

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.00023

一个控制水稻叶色白化转绿及多分蘖矮秆性状基因 *hw-1(t)* 的鉴定

郭涛** 黄宣** 黄永相 刘永柱 张建国 陈志强* 王慧*

华南农业大学 / 国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东广州 510642

摘要: 通过空间诱变从光身稻品种 Francis 的 M₂ 群体中发现 1 株叶色白化转绿、多分蘖矮秆突变体 *hfa-1*。*hfa-1* 在三叶期之前完全白化, 随后转绿。白化转绿表型受生长发育和温度调控。亚细胞结构观察发现 *hfa-1* 叶绿体发育异常抑制叶绿素合成, 造成光合效率降低, 产生白化表型。*hfa-1* 的多分蘖表型是由于高节位分蘖芽激活所致, 初步鉴定与苗期叶片 IAA (吲哚乙酸) 含量无关。*hfa-1* 的矮生性则由节间长度缩短所致, 与苗期 GA (赤霉素) 的合成和信号传导无关。遗传分析表明 *hfa-1* 的白化转绿、多分蘖矮秆表型受单隐性核基因 *hw-1(t)* 控制。利用 *hfa-1* 与粳稻品种 02428 杂交获得的 F₂ 群体将 *hw-1(t)* 定位在水稻第 4 染色体长臂上两个 InDel 标记 HW27 和 HW7 间 46.9 kb 的物理距离内, 该区域有 13 个阅读框架, 其中 LOC_Os04g57320 编码 IMMUTANTS 蛋白, 推测为 *hw-1(t)* 的候选基因。

关键词: 水稻; 白化转绿; 多分蘖矮秆; *hw-1(t)*; 精细定位

Characterizations of a Mutant Gene *hw-1(t)* for Green-revertible Albino, High Tillering and Dwarf in Rice (*Oryza sativa* L.)

GUO Tao **, HUANG Xuan **, HUANG Yong-Xiang, LIU Yong-Zhu, ZHANG Jian-Guo, CHEN Zhi-Qiang *, and WANG Hui *

South China Agricultural University / National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, Guangzhou 510642, China

Abstract: A rice (*Oryza sativa* L.) mutant *hfa-1* exhibiting green-revertible albino, high-tillering dwarf was detected from a M₂ population of an American variety Francis by space mutagenesis. *hfa-1* displayed distinctive albino before 3rd leaf stage but finally turned to normal green after 3rd leaf stage, and the expression of this phenotype was conditionally controlled by development and temperature. Examining ultrastructure and measuring chlorophyll content indicated that *hfa-1* showed albino due to abnormal development of chloroplast, which resulted in inhibiting chlorophyll synthesis and decreasing photosynthetic efficiency. Moreover, the increased tiller number of *hfa-1* was ascribed to initiate more higher-order tiller buds. Further endogenous hormones analysis demonstrated that the enhanced tillering capacity of *hfa-1* might not result from inhibiting the synthesis of IAA. In addition, the dwarfism of *hfa-1* was caused by shortening internodes and was independent of biosynthesis and signal transduction of GA. Genetic analysis indicated that the phenotype of green-revertible albino, high-tillering dwarf in *hfa-1* was controlled by a recessive nucleic gene, namely *hw-1(t)*. Using a large F₂ mapping population derived from a cross between *hfa-1* and a japonica rice variety, 02428, *hw-1(t)* was fine mapped into a 46.9 kb of physical distance between two InDel markers, HW27 and HW7 on chromosome 4, where 13 open reading frames were predicted. In the mapping interval LOC_Os04g57320 encoded a IMMUTANTS protein, which was the most properly candidate gene of *hw-1(t)*.

Keywords: Rice (*Oryza sativa* L.); Green-revertible albino; High-tillering dwarf; *hw-1(t)*; Fine mapping

叶色突变是高等植物中常见的现象, 多在苗期表达, 易于识别, 因此苗期叶色常作为叶色突变体的分类标准。水稻苗期叶色突变体的表型多种多样,

主要分为白化(albino)、黄化(xanthan)、浅绿(virids)、条纹(striata)、斑点(trgrina) 5 大类型^[1]。由于叶色突变多数与叶绿素的代谢相关, 根据突变体的生理机

本研究由国家自然科学基金项目(30771313)和国家科技支撑计划项目(2008BAD97B02)资助。

* 通讯作者(Corresponding authors): 王慧, E-mail: wanghui@scau.edu.cn; 陈志强, E-mail: chenlin@scau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: guo.tao@vip.163.com, Tel: 020-38604903 ** 同等贡献(Contributed equally to the work)

Received(收稿日期): 2011-05-04; Accepted(接受日期): 2011-09-12; Published online(网络出版日期): 2011-11-07.

URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20111107.1048.013.html

理,也可分为总叶绿素增加型、缺总叶绿素型、缺叶绿素 a 型和缺叶绿素 b 型^[2]。此外,还可根据温度对叶色的影响分类,例如吴殿星等^[3]将白化叶色突变体分为高温表达型、低温表达型和温钝型。

叶色突变通常影响植株的光合效率,造成作物减产,过去常被认为是无意义的突变。近年来,叶色突变的应用价值被重新认识,并受到越来越多的关注。在育种工作中,叶色变异可作为标记性状,简化杂交种子生产程序^[4];某些叶色突变体具有特殊的优良性状,为作物遗传育种提供优异的种质资源^[5]。在基础理论研究中,叶色突变体是植物光合作用^[6]、光形态建成^[7]以及抗病机制^[8]等一系列代谢过程的理想实验材料。

叶色突变可直接或间接影响植物激素的合成,改变内源激素的含量,并导致突变体表型异常。如缺乏 GA(赤霉素)的拟南芥白化突变体 *dxr* 表现为植株矮化^[9]。测定叶色突变体内源激素含量,不但可增加对激素合成途径的了解^[10],还有利于激素生物合成相关基因的克隆。水稻 *Osabal* 突变体叶色灰绿,受干旱胁迫时体内 ABA(脱落酸)含量增加, Agrawal 等^[11]通过正向遗传学方法从中分离到参与 ABA 生物合成的基因 *OsTATC*。因此,叶色突变体也是激素生理研究的有用材料。

植物叶色突变的分子机理较为复杂,对其发生机制的推测主要有以下几种观点:(1)叶绿素合成和降解途径中相关基因的突变^[12-13];(2)血红素光敏色素生色团生物途径中基因突变^[14];(3)编码叶绿体蛋白的基因突变^[15];(4)与光合系统无直接关系基因突变^[16]。目前高等植物的叶色突变机理研究多见于拟南芥,而水稻则明显滞后。已报道的水稻苗期叶色突变基因超过 80 个,其中大多数受隐性核基因控制,30 多个已进行了染色体定位,仅有少数几个被克隆 (<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp>)。显然,水稻叶色突变机理的研究仍有待深入开展。

