

1.4 DNA 提取及 PCR 检测

采用 CTAB 法提取植物叶片组织总 DNA^[24]。PCR 反应的总体积为 10 μ L,各组分加入量为:2 \times power Taq PCR MasterMix(购自 BioTeke 公司),5 μ L;上下游引物(浓度为 10 μ mol/L)各公司 0.5 μ L;模板 DNA,1 μ L;无菌去离子水,3 μ L。PCR 循环的反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,34 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。取 3 μ L 扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(电泳缓冲液 1 \times TBE,电压 120 V,时间 2.5 h)分离,采用 AgNO₃ 法(0.1%)染色。

2 结果与分析

2.1 水稻白 784 突变体表型观察

观察发现,20 ℃ 处理白 784 叶片呈完全白化,植株矮小,22 ℃、24 ℃ 处理白 784 叶片黄化,颜色现绿,与对照相比植株偏矮,均表现生长受阻;温度上升到 26 ℃ 后白 784 叶色绿化,与对照无明显差异(图 1);各温度处理过程中对照叶色无变化,表明白 784 的叶色变化受温度控制,日均温度低于 24 ℃ 表现明显的白化性状。

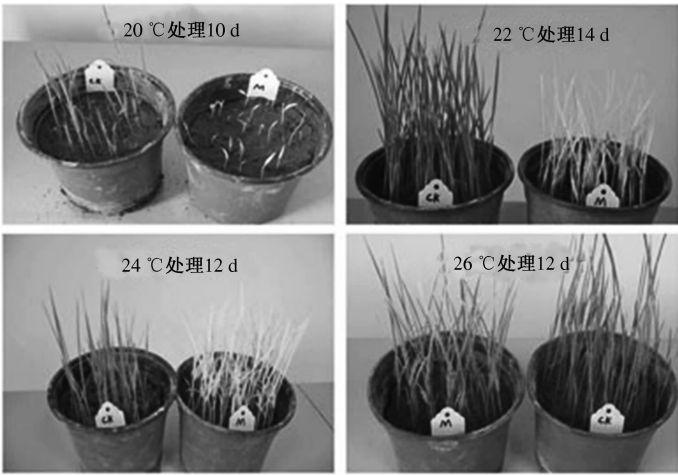


图 1 白 784 不同温度条件下的表型变化

2.2 不同处理温度下白 784 与非突变姊妹系叶片的色素含量比较

白 784 及其非突变姊妹系(对照)苗期叶片的

色素含量测定结果显示(表 1),20、22、24 ℃ 处理,白 784 的叶绿素 a、b 和类胡萝卜素含量较对照显著下降;20 ℃ 处理(10 d)白 784 叶绿素 a、叶绿素 b 较

对照分别下降 95.18% ($P < 0.01$)、86.86% ($P < 0.01$);22 ℃ 处理(14 d)白 784 叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素较对照分别下降 96.19% ($P < 0.01$)、93.25% ($P < 0.01$)、92.76% ($P < 0.01$);24 ℃ 处理(12 d)白 784 叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素较对照分别下降 86.17% ($P < 0.05$)、91.67% ($P < 0.01$)、95.30% ($P < 0.01$)。26 ℃ 处理(12 d)白 784 的叶绿素 a、b 和类胡萝卜素含量较对照分别下降 27.63%、25.70%、27.17%,差异不显著。28 ℃ 处理(12 d)白 784 的叶绿素 a、b 和类胡萝卜素含量较对照分别下降 10.07%、7.69%、9.52%,差异不显著。

说明 20~24 ℃ 处理使白 784 叶片的色素合成受阻,揭示白 784 突变体的白化表型与叶片色素尤其是叶绿素、类胡萝卜素缺失有关联。26 ℃ 处理白 784 叶片色素含量与对照差异不明显,色素合成受影响幅度急剧变小,28 ℃ 下与对照无明显差异,结合各处理叶色视觉上的表型变化,说明 24~26 ℃ 是白 784 叶色白化的敏感温度。

