

# 水稻幼苗叶色温敏感突变体的鉴定及其基因定位

江少华<sup>1</sup> 周华<sup>1</sup> 林冬枝<sup>1,\*</sup> 董彦君<sup>1,\*</sup> 叶胜海<sup>2</sup> 张小明<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>上海师范大学 生命与环境科学学院 植物遗传与功能基因研究室, 上海 200234; <sup>2</sup>浙江省农业科学院, 杭州 310021; \* 通讯联系人, E-mail: dzlin@shnu.edu.cn; dong@shnu.edu.cn)

## Identification and Gene Mapping of a Thermo-sensitive Leaf-color Mutant at Seedling Stage in Rice

JIANG Shao-hua<sup>1</sup>, ZHOU Hua<sup>1</sup>, LIN Dong-zhi<sup>1,\*</sup>, DONG Yan-jun<sup>1,\*</sup>, YE Sheng-hai<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-ming<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Laboratory of Plant Genetics and Functional Genes, College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; <sup>2</sup>Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; \* Corresponding author, E-mail: dzlin@shnu.edu.cn; dong@shnu.edu.cn)

JIANG Shaohua, ZHOU Hua, LIN Dongzhi, et al. Identification and gene mapping of a thermo-sensitive leaf-color mutant at seedling stage in rice. *Chin J Rice Sci*, 2013, 27(4): 359-364.

**Abstract:** A thermo-sensitive leaf-color mutant, *tsll1*, was selected from the progeny of the japonica rice variety Jiahua 1 by <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -radiation. Compared with the wild-type parent Jiahua 1 at 20℃, the mutant was characterized yellow-seedling, decreased contents of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid by 94.6%, 88.2% and 91.5%, respectively. Simultaneously, the result of electron microscopic observation revealed that the structure of chloroplasts in the *tsll1* was imperfect seriously. However, the mutant was similar to wild type at high temperatures (32℃). These results indicated that the mutant was obviously thermo-sensitive. Genetic analysis showed that the mutant trait was controlled by a single nuclear recessive gene, tentatively designated as *tsll1*. Moreover, the mapping population of 4928 F<sub>2</sub> mutant individuals derived from Pei'ai 64S/*tsll1* were constructed, then using SSR and InDel markers, the *tsll1* gene was finally mapped to a region of 147 kb between ID14506 and ID14653 on chromosome 11.

**Key words:** thermo-sensitive; leaf-color mutant; chlorophyll content; gene mapping

江少华, 周华, 林冬枝, 等. 水稻幼苗叶色温敏感突变体的鉴定及其基因定位. 中国水稻科学, 2013, 27(4): 359-364.

**摘要:** 在梗稻嘉花 1 号水稻品种经<sup>60</sup>Co  $\gamma$  辐照后代中筛选到一个幼苗叶色温敏感突变体 *tsll1*。与野生型嘉花 1 号相比, 该突变体在 20℃ 下, 幼苗叶色呈黄色; 叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量分别下降 94.6%、88.2% 和 91.5%; 且电镜结果显示叶绿体内部结构不完整。而在高温(32℃)条件下突变体的叶色表型、光合色素含量和叶绿体发育与野生型基本一致, 显示出明显的温度敏感性。遗传分析表明, 该突变体叶色性状受 1 对隐性核基因控制, 暂命名为 *tsll1* (*thermo-sensitive leaf-color11*)。以该突变体与籼稻培矮 64S 杂交, 构建 4928 株突变型 F<sub>2</sub>, 利用 SSR 和 InDel 分子标记将 *tsll1* 基因定位于水稻第 11 染色体上的 ID14506 与 ID14653 之间的 147 kb 的区间内。

**关键词:** 温敏感; 叶色突变体; 叶绿素含量; 基因定位

**中图分类号:** Q343.5; Q754; Q944.56 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-7216(2013)04-0359-06

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 全球近一半的人口以稻米为主食。水稻产量与其植株叶片的光合作用有着密切关系。而水稻叶色的突变往往直接影响叶绿素合成, 从而影响植株的光合作用, 造成产量减产甚至整个植株死亡。因此, 叶色突变体的研究价值受到极大关注。关于叶色突变体的研究较早, 20 世纪 30 年代开始报道迄今, 已经在几乎所