白化转绿是叶色白化突变的一个特例,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。已报道的白化转绿突变体超过 10 个^[17-28]。尽管白化转绿突变体的叶色表型不尽相同,但转绿后多数农艺性状与野生型相似。本课题组通过空间诱变获得一株白化转绿突变体 *hfa-1*,它与以往报道的不同,除了白化转绿表型外,还伴随多分蘖矮秆等农艺性状的变化。本研究拟通过农艺和生理性状调

查、亚细胞结构观察以及基因定位研究白化转绿突变体 *hfa-1*,为水稻白化转绿机制提供部分理论依据。

1 材料与方法

1.1 水稻材料

2003 年利用返回式卫星搭载美国光身稻品种 Francis 干种子于太空飞行 18 d (卫星倾斜角度 63°,近地距离和高地距离分别为 175 km 和 320 km,辐射剂量为 2.656 mGy)。将空间诱变种子与对照一起萌发,移植 M₁ 代单株,成熟时收获单株主穗,混合主穗种子得到 M₂ 代种子。移植 M₂ 代单株,常规田间管理,在 M₂ 群体中发现一株白化转绿、多分蘖矮秆突变体。经过连续 4 代的自交繁殖获得稳定突变株系,命名为 *hfa-1*。将 *hfa-1* 分别与 Francis 和 02428 杂交获得 2 个 F₂ 群体用于遗传分析。其中 *hfa-1* × 02428 F₂ 群体同时用于突变基因的精细定位,包含 3 317 个单株。

1.2 外源赤霉素处理

采用微滴法分析外源赤霉素处理对苗高的影响^[29]。取突变体 *hfa-1* 和亲本 Francis 种子各 30 粒,用 3% NaClO 溶液浸泡消毒 30 min,蒸馏水冲洗 3 次,30℃培养 2 d。将萌发种子置 1%琼脂培养基上,30℃光照培养。在水稻幼苗第 2 片叶鞘长出 2 d 后,用含 10 g L⁻¹ GA₃ 的乙醇溶液处理胚芽鞘,3 d 后测量第 2 片叶鞘长度,求平均值和标准差。对照以 ddH₂O 代替 GA₃ 处理胚芽鞘,其余操作同上。

1.3 α-淀粉酶活性测定

采用碘熏蒸法测定 α-淀粉酶活性^[30]。

制配 0.2%马铃薯淀粉和 2%琼脂溶液,含 10 mmol L⁻¹ 的 NaAc 和 2 mmol L⁻¹ 的 CaCl₂, pH 5.3。高压灭菌,冷却到 50℃以下,加入适量氨苄青霉素,加入 GA₃ 使浓度为 1 μmol L⁻¹ (对照不加 GA₃),制备琼脂平板。种子去壳,用 30%的 NaClO 表面灭菌 30 min,再用蒸馏水清洗 6 次。将种子切成两半,无胚的一半垂直放在凝固的琼脂平板上,用封口膜密封培养皿,30℃黑暗条件下培养 4 d。用 I₂ 蒸汽熏蒸使培养皿中的琼脂平板染色,有淀粉酶分泌的半粒种子周围由于淀粉的降解而呈现无色透明,没有淀粉酶分泌的则转变为蓝紫色。

1.4 IAA 和 GA 的提取及含量测定

根据 Dobrev 的 HPLC 法^[31]稍加修改提取和测定植物激素 IAA (吲哚乙酸)和 GA。分别从 3 株六叶期

幼苗取等量新鲜叶片, 加液氮研磨, 按 10 mL g⁻¹ 加入预冷(-20℃)酒精/水混合液(5/1, V/V), -4℃过夜萃取。8 000×g 离心 15 min 使固液相分离, 重新萃取不溶性残渣 12 h。将 2 次萃取的上清液混合, 真空旋转干燥至第二相。加入等体积石油醚, 过滤 15 min 除去油脂和部分植物色素; 重复抽提两次, 弃石油醚相。用等体积的乙酸乙酯萃取水相 2 次, 弃水相, 真空干燥有机相。残留物溶于 5 mL 100% 蚁酸, 以多微孔膜(0.45 μm)过滤。每个样本取 20 μL 注入 HPLC 仪(LC-20AT, Shimadzu, 日本), 流速 1 mL min⁻¹, 以 UV 检测探头在波长 254 nm 下连续监控 20 min。流动相由甲醇/水/乙酸(45/54.4/0.6, V/V/V)组成。分别将 IAA 和 GA₃ 溶于甲醇/水(4/1, V/V)配成标准液(2 mg mL⁻¹), 并稀释成 5 个不同数量级浓度。

1.5 突变体对温度的敏感性

采用相同光强度、光周期和不同温度(15℃、20℃、25℃、30℃、35℃)在人工气候箱(RXZ-280B, 江南, 中国)中培养突变体和亲本, 观察第 1~4 叶片颜色变化。

1.6 净光合率和叶绿素含量测定

在 LED 光源下采用便携式光合测定仪(Li-6400, Lincoln, 美国)于苗期和拔节期测定突变体和亲本上二叶的净光合率, 检测时间为上午 8:30~10:00。其后分别从每个处理取 3 株材料的新鲜叶片, 等量混合(0.1~0.5 g), 用 95% 丙酮抽提 48 h。采用分光光度计分别测定抽提液在波长 645 nm 和 663 nm 下的 OD 值。利用 Arnon 等^[61]的方法计算总叶绿素、叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量, 每个处理重复 3 次。

1.7 叶绿体超微结构观察

将水稻幼苗不同时期的叶片切成小块(3 mm × 1 mm), 用 4% 戊二醛溶液固定(含 0.1 mol L⁻¹ pH 7.3 磷酸缓冲液和 1% 锇酸)。再以不同浓度乙醇溶液脱水, 环氧树脂 812 包埋, 超微切片机(UCT, Leica, 德国)切片, 电子显微镜(Tecnai12, FEI, 荷兰)下观察叶绿体超微结构并照相。

1.8 DNA 提取及 PCR 检测

采用 CTAB 法^[32]提取水稻基因组 DNA。PCR 扩增体系含 2×PCR Reaction Mix 10 μL (含 100 mmol L⁻¹ KCl, 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 3 mmol L⁻¹ MgCl₂, 400 mmol L⁻¹ dNTP), *Taq* DNA 聚合酶(5 U μL⁻¹) 0.2 μL, 引物(10 μmol L⁻¹)各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 超纯水补至 20 μL。反应条件为 94℃ 预变性