表 1 不同温度条件下白 784 的叶绿素 a、b 和胡萝卜素含量				
		mg/g		
处理温度 /℃	材料	叶绿素 a	叶绿素 b	类胡萝卜素
20	CK	2.1 780	0.4 999	0.4 140
	白 784	0.1 049	0.0 657	—
	± CK	-2.0 731 **	-0.4 342 **	—
	± CK/%	-95.18 **	-86.86 **	
22	CK	3.1 037	0.6 930	0.5 468
	白 784	0.1 182	0.0 468	0.0 396
	± CK	-2.9 855 **	-0.6 462 **	-0.5 072 **
	± CK/%	-96.19 **	-93.25 **	-92.76 **
24	CK	3.1 326	0.8 604	0.5 193
	白 784	0.4 332	0.0 716	0.0 244
	± CK	-2.6 994 *	-0.7 888 **	-0.4 949 **
	± CK/%	-86.17 *	-91.67 **	-95.30 **
26	CK	3.5 797	0.7 872	0.6 136
	白 784	2.5 906	0.5 849	0.4 469
	± CK	-0.9 891	-0.2 023	-0.1 667
	± CK/%	-27.63	-25.70	-27.17
28	CK	2.6 644	0.7 061	0.4 977
	白 784	2.3 962	0.6 518	0.4 503
	± CK	-0.2 682	-0.0 543	-0.0 474
	± CK/%	-10.07	-7.69	-9.52

注: *、*、* 分别表示 1% 和 5% 的差异显著性。

2.3 白 784 白化性状相关基因的初步定位

白 784 连续种植多代均出现相同的突变表型,表明变异表型并非由环境因素造成,而是由基因突

变所致。利用籼粳杂交构建 F₂ 群体,对白化相关性状基因进行定位。白化性状表现隐性遗传(F₁ 低温下表现同对照)。F₂ 群体材料苗期低温下绿苗(241):白化苗(83)符合 3:1 的分离比例,说明相关基因由隐性单基因控制。

以 424 对 SSR 引物对亲本白 784 和郑州早粳进行多态性筛选,筛选到 161 对多态引物,利用筛选到的多态引物在池间进行多态筛选,在第 6 染色体上筛选到 3 个在池间表现多态的标记 RM3827、RM6071 和 RM5988,初步估算离目标基因的距离分别为 20.7、9.7、2.4 cM,目标基因位于 RM5988 和 RM6071 之间;为进一步准确定位,筛选目标基因附近 InDel 标记,将目标基因定位在 Y898 和 Y900 间,距 Y898、Y900 距离均为 1.2 cM,与 Y898 共分离,该基因暂命名为 *Abt6*(图 2)。

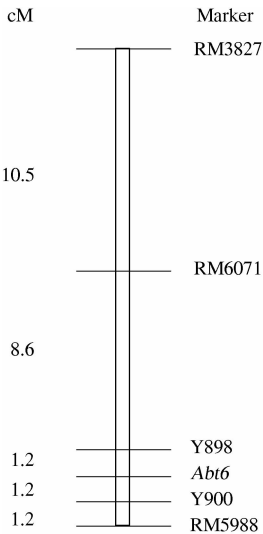


图 2 温度白化相关基因 *Abt6* 的标记连锁图

2.4 温度白化基因 *Abt6* 的精细定位

为精细定位 *Abt6*,选择 F₂ 群体目标区段杂合的单株,繁殖 F₃ 代,对 F₃ 群体进行低温下白化苗鉴定,获得白化单株 256 株。合成 Y898 和 RM5988 间的 InDel 标记 15 对,其中 8 对引物扩增出清晰的多态带型,根据目标区段内标记基因型,在 F₃ 群体白化单株中寻找目标区段发生重组的个体(标记基因型杂合个体)18 株;其中 1 个单株 Y15420 左侧标记全部杂合,右侧标记全部隐性纯和,判定 *Abt6* 在 Y15420 右侧;在另 1 个单株中,Y15648 右侧标记杂合,左侧标记全隐性纯和,判定目标基因在 Y15648 左侧,根据网上基因组信息(<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/>),标记间物理距离约 278 kb,跨越 4 个 BAC 克隆,分别是 AP003517、AP005453、AP003565 和 AP003579(图 3)。