有的高等植物中发现了叶色突变体。如今叶色突变体已广泛应用于高等植物光合作用机制、叶绿素生物合成和叶绿体结构发育的研究。另外, 水稻叶色突变体在杂交育种中得以应用<sup>[1-3]</sup>。

目前已经有接近 134 个水稻叶绿素缺失叶色突变体相关基因被报道, 这些突变基因分布在水稻的 12 条染色体上<sup>[4]</sup>。遗传研究表明, 大部分水稻叶色

突变性状受 1 对隐性核基因控制<sup>[5]</sup>, 而由显性基因控制或是细胞质基因控制的叶色突变体非常少见<sup>[6-7]</sup>。叶色突变体根据苗期叶色不同可分为白化、黄化、浅绿、绿白、白翠、黄绿、绿黄和条纹等 8 种类型<sup>[8]</sup>; 另外, 叶色突变体也可根据温度影响可分为温敏感型和温钝感型<sup>[9]</sup>。温敏感叶色突变体是因为叶绿素和叶绿体的形成与温度密切相关, 导致很多叶色突变体在不同温度下的表型变化比较明显。近几年关于温敏感叶色突变体的报道比较多, 占已报道叶色突变体的 20%。如 *W17*<sup>[10]</sup>、*W25*<sup>[10]</sup>、*tsc-1*<sup>[11]</sup>、*cisc(t)*<sup>[12]</sup>、*all2*<sup>[13]</sup>、*tw5*<sup>[14]</sup>、*gra(t)*<sup>[15]</sup>、*vl*<sup>[16]</sup>、*v2*<sup>[17]</sup>、*w3*<sup>[18]</sup> 和 *stl*<sup>[18]</sup> 这些突变体在低温条件下叶色异常, 当温度升高至 30℃~35℃时叶片叶色表现正常; 另外还有 *W4*<sup>[10]</sup>、*W11*<sup>[10]</sup> 和 *cdel(t)*<sup>[19]</sup> 在高温下叶片叶色表现突变性状, 并随着温度降低叶色逐渐转为绿色。这些温敏感叶色突变体叶色均能出现转绿现象, 虽然已经有 5 个温敏感突变基因克隆成功, 但目前对于温敏感叶色突变体转绿作用机理还不明确。

本研究利用嘉花 1 号经<sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线辐照后筛选得到的一个新的水稻幼苗叶色温敏感突变体 *tsll1*, 对其在不同温度下光合色素含量和叶绿体超微结构进行研究, 同时对突变基因开展了遗传分析和基因定位, 以期对相关基因克隆、功能分析和应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

水稻幼苗叶色温敏感突变体 *tsll1* 是从<sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线诱变梗稻嘉花 1 号产生的 *M*<sub>2</sub> 群体中获得的, 经多次自交繁殖和选择, 该突变体各种农艺性状已稳定。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 突变体幼苗叶色温敏感性鉴定

为了明确突变体叶色温敏感性, 将突变体 *tsll1* 与野生型嘉花 1 号的种子在 28℃ 下催芽 4 d, 然后将发芽后的种子种于盛有水稻土的培养皿中, 分别置于 20℃、24℃、28℃ 和 32℃ 的光照培养箱(GXZ 智能型, 宁波江南仪器厂)中, 光照强度 180  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 12 h 光照/12 h 黑暗。7 d 后开始观察突变体和野生型幼苗的叶色。