5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min。扩增产物经 8.0% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(电泳缓冲液 1×TBE, 电压 75 V, 时间 2.5 h), 0.1% AgNO₃ 染色, BIORAD 凝胶成像系统观察、照相、读带。

1.9 SSR 标记来源及 InDel 标记的开发

选择已公布的 SSR 标记用于突变基因定位, 引物序列来自 <http://www.gramene.org/>。

按照 Shen 等^[33]的方法, 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上对粳稻日本晴和籼稻 93-11 已公布的核苷酸序列进行 BLAST 对比, 在已定位区间内寻找插入缺失 5~20 bp 的序列, 根据其上下游序列设计 InDel 标记引物。

1.10 连锁分析

采用 Michelmore 等^[34]提出的近等基因池分析法筛选突变基因连锁标记。在 F₂ 群体中随机挑选 10 个突变表型植株和 10 个正常表型植株, 分别取等量 DNA 混合, 构建两个基因池。通过引物筛选寻找基因池间扩增有差异的标记, 再用分离后代单株验证该多态性标记是否真正与目标基因连锁。利用 MAPMAKER 作图软件构建目标基因区域的连锁图谱。通过 Gramene 网站(<http://www.gramene.org/>)查找与突变基因紧密连锁标记在水稻基因组(日本晴)上的位置, 构建覆盖目的基因的物理图谱。用禾本科基因组自动注释系统(<http://www.gramene.org/>)预测候选区域的基因组序列可能的编码区(ORF)。

2 结果与分析

2.1 *hfa-1* 叶色受生长发育和温度调控

三叶期之前, 突变体 *hfa-1* 的第 1 和第 2 片叶为白色, 随后逐渐转绿(图 1-A~D), 三叶期之后, 叶片由叶基到顶端, 叶脉至叶缘完全转绿, 有时新分蘖叶片也为白色, 但很快转绿。相反, 突变体亲本 Francis 叶片在不同生长发育时期均为绿色。人工控温条件下, 突变体亲本 Francis 叶色未受温度影响, 而 *hfa-1* 的白化转绿表型则受温度调控(图 1-E~H), 当温度为 25~30℃ 时, 叶片完全白化, 温度介于 15~20℃ 时, 叶片为黄白色。显然, *hfa-1* 的叶片颜色同时受植株的生长发育和外界的温度调控。

2.2 叶绿素缺失导致 *hfa-1* 叶片白化

为进一步研究突变体的白化转绿表型, 分别于水稻二叶期(白化期)和拔节期(转绿期)测定突变体和亲本叶片的叶绿素含量和净光合速率(表 1)。结果

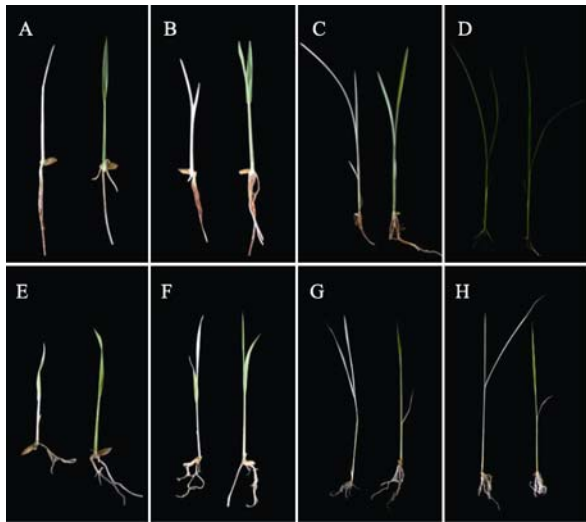


图 1 苗期突变体 *hfa-1* 与亲本 Francis 的表型
Fig. 1 Phenotypes of the mutant *hfa-1* and the wild type Francis at seedling stage

A~D: 第 1~4 叶期突变体和亲本表型; E~H: 不同温度(15°C、20°C、25°C、30°C)下突变体和亲本的表型。左边为 *hfa-1*, 右边为 Francis。

A~D: Phenotypes of the mutant and the wild type at the 1st~4th leaf stages; E~H: Phenotypes of the mutant and the wild type under different temperatures (15°C, 20°C, 25°C, 30°C). Left: *hfa-1*; Right: Francis.

表明, 二叶期突变体的叶绿素含量和净光合速率明显不同于突变体亲本。突变体叶绿素 a、叶绿素 b

和总叶绿素含量分别只有亲本的 3.57%、1.41%和 3.05%, 而叶绿素 a/叶绿素 b 比值(6.56)显著高于突变体亲本。与叶绿素含量减少相对应, 苗期突变体净光合速率比亲本减少 35.3%。突变体叶片转绿后, 两者的叶绿素含量和净光合速率并没有显著差异, 表明突变体的叶绿素含量和净光合速率已经到达正常水平。上述结果揭示突变体白化是叶绿素缺失的一种表型。

2.3 *hfa-1* 叶绿体结构异常

利用电子显微镜观察不同时期 *hfa-1* 和突变体亲本叶片细胞的超微结构。结果表明, 白化期突变体叶片细胞超微结构与亲本明显不同。不同发育时期亲本的叶绿体均正常发育, 含有大量的叶绿体基粒、淀粉粒和整齐排列的类囊体薄片(图 2-A)。突变体白化期叶绿体的多数细胞质和细胞器分散到细胞壁周围, 整个细胞严重降解, 形成大空隙(图 2-B); 质体数量少且体积小, 除内外膜, 其他部位缺失叶绿体基粒和类囊体薄片(图 2-C, D)。转绿期突变体部分质体迅速生长, 叶绿体基粒和类囊体薄片数量快速增长; 完全转绿后, 突变体叶绿体发育恢复正常, 叶绿体变为椭圆形且类囊体膜逐渐增加并按顺序排列(图 2-E, F)。上述结果揭示突变体质体发育不良导致叶绿体结构异常, 最终影响叶绿素合成。

表 1 突变体 *hfa-1* 与亲本的叶绿素含量和净光合速率
Table 1 Content of chlorophyll and the photosynthetic rate of the mutant *hfa-1* and the wild type ($\bar{x} \pm SE$)

生长期 Developmental stage	材料 Material	叶绿素 a Chl-a (mg g ⁻¹)	叶绿素 b Chl-b (mg g ⁻¹)	叶绿素 a + b Chl-a + Chl-b (mg g ⁻¹)	叶绿素 a/b Chl-a/b	净光合率 Net photosynthetic rate ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
二叶期 2nd leaf stage	<i>hfa-1</i>	0.08±0.00*	0.01±0.01**	0.09±0.01**	6.56±1.99*	6.92±0.82**
	Francis	2.24±0.14	0.71±0.05	2.95±0.20	3.14±0.04	10.70±0.15
拔节期 Jointing stage	<i>hfa-1</i>	2.18±0.11	0.71±0.03	2.89±0.14	3.05±0.03	13.08±0.67
	Francis	2.30±0.12	0.79±0.04	3.09±0.16	2.92±0.08	14.11±0.86