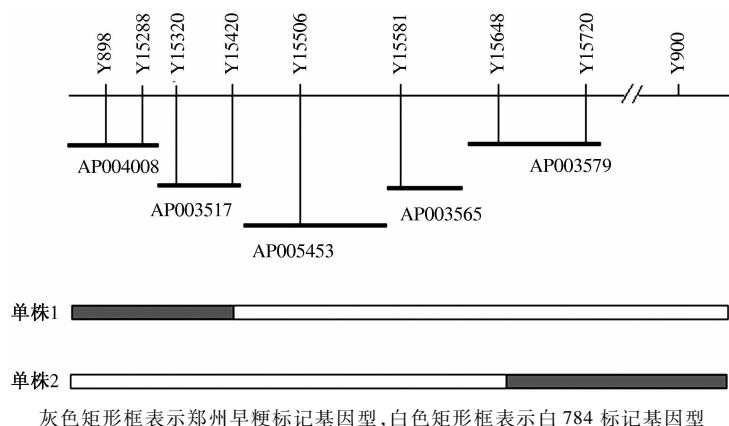


图 3 温度白化相关基因 *Abt6* 的精细定位

3 结论与讨论

3.1 叶色突变的表型及对温度的反应

叶色的突变类型丰富多样,转绿型白化是白化的一种,一般表现幼苗早期白化,后期转绿,这类材料已有诸多报道。如温敏型叶色突变体 W1 低温下表现白化症状,高温下接近正常,叶色转变的临界温度为 23 ℃^[25];突变体 W17 和 W25 幼苗在低温下表现为白色,高温下转为浅绿色^[26];董彦君等^[27]发现,低温白化转绿突变体 *Fan5*,其白化敏感临界温度为 26.1 ℃。近年也发现诸多转绿型突变体,如王军等^[4]发现 *v13(t)* 在低温 (<26 ℃) 下,1~3 叶表现为白色,并逐渐死亡;在 28 ℃ 下,1~3 叶抽出时叶尖和边缘白色,以后逐渐转绿;在 30 ℃ 条件下,叶片表现正常。此类基因材料还有 *cisc(t)*^[28]、*gra(t)*^[29] 和 *lta1*^[30] 等。

本研究中,突变体白 784 苗期日均温低于 24 ℃ 时表现稳定白化,26 ℃ 以上表现趋于正常,随温度上升叶色逐渐转绿,最终叶色恢复正常。叶色的变化与叶绿素含量变化一致^[31];对幼苗色素含量进行测定的结果表明,白 784 叶绿素含量随温度上升而逐渐增加,从 24 ℃ 上升到 26 ℃ 时,其叶绿素含量剧增,随后突变体含量与对照趋近一致,类胡萝卜素含量变化也表现相近趋势;表明其白化敏感温度在 24~26 ℃。

3.2 基因定位和相关基因分析

迄今为止,已有多个白化转绿相关基因的报道,低温白化突变体 *v2* 编码 1 个鸟苷酸激酶,低温下(如 20 ℃ 恒温)表现质体发育障碍,叶黄白色,高温下(30 ℃ 恒温)接近野生型叶片绿色,该基因位于第 3 染色体上^[32]; *v3* 编码核苷酸还原酶的 1 个大亚基(RNRL1),RNRL1 第 5 外显子处的 1 个单碱基突变,使得甘氨酸错配为丝氨酸,从而影响了 RNRL1

的功能,造成温敏白化^[33];最近,Gong 等^[34]克隆了温敏感白化基因 *lta1*,发现该基因编码 1 个 PPR 蛋白(三角状五肽重复序列),PPR 蛋白一般定位于叶绿体和线粒体,调节细胞器的发育,该基因的突变使得突变体出现温度敏感的白化。

一些白化转绿相关基因已被定位,赵海军等^[35]将玉兔 S 中的白化转绿基因 *gra* 定位在第 10 染色体上的 RM496 与 RM590 之间。Chen 等^[29]将 1 个白化转绿基因 *gra(t)* 精细定位在第 2 染色体上的 RM2-97 和 RM13553 间的 42.4 kb 区域,认为候选基因编码叶绿体蛋白合成延伸因子 Tu。兰涛等^[28]将苗期低温失绿基因 *cisc(t)* 定位在第 9 染色体上 ID18124 和 ID18136 之间 12 kb 范围内,初步认定 *cisc(t)* 编码 1 个 PPR 蛋白。Xia 等^[36]将 1 个苗期低温白化基因 *all2* 定位在第 8 染色体上的 RM5068 和 RM3702 之间。

本研究将温敏白化相关基因 *Abt6* 定位在 6 号染色体长臂的一个 278 kb 的区域内,根据现有的资料,相近区域未见温敏白化相关基因报道,是一个新基因。

3.3 突变体及基因的利用价值

两系法杂交水稻技术为我国杂交水稻的发展开辟了新的途径,成为超级杂交水稻的重要技术基础之一。光温敏核不育系是两系杂交稻的重要工具,由于其雄性不育性通过光温调控来实现,存在因自然光温波动而导致育性不稳定的缺陷。在异常光温条件下不育系出现部分育性恢复,导致杂交种纯度不高,存在潜在的应用风险性^[37]。叶色突变性状由于极易识别,且通常在苗期表达,将其作为标记性状导入不育系可能解决目前杂交制种过程中种子纯度低的问题。舒庆尧等^[38]认为,在杂交水稻育种中应用的叶色标记性状必须具备以下 4 个条件:(1)标记性状明显,表达时期早,幼苗易鉴别;(2)标记性