#### 1.2.2 光合作用色素含量的测定

在幼苗长至 3 叶期时, 分别称取 4 种温度下生长的突变体和嘉花 1 号幼苗的第 3 叶 0.02 g, 参照

沈伟其<sup>[20]</sup>的方法, 剪碎, 放入具塞试管中, 加混合提取液 5 mL(*V*<sub>乙醇</sub>:*V*<sub>丙酮</sub>:*V*<sub>水</sub>=5:4:1), 常温避光处理 18 h 以上, 叶色褪白后, 采用 BECKMAN-COULTER-DU720 分光光度计测定上清液在 470 nm、645 nm 和 663 nm 下的吸光度值, 分别计算叶绿素 a、b 和类胡萝卜素的含量。试验均重复 3 次。

#### 1.2.3 幼苗叶片叶绿体超微结构观察

分别取 20℃ 和 32℃ 下生长到 3 叶期的 *tsll1* 和嘉花 1 号的第 3 叶相同部位叶片, 先用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸(*OsO*<sub>4</sub>) 4℃ 下固定 5 h, 接着用 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液漂洗, 依次于 50%、70%、80%、95% 和 100% 的乙醇和丙酮梯度脱水, 最后用环氧化树脂 70℃ 过夜包埋成块切片、经醋酸铀-柠檬酸铅双染色后, 用透射电镜(Hitachi 765 型)观察拍照。

#### 1.2.4 突变体遗传分析与定位群体构建

2010 年, 在上海种植的 *tsll1* 突变体与籼稻培矮 64S 杂交获得 *F*<sub>1</sub> 种子, 同年冬季在海南陵水加代种植, 获得 *F*<sub>2</sub> 种子, 然后将 *F*<sub>2</sub> 种子经 28℃ 催芽后, 播种于装有水稻土的不锈钢铁盒内并用保鲜膜封好, 放置于光照培养箱(GXZ 智能型, 宁波江南仪器厂)内培养, 温度 20℃, 光照强度为 180  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 每天光照 12 h。约 10 d 后观察幼苗叶色分离情况, 进行统计分析。同时从 *F*<sub>2</sub> 群体中挑取突变型幼苗, 并移至 32℃ 光照培养箱中继续生长, 用于 DNA 提取及基因定位。

#### 1.2.5 水稻 DNA 的提取

亲本和 *F*<sub>2</sub> 代定位群体的基因组 DNA 均采用改良后的 CTAB 法<sup>[21]</sup>提取。

#### 1.2.6 突变体基因定位

首先采用本实验室保存用于初定位的 64 对 SSR 和 InDel 分子标记检测突变体 *tsll1* 与籼稻培矮 64S 的多态性。然后利用在 12 条染色体上平均分布有多态性的引物对 22 株突变型单株进行染色体连锁分析定位, 并进一步扩大 *F*<sub>2</sub> 群体至 200 株。之后在目标区域内通过 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)公布的梗稻日本晴和籼稻 9311 的全基因组序列差异寻找插入/缺失(InDel)位点, 利用 Primer Premiers 5.0 软件设计 InDel 分子标记, 对突变基因精细定位(引物由上海生工生物工程技术服务公司合成)。25  $\mu\text{L}$  的 PCR 体系包括 100 mmol/L Tris-HCl(pH 9.0)、100 mmol/L KCl、20 mmol/L *MgSO*<sub>4</sub>、80 mmol/L (*NH*<sub>4</sub>)<sub>2</sub> *SO*<sub>4</sub>、2.5

mmol/L dNTP、10  $\mu$ mol/L 引物、5 U/mL *Taq* 酶和 20 ng 模板 DNA。在 Eppendorf PCR 仪上进行扩增,PCR 程序如下:94℃ 下预变性 4 min,94℃ 下变性 30 s,55℃ 下复性 30 s(退火温度随引物变化),72℃ 下延伸 30 s,35 个循环;72℃ 下延伸 7 min。反应产物用 2.0%~2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,经溴化乙锭染色后在 UVP 凝胶成像仪上成像,而对于较难分辨的 DNA 扩增条带,用 8% 聚丙烯酰胺凝胶检测,银染后于冷光源胶片观察灯上观察,拍照记录。