** 表示极显著差异(1%); * 表示显著差异(5%)。

** Significant difference at the 1% levels; * significant difference at the 5% levels.

2.4 *hfa-1* 表现多分蘖矮秆

hfa-1 叶片转绿后比亲本提前进入分蘖期, 并出现多分蘖表型。田间种植的突变体平均分蘖数为 41.4, 比亲本平均分蘖(7.8)增加 4.31 倍(图 3 和表 2)。移栽后 8.7 d, *hfa-1* 主茎第一节开始长分蘖芽, 而亲本则迟至移栽后 19.2 d。另外突变体的分蘖天数比亲本延长 48.9% (40.5±1.0 vs 27.2±1.6)。亲本分蘖主要发生在第 2 到第 7 节, 分蘖芽集中在上面 3 节, 而突变体的分蘖芽却一直长到第 8 节。此外, 突变体主要由 2 次和 3 次分蘖组成, 而亲本则完全由 1 次

和 2 次分蘖组成。上述结果表明突变体的分蘖生长模式发生了改变。

除多分蘖外, *hfa-1* 同时伴随植株矮化(图 4-A)。与亲本(93.28 cm ± 1.17 cm)相比, 抽穗期 *hfa-1* 株高(67.88 cm ± 0.38 cm)减少 27.2%。为鉴定 *hfa-1* 的节间伸长模型, 分别测量突变体和亲本的地上部节间及穗长度。结果表明, *hfa-1* 的穗和所有节间长度均比突变体亲本缩短, 其中底部 3 个节间最为明显。从上到下突变体的穗和节间长度分别减少 31.02%、33.89%、37.55%、59.51%、50.25%和 50.83% (图 4-B,

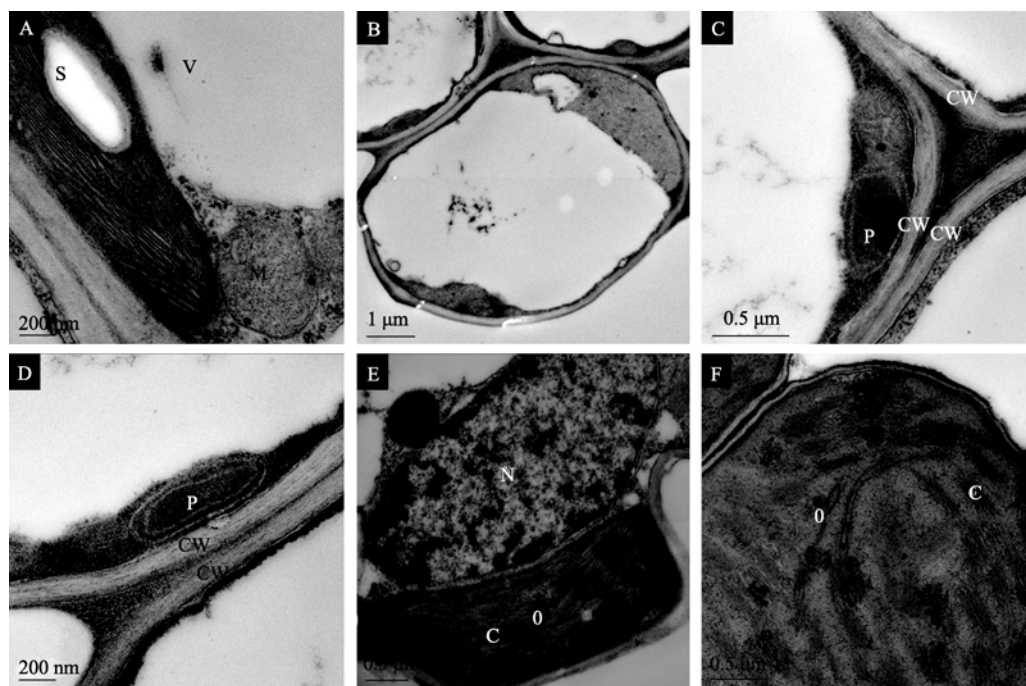


图 2 突变体 *hfa-1* 与亲本的透射电子显微镜分析

Fig. 2 TEM analysis of the wild-type and the *hfa-1* mutants

A: 突变体亲本的叶肉细胞和叶绿体; B: 二叶期突变体的叶肉细胞; C: 二叶期突变体的初期质体; D: 二叶期突变体的纺锤状质体; E: 三叶期突变体的叶绿体; F: 突变体转绿后的叶绿体。C: 叶绿体; CW: 细胞壁; G: 叶绿体基粒; M: 线粒体; N: 核仁; O: 嗜锇球; P: 质体; S: 淀粉粒; V: 泡囊。

A: Mesophyll cells and chloroplasts of the wild-type; B: Mesophyll cells of the mutant at the 2nd leaf stage; C: Initial developing plastid of the mutant at the 2nd leaf stage; D: Fusiform plastid of the mutant at the 2nd leaf stage; E: Chloroplasts of the mutant at the 3rd leaf stage. F: Chloroplasts of the mutant after turning into green. C: chloroplast; CW: cell wall; G: grana; M: mitochondrion; N: nucleolus; O: osmiophilic globule; P: plastid; S: starch particle; V: vesicle.

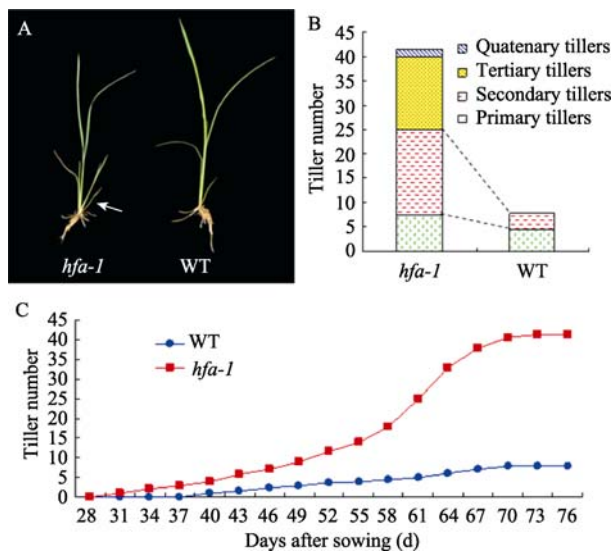


图 3 *hfa-1* 的多分蘖特性

Fig. 3 High tillering capacity of *hfa-1*

A: 箭头所指为 *hfa-1* 的第 1 个分蘖, 亲本此时尚未分蘖; B: *hfa-1* 与突变体亲本的分蘖数组成; C: *hfa-1* 和突变体亲本分蘖数的动态分析。

A: The first tiller of *hfa-1*. The arrow indicates the first tiller in *hfa-1*, which is absent in wild type (WT) at this stage. B: Tiller composition of *hfa-1* and WT. C: Dynamic analysis of tiller number between *hfa-1* and WT.