状稳定,不易受环境因素影响;(3)标记性状受隐性核基因控制;(4)标记性状对杂交种或不育系的产量无显著负效应。迄今为止,利用叶色突变体多个研究单位已选育出带叶色标记性状的两系不育系,如玉兔 S^[39]、云丰 66A^[40]等。本研究中发现的白 784 白化复绿性状能稳定表达,遗传分析表明,该性状受隐性单基因控制,且显著白化表型只在苗期温度较低时(24℃以下)出现,对后期的主要农艺性状影响不明显,故该突变基因作为叶色标记基因在水稻遗传育种中具有较大的应用价值。

此外,在叶片发育中,前质体合成具有活性的叶绿体是植物生长过程中受到核基因和细胞质基因双重调控的代谢过程^[11,41]。核基因组或叶绿体基因组基因发生突变,都可引起光合色素合成受阻,导致植物光合色素含量降低、叶色发生变异,同时产生叶绿体的类囊体膜组分(蛋白质和脂类)缺失、核糖体结构及功能出现缺陷、叶绿体膜金属蛋白酶活性改变、叶绿体转运蛋白异常等性状^[42]。利用此类缺乏色素的叶色突变体,已分离鉴定出多个控制叶绿素合成和叶绿体发育的基因。白化转绿突变体叶绿体能恢复正常发育,能保证后代的正常繁育,方便了后续研究的正常进行。因此,转绿型白化对利用白化苗研究叶绿体的发育和调控具有重要意义。对白 784 的深入研究对于进一步挖掘控制叶绿素合成和叶绿体发育的关键基因,并阐明植物叶绿体发育机制、叶色调控机制具有重要意义。

致谢:感谢阎双勇无私提供精细定位用 InDel 引物序列。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 王彩莲.人工诱发植物叶绿素突变分析[J].核农学通报,1990,11(6):261-265.
- [3] 夏英武,吴殿星,舒庆尧.人工诱发的植物叶绿素突变体的遗传及其应用[J].核农学通报,1996,17(1):41-44.
- [4] 王军,杨杰,陈志德,等.水稻白化转绿突变体 *vl3(t)* 的生理特性和基因定位[J].中国农业科学,2011,44(10):1973-1979.
- [5] Zhao Y, Wang M L, Zhang Y Z, et al. A chloro-phyll-reduced seedling mutant in oilseed rape, *Brassica napus*, for utilization in F₁ hybrid production[J]. Plant Breed, 2000, 119(2):131-135.
- [6] Gan S, Amasino R M. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin[J]. Science, 1995,

- 270(5244):1986-1988.
- [7] 盖钧镒.作物育种学各论[M].北京:中国农业出版社,1997:440-443.
- [8] 成浩,李素芳,陈明,等.安吉白茶特异性状的生理生化本质[J].茶叶科学,1999,19(2):87-92.
- [9] Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, et al. Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana* [J]. DNA Res, 1999, 6(5):283-290.
- [10] Dario L. Chloroplast research in the genomic age[J]. Trends Genet, 2003, 19(1):47-56.
- [11] Koussevitzky S, Nott A, Mockler T C, et al. Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression [J]. Science, 2007, 316(5825):715-719.
- [12] Pogson B J, Albrecht V. Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: An overview [J]. Plant Physiol, 2011, 155(4):1545-1551.
- [13] Stern D B, Goldschmidt C M, Hanson M R. Chloroplast RNA metabolism [J]. Ann Rev Plant Biol, 2010, 61:125-155.
- [14] Beale S I. Green genes gleaned[J]. Trends Plant Sci, 2005, 10(7):309-312.
- [15] Morita R, Sato Y, Masuda Y, et al. Defect in non-yellow coloring 3, an alpha/beta hydrolase-fold family protein, causes a stay-green phenotype during leaf senescence in rice[J]. The Plant Journal, 2009, 59(6):940-952.
- [16] 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 Physiol, 1999, 119(1):143-152.
- [17] Chen G, Bi Y R, Li N. *EGY1* encodes a membrane-associated and ATP-independent metalloprotease that is required for chloroplast development[J]. The Plant Journal, 2005, 41(3):364-375.
- [18] Kushnir S, Babiychuk E, Storozhenko S, et al. A mutation of the mitochondrial ABC transporter *Stal* leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *stark* [J]. Plant Cell, 2001, 13(1):89-100.
- [19] 郭涛,黄宣,黄永相,等.一个控制水稻叶色白化转绿及多分蘖矮杆性状基因 *hw-1(t)* 的鉴定[J].作物学报,2012,38(1):23-35.
- [20] 邓晓娟,张海清,王悦,等.水稻叶色突变基因研究进展[J].杂交水稻,2012,27(5):9-14.
- [21] Archer E K, Bonnett H T. Characterization of a virescent chloroplast mutant of tobacco [J]. Plant Physiol, 1987, 83(4):920-925.
- [22] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes[J]. Meth Enzymol, 1987, 148:350-382.
- [23] 李荣华,夏岩石,刘顺枝,等.改进的 CTAB 提取植物