1.2.7 连锁分析

将 F<sub>2</sub> 代中与 *tsll1* 突变体 DNA 带型一致的单株记为“A”,与培矮 64S 带型一致的单株记为“B”,与 F<sub>1</sub> 带型一致的单株记为“H”,带型不清楚的单株记为“—”,将电泳图谱转换成数据群,利用 MAPMAKER/EXP 3.0 软件<sup>[22]</sup> 进行连锁分析和遗传距离计算。

2 结果与分析

2.1 突变体幼苗叶色温敏感特性

在 4 种温度下(20℃、24℃、28℃ 和 32℃)对突变体 *tsll1* 与野生型嘉花 1 号苗期叶色表型进行观察对比(图 1),结果发现野生型嘉花 1 号的幼苗叶色一直呈绿色,与温度没有相关性;而突变体 *tsll1* 在 20℃ 和 24℃ 下第 3、4 叶片均为黄色,在 28℃ 下表现为黄绿相间,32℃ 下则与野生型一致呈绿色。突变体一直在 20℃ 条件下生长,至 5 叶期时第 4 叶也开始转绿,第 5 叶完全呈绿色。可见,该突变体幼苗叶色随着温度升高由黄转绿,具有明显的温敏感性,与叶龄相关。

2.2 不同温度条件下突变体与野生型光合色素含量对比

在不同温度下对突变体 *tsll1* 与野生型嘉花 1 号的光合色素含量进行比较。如图 2 所示,与野生型嘉花 1 号相比,在 20℃ 下,突变体 *tsll1* 的叶绿素 a、b 及类胡萝卜素含量均达到最低值,分别下降 94.6%、88.2% 和 91.5%;在 24℃ 与 28℃ 下,突变体 *tsll1* 的叶绿素 a、b 含量及类胡萝卜素含量分别下降 25.8%~47.6%、37.3%~43.5% 和 36.5%~42.3%;而在 32℃ 下,突变体 *tsll1* 的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量仅下降 5.03%、3.85% 和 3.57%。另外,突变体 *tsll1* 光合色素含量随着温度下降显著降低。上述结果显示在不同温度下光合色

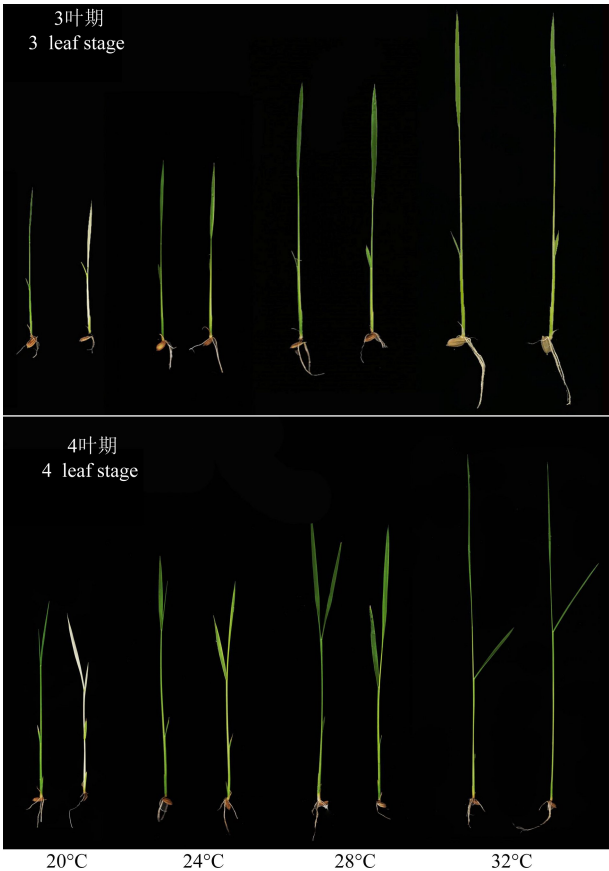


图 1 不同温度条件下野生型嘉花 1 号(左)和突变体 *tsll1* (右) 幼苗叶色表型

Fig. 1. The seedling leaf color of wild type(left) and *tsll1* (right) at different temperatures.