C)。根据 Takeda^[35] 制定的矮秆突变体划分标准, *hfa-1* 应属 dn 型矮秆突变体。

2.5 *hfa-1* 多分蘖表型与苗期叶片 IAA 含量无关

植物侧芽生长高度依赖于环境因子和激素信号传导的调节。IAA 对侧芽发育的生理过程起重要的调节作用。有研究表明 IAA 在顶端合成并向下通过极性运输抑制侧芽生长^[36]。禾本科作物生长同样受 IAA 诱导的顶端优势影响, 去除或削弱 IAA 活性可以解除顶端优势对分蘖芽生长的抑制^[37]。本研究测定苗期突变体和亲本 IAA 的含量。结果显示, 突变体 IAA 的含量分别为 $(3.80 \pm 0.55) \mu\text{g g}^{-1}$, 比突变体亲本 $(3.48 \mu\text{g g}^{-1} \pm 0.51 \mu\text{g g}^{-1})$ 略有增加, 但无显著差异(图 5)。表明突变体多分蘖表型与苗期叶片内源激素 IAA 含量无关。

2.6 *hfa-1* 的矮生性与 GA 的合成和信号传导无关

植株的矮化常常与赤霉素(gibberellin acid, GA) 等植物激素的生物合成或信号传导有关^[38-39]。为研究突变体矮生性与 GA 合成和信号传导间的关系,

表 2 *hfa-1* 与突变体亲本的分蘖特性
Table 2 Tillingering characteristics of *hfa-1* and the wild type ($\bar{x} \pm SE$)

材料 Material	Francis	<i>hfa-1</i>
总分蘖数 Total No. of tillers	7.8±0.5	41.1±2.0**
分蘖节 Tillingering node	II-VII	I-VIII
有效分蘖数 No. of effective tillers	6.4±0.3	37.0±2.0**
移栽后分蘖天数 Days of tillering after transplantation (d)	19.2±0.8	8.7±0.5**
分蘖持续天数 Days of tillering duration (d)	27.2±1.6	40.5±1.0**

**表示极显著差异(1%); *表示显著差异(5%)。

** Significant difference at 1% levels; * Significant difference at 5% levels.

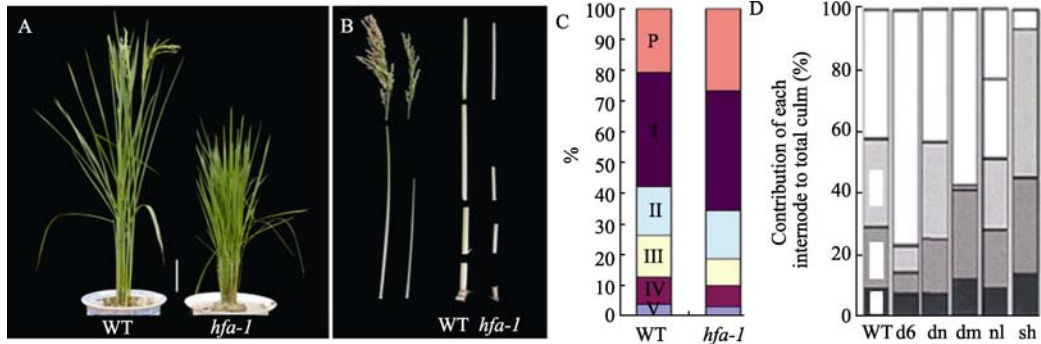


图 4 抽穗期突变体 *hfa-1* 和亲本的表现型

Fig. 4 Phenotypic analysis of the mutant *hfa-1* and the wild type

A: 抽穗期 *hfa-1* 与突变体亲本植株表现型, 标尺示 10 cm; B: *hfa-1* 与突变体亲本穗和节间形态; C: *hfa-1* 与突变体亲本穗和节间长度比例, P: 穗, I-V: 顶端到底部节间; D: 矮秆突变体节间伸长模型^[35]。

A: Phenotype of the mutant and wild-type (WT) at heading stage, bar 10 cm. B: Phenotypic exhibition of panicle and internodes of the mutant and the wild type. C: Comparison of the contribution of panicle and each internodes to the plant height in the mutant and the wild type; P: panicle, I-V: the respective internodes from top to bottom. D: Internodes elongation patterns of various rice dwarf mutants and wild type^[35].

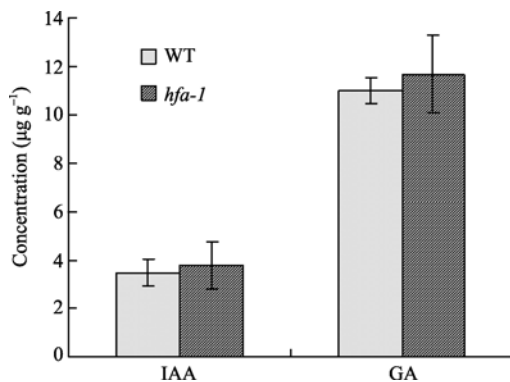


图 5 苗期突变体 *hfa-1* 和亲本内源激素(IAA, GA)的含量
Fig. 5 Endo-hormones (IAA, GA) contents of *hfa-1* and the wild type at seedling stage

本研究测定了突变体和亲本的内源 GA 含量及 α -淀粉酶活性, 并分析外源 GA_3 处理对第 2 片叶鞘的影响。结果表明, 苗期突变体和亲本内源 GA 含量分别为 $(11.00 \pm 1.02) \mu\text{g g}^{-1}$ 和 $(11.65 \pm 1.59) \mu\text{g g}^{-1}$, 两者并无显著差异(图 5)。与未施加外源 GA_3 相比, 外源 GA_3 处理下突变体和亲本间第 2 片叶鞘增加长度和长度比例均相近(表 3)。此外, 突变体和亲本在外源

GA_3 诱导下 α -淀粉酶活性相似(图 6)。上述结果揭示 *hfa-1* 属 Ebisu 型矮化突变体^[40], 表明 *hfa-1* 的矮生性与 GA 的合成和信号传导无关。