- DNA 方法[J]. 实验室研究与探索, 2009, 28(9): 14-16.
- [24] Lander E S, Green P, Abrahamson J. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations[J]. Genomics, 1987, 1(2): 174-181.
- [25] 崔海瑞, 夏英武, 高明尉. 温度对水稻突变体 W1 叶色及叶绿素生物合成的影响[J]. 核农学报, 2001, 15(5): 269-273.
- [26] 舒庆尧, 刘贵富, 夏英武. 温敏水稻叶色突变体的研究[J]. 核农学报, 1996, 1(10): 6-10.
- [27] 董彦君, 董文其, 张小明, 等. 突变体 *Fan5* 苗色低温敏感性状的遗传分析[J]. 中国水稻科学, 1995, 4(9): 249-250.
- [28] 兰涛, 汪斌, 凌秋平, 等. 水稻苗期低温失绿基因 *cisc(t)* 的精细定位及其候选基因的确定[J]. 科学通报, 2010, 55(22): 183-2187.
- [29] Chen T, Zhang Y D, Zhao L, *et al.* Fine mapping and candidate gene analysis of a green-revertible albino gene *gra(t)* in rice[J]. J Genet Genomics, 2009, 36(2): 117-123.
- [30] Peng Y, Zhang Y, Lv J, *et al.* Characterization and fine mapping of a novel rice albino mutant low temperature albino1[J]. J Genet Genomics, 2012, 39(8): 385-396.
- [31] 夏英武, 吴殿星, 舒庆尧, 等. 水稻辐射白色转绿突变系的遗传及叶绿体超微结构的分析[J]. 核农学报, 1996, 17(1): 1-4.
- [32] Sugimoto H, Kusumi K, Tozawa Y, *et al.* The virescent-2 mutation inhibits translation of plastid transcripts for the plastid genetic system at an early stage of chloroplast differentiation[J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45(8): 985-996.
- [33] Yoo S C, Cho S H, Sugimoto H, *et al.* Rice *Virescent3* and *Stripe1* encoding the large and small subunits of ribonucleotide reductase are required for chloroplast biogenesis during early leaf development[J]. Plant Physiol, 2009, 50(1): 388-401.
- [34] Gong, X D, Su Q Q, Lin D Z, *et al.* The rice *OsV4* encoding a novel pentatricopeptide repeat protein is required for chloroplast development during the early leaf stage under cold stress[J]. J Integr Plant Biol, 2014, 56(4): 400-410.
- [35] 赵海军, 吴殿星, 舒庆尧, 等. 携带白化转绿型叶色标记光温敏核不育系玉兔 S 的选育及其特征特性[J]. 中国水稻科学, 2004, 18(6): 515-521.
- [36] Xia J C, Wang Y P, Ma B T, *et al.* Ultrastructure and gene mapping of the albino mutant *all2* in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(12): 1112-1119.
- [37] 肖层林, 周承恕. 两系杂交稻种子纯度的影响因素与保纯技术[J]. 杂交水稻, 2000, 15(2): 12-14.
- [38] 舒庆尧, 夏英武, 左晓旭, 等. 二系杂交水稻制繁种利用标记辅助去杂技术[J]. 浙江农业大学学报, 1996, 22(1): 56-60.
- [39] 赵海军, 吴殿星, 舒庆尧, 等. 携带白化转绿型叶色标记光温敏核不育系玉兔 S 的选育及其特征特性[J]. 中国水稻科学, 2004, 18(6): 515-521.
- [40] 李小林, 邓安凤, 邓君浪, 等. 水稻苗期白化转绿型叶色标记籼型不育系“云丰 66A”的选育[J]. 西南农业学报, 2011, 24(2): 410-413.
- [41] 王平荣, 王兵, 孙小秋, 等. 水稻白化转绿基因 *gra75* 的精细定位和生理特性分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(2): 225-232.
- [42] 田大翠. 水稻斑马叶基因 *ZB9(t)* 的遗传分析与初步定位[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2010.