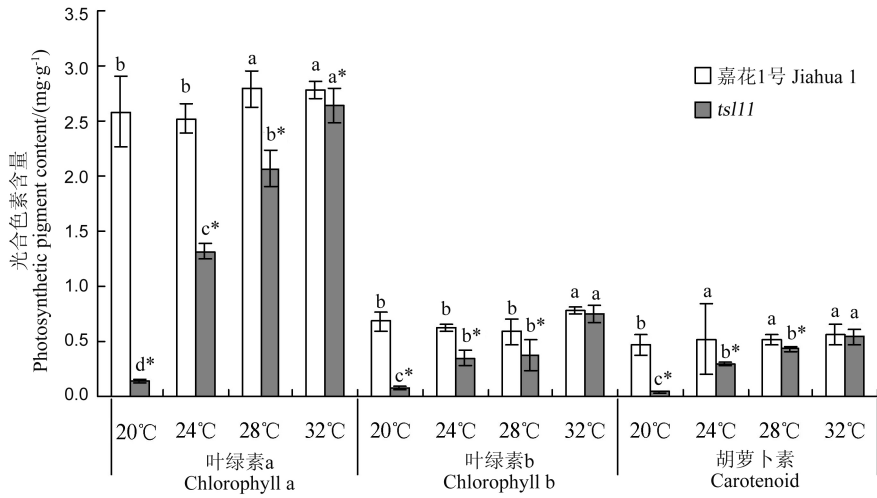
素含量变化与叶色表型变化一致,同样具有温敏感性。因此,我们推测该突变性状是由低温导致叶绿素合成受阻引起的。

2.3 突变体叶绿体超微结构

为了进一步了解突变体的特征,对 *tsll1* 和嘉花 1 号幼苗第 3 叶叶肉细胞结构进行透射电镜观察。结果显示,在 32℃ 下 *tsll1* 与嘉花 1 号无论是叶绿体数量、大小,还是类囊体片层结构均无明显区别(图 3-A,B);而在 20℃ 下,突变体 *tsll1* 与嘉花 1 号相比,*tsll1* 叶绿体发育严重不良,几乎看不到完整片层并垛叠整齐类囊体结构(图 3-C,D)。说明 *tsll1* 突变体叶绿体发育,与叶色和叶绿素含量一致,具有温敏感性。

2.4 突变体遗传分析

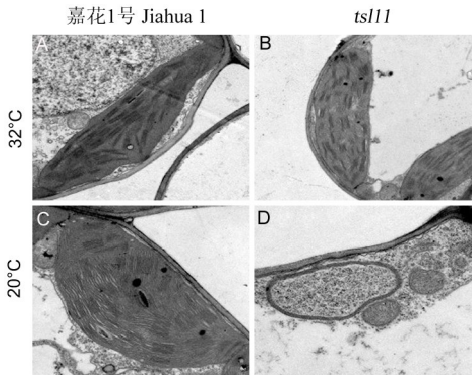
突变体 *tsll1* 与培矮 64S 正反交后代中,所有的 F<sub>1</sub> 个体都表现为正常表型,说明突变性状为隐性核



同一品种不同温度之间标相同字母表示无显著差异；\* 表示同一温度下不同品种之间差异显著 ( $P<0.05$ )。  
For a cultivar, the same letters above the bars show no significant difference; \* At a same temperature, show significant difference ( $P<0.05$ ).

图 2 4 种温度下野生型嘉花 1 号与突变体 *ts111* 幼苗叶片光合色素含量的比较 (平均值±标准差)

Fig. 2. Comparison of photosynthetic pigment contents between *ts111* and its wild-type Jiahua 1 under four temperatures during the seedling stage (Mean±SD).



A,C—野生型; B,D—突变型。  
A and C, Wild type; B and D, Mutant type.

图 3 不同温度下野生型嘉花 1 号和突变体 *ts111* 的叶绿体超微结构

Fig. 3. Chloroplast ultra-structure of wild type (left) and *ts111* mutant (right) at different temperatures.