2.7 *hfa-1* 突变表型受隐性单基因控制

hfa-1 的 $M_1 \sim M_6$ 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。将突变体与表型正常的品种, 如野生型亲本 Francis 和 02428 杂交, F_1 植株的株高、分蘖数和叶色均与表型正常亲本相似。根据叶片颜色, 每个 F_2 群体的单株均可划分为两类, 其中一类表型正常, 另一类与突变体相似, 且分离比例符合 3:1(表 4)。 F_2 群体的白化植株均伴随多分蘖矮秆性状, 而叶色正常单株的分蘖数和株高均正常, 表明多分蘖矮秆和白化转绿属共分离性状。上述结果表明 *hfa-1* 的突变表型受一对隐性核基因控制, 暂命名为 *hw-1(t)*。

2.8 *hw-1(t)* 基因的定位

为定位白化转绿、多分蘖矮秆基因 *hw-1(t)*, 首先选择 408 个均匀分布于水稻染色体上的 SSR 标记, 逐个在白化、绿叶基因池间进行多态性分析, 然后

表 3 GA_3 处理对突变体 *hfa-1* 和亲本第 2 片叶鞘长度的影响
Table 3 The 2nd leaf sheath elongation of the mutant *hfa-1* and the wild type with GA_3 treatment

材料 Material	第 2 片叶鞘长度 Length of the 2nd leaf sheath (cm)		增加长度 Elongation length (cm)	比例(+GA/-GA) Ratio (+GA/-GA)
	-GA	+GA		
<i>hfa-1</i>	2.76±0.07	5.99±0.06	3.23±0.07	2.17±0.06
Francis	2.87±0.16	6.04±0.08	3.17±0.16	2.10±0.08

+GA₃ 表示添加 GA₃; -GA₃ 表示没有添加 GA₃。

+GA₃ means GA treatment; -GA₃ means without GA treatment.

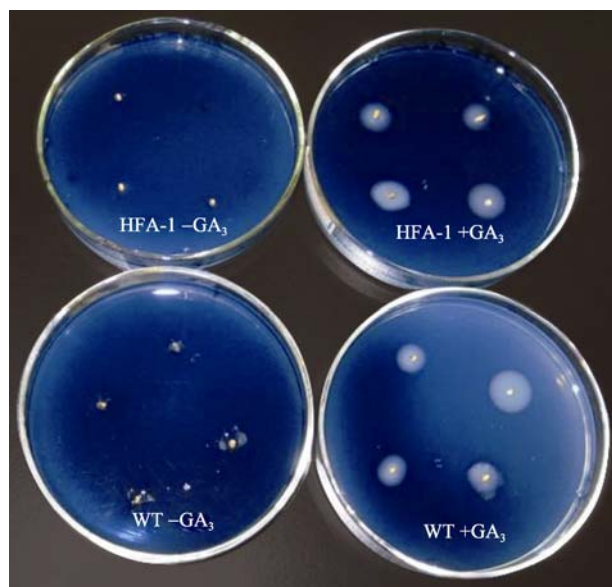


图 6 *hfa-1* 和亲本 α -淀粉酶诱导实验

Fig. 6 Plate assay of α -amylase induction on *hfa-1* and the wild type (WT)

+GA₃ 表示添加 GA₃; -GA₃ 表示没有添加 GA₃。

+GA₃ means GA treatment; -GA₃ means without GA treatment.

表 4 F₂ 群体白化和绿叶植株的分离

Table 4 Segregation of albino and green plants in F₂ populations

组合 Cross	F ₂ 群体 F ₂ population	正常表型 Normal type	突变表型 Mutant type	χ^2 (3:1)
<i>hfa-1</i> ×Francis	1223	943	280	2.78
Francis× <i>hfa-1</i>	598	467	131	2.89
<i>hfa-1</i> ×02428	1428	1089	339	0.72

利用在 2 个池间表现出多态的标记进一步检测 F₂ 群体, 确定是否与 *hw-1(t)* 存在连锁关系。结果第 4 号染色体上 35 个供试 SSR 标记有 2 个(RM17605 和 RM1113) 在基因池间表现多态性。进一步用 RM17605 和 RM1113 检测 126 个 F₂ 白化单株, 结果表明, *hw-1(t)* 与 RM17605 存在 15 个重组, 而与 RM1113 存在 6 个重组。*hw-1(t)* 被初步定位在 RM17605~RM1113 区域内(图 7)。

为精细定位 *hw-1(t)*, 将 F₂ 作图群体增加至 1 882

个白化单株并用标记 RM17605 和 RM1113 检测。结果在 *hw-1(t)* 与 RM17605 之间共检测到 56 个重组, 而 *hw-1(t)* 与 RM1113 之间存在 11 个重组。根据重组率计算其遗传距离, *hw-1(t)* 与 2 个标记间的距离分别为 1.55 cM 和 0.44 cM (图 7)。

为了进一步缩小 *hw-1(t)* 的定位区间, 根据粳稻品种日本晴和籼稻品种 9311 的基因组序列差异, 在 RM17605 和 RM1114 区间内开发 38 个 InDel 标记, 其中 7 个标记在 *hfa-1* 和 02428 间存在多态性(表 5)。连锁分析发现在 F₂ (*hfa-1*×02428) 群体中 HW2、HW21、HW15、HW3、HW27、HW7 与 *hw-1(t)* 间分别发生 42、30、24、22、9、7 和 2 重组事件, 而 HW36 与 *hw-1(t)* 间则出现零重组。根据重组结果, 最终将 *hw-1(t)* 定位在 HW27~HW7 区间内, 遗传距离分别为 0.186 cM 和 0.053 cM (图 7-C)。

2.9 *hw-1(t)* 定位区域物理图谱构建

从 Gramene 数据库(<http://www.gramene.org/>)下载 *hw-1(t)* 基因所在区域的克隆序列, 根据克隆之间的重叠关系将克隆首尾相连, 随后将 RM17605~RM1114 之间的多态性标记与克隆序列整合, 9 个与 *iga-1* 座位紧密连锁的多态性标记锚定在 AL606999、AL606646、AL606619 和 AL606652 四个克隆上(图 8), 其中与 *hw-1(t)* 两侧距离最近的标记 HW27 和 HW7 分别锚定在克隆 AL606619 的 29.2 kb 和 73.1 kb 处, 最终将 *hw-1(t)* 座位界定在 HW27 和 HW7 之间 46.9 kb 的物理距离内, 对应于日本晴第 4 染色体序列(5'-3') 33 902 708~33 949 569 bp 区间(<http://www.gramene.org/>)。

根据禾本科植物基因组自动注释系统(<http://www.gramene.org/>)预测该区域的基因组序列, 得到 13 个 ORF, 其中有 8 个假定的表达蛋白(expressed protein), 4 个功能未知的表达蛋白和 1 个假想蛋白(hypothetical protein)(表 6)。功能注释表明 LOC_Os04g57320 为假定的 IMMUTANTS 蛋白, *immutants* (*im*) 作为拟南芥的典型叶色突变体, 其显著特征为叶

表 5 与 *hw-1(t)* 基因连锁的 SSR 和 InDel 标记
Table 5 PCR-based SSR and InDel markers linked to *hw-1(t)* gene

标记 Marker	正向引物 Forward Primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')	起始位点 Start position (bp) ^a	扩增片段 Amplicon size (bp)
RM348	CATGAAGCTGTGTGCTGTTGC	CGCTACTAATAGCAGAGAGACCATCG	32650358	170
RM17595	GGGATCACGGAGCTCAAGTACC	GCTCCTCCCAAACCCAAATCC	33468481	171
RM17605	ATTAAGGGCCTGCTCTGTTCTGC	GTCCACTCCTCCTCATCATGC	33680591	194
HW2	TGTCAGCCATCGTCATCG	AGCCGTCAGTCAGCAAAGGTC	33692557	255
HW21	ATCCAAGCCTCCGCTCTG	AGGGCTCTTCTGCACTCTACTC	33777634	288
HW15	CTCCACCATTCAATTTCTAC	CGAGATGCCGTCGTTAGG	33866129	169
HW3	TGTCGCATGGTGAGATAGG	TGAAGGAGACGGGAAAGAT	33879892	299
HW27	AGCAACAGGCGTTAGTCT	TTCGTGGTCTCATAGGTT	33902519	189
HW36	ATGGTATGCTTTTCAGACGG	GAGACGAGAGTTATACTCCT	33923819	860
HW7	TCGTGCTCCTTCTCTTCATCG	GCTAACACCGAAAGAGGCAAAGC	33949569	289
RM1113	GTTCTTGGGTTGGTGAGCTTCC	TAGGGCGCATGTGTATTCTTCC	34085973	428
RM559	AGAGCGATGGGTGTCAGTTGC	CGTACGTACACTTGCCCTATGC	35151595	169

^a 对应的粳稻品种日本晴第 4 染色体的基因组位置。

^a The genomic position of chromosome 4 in rice cultivar Nipponbare.

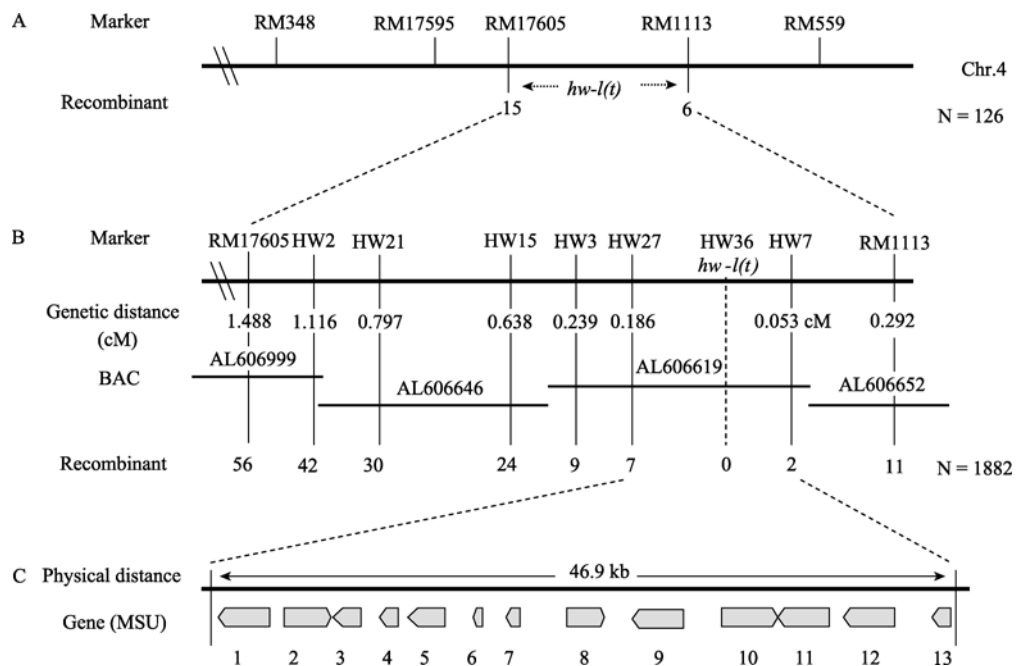


图 7 利用 F₂ 作图群体 (*hfa-1* × 02428) 定位 *hw-1(t)* 基因

Fig. 7 Mapping of the *hw-1(t)* gene using the F₂ population (*hfa-1* × 02428)

(A) *hw-1(t)* 被初步定位在第 4 染色体 SSR 标记 RM17605 和 RM1113 区间内; (B) *hw-1(t)* 被精细定位在第 4 染色体 InDel 标记 HW27 和 HW7 区间内; (C) 通过 GRAMENE 数据库预测 46.9 kb 区间内有 13 个候选基因(表 6)。

(A) *hw-1(t)* was mapped to the interval between SSR markers RM17605 and RM1113 in chromosome 4; (B) *hw-1(t)* was fine mapped to the interval between InDel markers HW27 and HW7 in chromosome 4; (C) In the 46.9 kb region, 13 putative genes were annotated in GRAMENE database (Table 6).

片斑驳, 即同一片叶出现白化和绿色表型。现已探明拟南芥 *im* 突变体的斑驳表型由单隐性基因控制, 且受光强和温度调节^[58]。拟南芥 *im* 基因突变除了影响叶片表型外, 还对植株的其他性状产生广泛的影响, 例如植株变矮, 根部延迟生长。考虑到 *hfa-1* 的突变表型

与拟南芥 *IM* 突变体存在诸多相似, 推测 LOC_Os04g57320 最有可能为 *hw-1(t)* 的候选基因。

3 讨论

叶绿素合成通路或叶绿体蛋白转移途径上的任

表 6 定位区间基因功能注释
Table 6 Gene annotated in mapping region

编号 No.	基因 Gene	特性 Description	位置 Location
1	LOC_Os04g57220	Ubiquitin-conjugating enzyme, putative, expressed	Chr. 4: 33,902,638-33,905,573
2	LOC_Os04g57230	Regulatory protein RecX family protein, putative, expressed	Chr. 4: 33,906,501-33,910,311
3	LOC_Os04g57240	Hypothetical protein	Chr. 4: 33,910,630-33,911,740
4	LOC_Os04g57250	Latency associated nuclear antigen, putative	Chr. 4: 33,913,726-33,914,352
5	LOC_Os04g57260	Expressed protein	Chr. 4: 33,915,428-33,917,365
6	LOC_Os04g57270	Expressed protein	Chr. 4: 33,919,573-33,919,779
7	LOC_Os04g57280	Expressed protein	Chr. 4: 33,921,534-33,922,056
8	LOC_Os04g57290	OsFBX153 - F-box domain containing protein, expressed	Chr. 4: 33,925,215-33,927,102
9	LOC_Os04g57300	Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein, putative, expressed	Chr. 4: 33,929,014-33,931,816
10	LOC_Os04g57310	Thiol-disulphide oxidoreductase DCC, putative, expressed	Chr. 4: 33,934,397-33,938,496
11	LOC_Os04g57320	Immutans protein, putative, expressed	Chr. 4: 33,937,718-33,940,830
12	LOC_Os04g57330	Expressed protein	Chr. 4: 33,942,870-33,946,059
13	LOC_Os04g57340	AP2 domain containing protein, expressed	Chr. 4: 33,948,761-33,949,333