基因突变。随机调查了培矮 64S/*ts111* 杂交组合的  $F_2$  代群体中 479 株幼苗,发现野生型 371 株,突变型 108 株,经  $\chi^2$  测验,其分离比例符合 3 : 1 ( $\chi^2=1.41<\chi^2_{0.05}=3.84$ )。说明该温敏感突变性状由一对隐性核基因控制,暂将该基因命名为 *ts111*。

2.5 幼苗叶色温敏感突变体的基因定位

通过对本实验室保存 SSR 和 InDel 分子标记进行多态性检测,发现有 49 对引物在突变体和培矮

64S 两个亲本间表现出多态性。利用这些多态性引物对培矮 64S 与 *ts111* 杂交后代的 22 株  $F_2$  代突变株进行初步连锁分析,发现突变基因 *ts111* 与第 11 染色体上的分子标记 RM536 连锁,接着扩大定位群体至 200 株,将 *ts111* 基因初定位于第 11 染色体分子标记 ID11974 与 MM1431 之间,距 ID11974 和 MM1431 分别为 1.5 cM 和 2.8 cM,然后进一步发展新的 InDel 分子标记(表 1)并扩大群体至 4928 株,最后将 *ts111* 基因定位于 ID14506 与 ID14653 之间(图 4)的 147 kb 的区间内,跨越 3 个 BAC,并发现两个共分离分子标记(ID14508 和 ID14541)。

3 讨论

叶色突变体是比较常见一类水稻突变体。本研究中叶色突变体 *ts111* 是一种幼苗低温敏感叶色体,在低于 24℃ 的条件下,5 叶期前其幼苗呈黄色,叶绿体发育严重不良,具有明显的低温敏感性。目前,在已报道的众多水稻叶色突变体中,与本研究叶色表型类似的低温敏感叶色突变体有 3 个, *mr20*<sup>[23]</sup>、*mr21*<sup>[24]</sup> 和 *v2*<sup>[19]</sup>,其在低温条件下幼苗叶色呈黄色,高温正常绿色,但其突变基因所在染色体与 *ts111* 不同,均不在第 11 染色体上。另外,与 *ts111* 处于同一染色体上的叶色突变基因有 9 个,包括 2 个斑点型突变体 *z1* 和 *z2*<sup>[25]</sup> 以及 5 个白化转绿突变体 *sgra*<sup>[26]</sup>、*tsc-11*<sup>[27]</sup>、*gwgl*<sup>[28]</sup>、*v4*<sup>[29]</sup> 和 *v9*<sup>[30]</sup>,以及 2

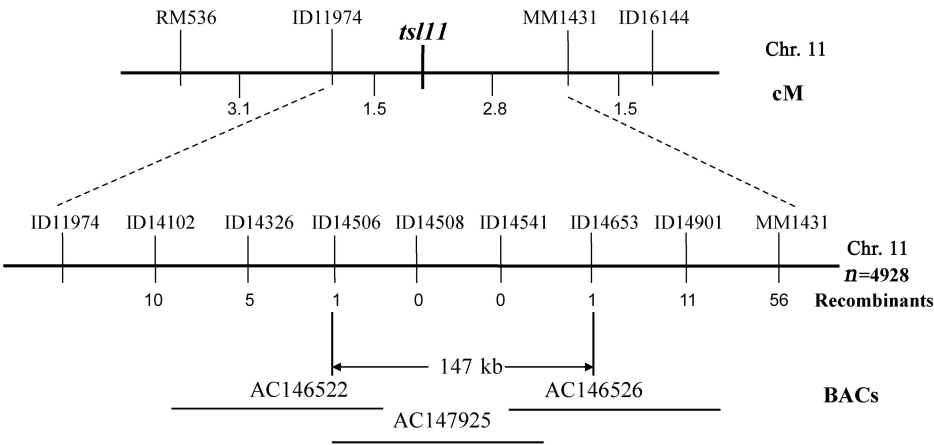


图 4 幼苗叶色温敏感突变基因 *tsll1* 的连锁图谱和基因定位

Fig. 4. Linkage map and gene mapping of gene *tsll1*.

表 1 本研究开发的多态性分子标记

Table 1. Developed polymorphic markers in this study.

标记	引物序列(5'-3')	引物位置
Marker	Sequence of primers (5'-3')	Location of primers
ID11974	TTGGTTTGGGGTGAACGGTCCGCACCGACATTTTGCTAGTT	AC135558
ID14102	AAGACACCGACTGCATGCATGGCTTGTCTTCTCCTCCTCCGTA	AC146523
ID14326	CAATAAGTAGGCAACAGGGACAGTGCAAGCGACATGCAGACCTAAT	AC145808
ID14506	GTGAATAGATTCTGAAGGTAAGGTCGGTTTTGACTCTGAATTGTA	AC146522
ID14508	TAGTGGTTGCTTATGGGTGATTTTCAGTCAATCCTATCAAG	AC146522
ID14541	GGTCCTATTAAGATTGATGCTAATCCTCTTGTACAGCGGTG	AC147925
ID14653	AGACATATCTTCGCAGTTGGGCGAGATCTATTTTTTCTAAGGC	AC146526
ID14901	GCCTCTCCAAATACAAGCTGCAGAGCTTTGGTTGAGCCAAGC	AC145325
MM1431	CGCTTTCTTTGTCTCAAGTAAAAGCTTAGCTCGGCTCG	AC132003
ID16144	TCGTTTCTGATGGGGGGTTCGCTACTCAGAGTCCGCATTTCCCTGGTGTC	AC109646

个黄叶突变基因 *xnt*<sup>[31]</sup> 和 *yll1*<sup>[32]</sup>。其中, *xnt* 位于短臂上的 RM7283－ID9201 之间, *yll1* 定位在与 *tsll1* 相差约 0.6 Mb 的 MM2199 和 ID21039 之间。因此, 依据叶色表型和突变基因位置, 可以得出 *tsll1* 突变体是 1 个新的叶色突变体。

本研究利用从培矮 64S/*tsll1* 的后代分离出 4928 个突变型株作为定位群体, 将突变基因 *tsll1* 锁定在第 11 染色体上的 147 kb 区间内。通过生物信息学分析该区间跨越 3 个 BAC (AC146522, AC147925 和 AC146526) 包含 23 个预测基因, 尚未发现与叶绿素合成或叶绿体发育相关候选基因。推测 *tsll1* 基因是一个受温度调控的早期叶绿体发育相关新基因。因此, 进一步对 *tsll1* 克隆及功能研究将有助于加深我们对温度对水稻早期叶绿体发育调控反应分子机理的理解。

参考文献：

[1] 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. 中国水稻科学, 1995, 9(4): 149-250.

[2] 董文其, 董彦君, 石守璠, 等. 两用核不育水稻 7436S 的温敏感白苗标志性状的遗传及其育性研究. 作物品种资源, 1995 (1): 19-21.

[3] 章志兴, 徐开盛, 陈俊涛, 等. 叶色标记技术在杂交水稻种子生产中的应用. 种子科技, 2001, 19(1): 33-34.

[4] 邓晓娟, 张海清, 王悦, 等. 水稻叶色突变基因研究进展. 杂交水稻, 2012, 27(5): 9-14.

[5] 魏彦林, 施勇烽, 吴建利. 水稻核基因控制的叶色变异. 核农学报, 2011, 25(6): 1169-1178.

[6] 李贤勇, 王楚桃, 李顺武, 等. 一个水稻高叶绿素含量基因的发现. 西南农业学报, 2002, 15(4): 122-123.

[7] 钱前, 朱旭东, 曾大力, 等. 细胞质基因控制的新特异材料白绿苗的研究. 作物品种资源, 1996(4): 11-12.

[8] Awan M, Konzak D F, Rutger J N. Mutagenic effect of sodi-

- um azide in rice. *Crop Sci*, 1980, 20: 663-668.
- [9] 吴殿星, 舒庆尧, 夏英武, 等.  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线诱发的釉型温敏核不育水稻叶色突变系变异分析. 作物学报, 1999, 31(8): 1041-1046.
- [10] 舒庆尧, 刘贵付, 夏英武. 温敏水稻叶色突变体的研究. 核农学报, 1996, 10(1): 6-10.
- [11] Dong Y J, Dong W Q, Shi S Y, et al. Identification and genetic analysis of a thermo-sensitive seedling-colour mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Sci*, 2001, 51: 1-4.
- [12] 兰涛, 梁康迳, 陈志伟, 等. 水稻苗期低温失绿的遗传分析及基因定位. 遗传, 2007, 29(9): 1121-1125.
- [13] Xia J, Wang Y, Ma B, et al. Ultrastructure and gene mapping of the albino mutant *all2* in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Genet Sin*, 2006, 33(12): 1112-1119.
- [14] 李超, 林冬枝, 董彦君, 等. 一个水稻苗期温敏感白色条斑叶突变体的遗传分析及基因定位. 中国水稻科学, 2010, 24(3): 223-227.
- [15] Chen T, Zhang Y, Zhao L, et al. Physiological character and gene mapping in a new green-revertible albino mutant in rice. *J Gen Genom*, 2007, 34(4): 331-338.
- [16] Kusumi K, Sakata C, Nakamura T, et al. A plastid protein *NUS1* is essential for build-up of the genetic system for early chloroplast development under cold stress conditions. *Plant J*, 2011, 68(6): 1039-1050.
- [17] Sugimoto H, Kusumi K, Nomura K, et al. The rice nuclear gene, *VIRESCENT2*, is essential for chloroplast development and encodes a novel type of guanylate kinase targeted to plastids and mitochondria. *Plant J*, 2007, 52: 512-527.
- [18] 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. *Plant Physiol*, 2009, 150(1): 388.
- [19] Liu W, Fu Y, Hu G, et al. Identification and fine mapping of a thermo-sensitive chlorophyll deficient mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 2007, 226(3): 785-795.
- [20] 沈伟其. 测定水稻叶片叶绿素含量的混合液提取法. 植物生理学通讯, 1998, 3: 62-64.
- [21] Muray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [22] 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.
- [23] 祁鲁, 刘晓, 陈佳颖, 等. 一个新的水稻温敏感叶色突变体基因定位分析. 核农学报, 2010, 24(2): 220-224.
- [24] 陈佳颖, 赵剑, 刘晓, 等. 一个新水稻温敏感叶色突变体的遗传分析及其基因分子定位. 植物学报, 2010, 45(4): 419-425.
- [25] Parks B M, Quail P H. Phytochrome-deficient *hy1* and *hy2* long hypocotyl mutants of *Arabidopsis* are defective in phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant Cell*, 1991, 3: 1177-1186.
- [26] 张向前, 李晓燕, 朱海涛, 等. 水稻阶段性返白突变体的鉴定和候选基因分析. 科学通报, 2010, 55: 2296-2301.
- [27] Dong Y J, Dong W Q, Shi S Y, et al. Identification and genetic analysis of a thermo-sensitive seedling-colour mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Sci*, 2001, 51: 1-4.
- [28] 李育红, 王宝和, 戴正元, 等. 一个水稻新型叶色突变体的形态结构与遗传定位. 中国水稻科学, 2011, 25(6): 587-593.
- [29] Sallaud C, Gay C, Larmande P. High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice; A first step towards in silico reverse genetics. *Plant J*, 2004, 39: 450-464.
- [30] Kim S R, Lee J, Jun S H. Transgene structures in T-DNA inserted rice plants. *Plant Mol Biol*, 2003, 52: 761-773.
- [31] Chi X F, Zhou X S, Shu Q Y. Fine mapping of a xantha mutation in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 2010, 172: 215-220.
- [32] 刘朝辉, 李小艳, 张建辉, 等. 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. 遗传, 2012, 34(2): 223-229.