何障碍均可能抑制叶绿素代谢, 而叶绿素代谢变化常导致叶片颜色改变。因此, 叶色突变体对深入分析叶绿素代谢相关基因的分子调节机制具有重要的作用^[41]。叶色突变体的来源十分广泛, 包括自发突变^[20]、人工诱发突变^[42]、插入突变^[43-44]和基因沉默突变^[45-46]。人工诱发植物基因突变是创造新种质、选育新品种的有效途径。已报道的叶色突变体多数通过化学诱变和辐射诱变获得。尽管目前鲜有关于空间环境诱发水稻叶色突变的系统研究。但空间诱变似乎不失为一种有效的突变途径^[47]。除了本研究发现的白化转绿突变体外, 我们还在其他空间诱变实验中获得系列叶色突变体, 包括紫叶、淡绿和黄化等。

hfa-1 白化期不仅叶绿素 a 和 b 的含量显著减少, 且叶绿体发育异常。由此推断 *hfa-1* 的白化表型并非来自单纯叶绿素合成途径中某一基因的突变, 而是叶绿体发育异常导致叶绿素合成受抑制所致。水稻的白化突变多与叶绿体发育异常相关。已知突变体 *qiufeng* 的白化转绿表型由基因 *gra(t)* 编码区产生 C-T 的替换所致, 该基因编码叶绿体蛋白合成延伸因子^[27]。Xia 等^[46]观察白化突变体 *all2* 的叶绿体超微结构发现, 叶绿体几乎不发育, 只出现小囊泡状结构。

尽管 *hfa-1* 与之前报道的白化转绿突变体^[17-28] 均表现为苗期白化, 随后叶色恢复正常, 但 *hfa-1* 的突变表型与它们存在诸多差异。首先, 苗期白化程度及转绿时期不同, *hfa-1* 在常温下苗期完全白化, 四叶期完全转绿, 而其他突变体要么叶片不完全白化, 要么转绿期与 *hfa-1* 不同。其次, 温度对白化表型产生的影响不同, *hfa-1* 白化表型受温度调控, 高

温下完全白化, 低温下黄化, 属高温表达型。相反, 已报道的白化转绿突变体 W25 为低温表达型^[17], 而 G9 则为温度钝感型^[23]。第三, 其他农艺性状不同, 已报道的白化转绿突变体的其他农艺性状多数不受影响, 而 *hfa-1* 除白化转绿外, 还伴随着多分蘖矮秆表型。遗传分析表明 *hfa-1* 的白化转绿和多分蘖矮秆表型表现为共分离现象。第四, 基因定位的结果不同。已定位的白化转绿基因 *gra(t)*^[27]、*gra-1*^[19]、*gra-2*^[20]、*G9*^[23] 分别位于水稻第 5、第 6、第 10、第 11 染色体, 与 *hw-1(t)* 并非位于同一染色体。此外, 在 *hw-1(t)* 的定位区间内, 也尚未有关于其他叶色基因定位和克隆的报道。第五, 功能预测表明编码 IMMUTANTS 蛋白的 LOC_Os04g57320 最有可能为 *hw-1(t)* 的候选基因, 尽管拟南芥中 *immutants* 突变体被广泛研究报道, 水稻上 *immutants* 突变体迄今尚未报道, 因此可确定 *hw-1(t)* 为新发现的水稻白化转绿基因。

独角金内酯(strigolactones)作为一类新的植物激素能抑制植物侧枝的形成^[48-49], 它与生长素协同控制植物的侧枝生长, 以维持植物的株型。由于该激素容易挥发, 测定难度特别大, 相关研究刚刚起步。但目前已初步探明植物中独角金内酯的前体是类胡萝卜素, 其合成需经过多个步骤^[50]。已报道的水稻多分蘖矮秆基因多数参与独角金内酯合成和信号传导。其中 *D17/HTD*、*D10*、*D27* 参与独角金内酯的合成, 而 *D14/HTD2/D88*、*D3* 基因则参与独角金内酯的信号传导^[51]。本研究初步探明 *hfa-1* 的多分蘖矮化表型与苗期 GA 和 IAA 含量无关, 推测可

能与独脚金内酯有关。这不仅是因为与已报道的多分蘖矮秆基因多参与独脚金内酯的合成与信号传导,更因为独脚金内酯的前体是类胡萝卜素。类胡萝卜素是一类重要的光吸收辅助色素,除了参与光能的捕获外,更重要的作用是通过清除光合作用产生的叶绿素三线态、单线态及超氧阴离子等自由基和猝灭叶绿素多余激发能,起到光保护作用^[52-53]。缺乏类胡萝卜素不仅影响独脚金内酯的合成,产生多分蘖矮秆表型,而且容易导致光合系统破坏,造成叶绿体发育不良,产生白化表型。考虑到 *hfa-1* 的白化表型总伴随着多分蘖矮秆表型,推断 *hw-1(t)* 基因可能参与类胡萝卜素合成。事实上定位区间内 ORF 功能预测结果也进一步支持 *hw-1(t)* 参与类胡萝卜素合成的推论。功能预测表明 *hw-1(t)* 定位区间内含有 1

个 *IMMUTANTS* 基因,已知拟南芥 *IM* 基因编码 1 个类似于线粒体交替氧化酶(AOX)的界面膜蛋白^[54-55],并作为光合系统氧化还原过程中电子传递的接受器行使末端氧化酶功能^[56],对质体的新陈代谢起关键作用^[57]。拟南芥中 *IM* 基因的突变导致苗期八氢番茄红素去饱和途径电子传递受阻,造成叶片中八氢番茄红素积累,而胡萝卜素含量锐减。尽管水稻上尚未有关于 *IM* 基因的研究报道,但拟南芥和番茄^[58]中 *IM* 基因的突变均导致叶片颜色及其他性状的变异,因此有理由相信水稻上 *IM* 的突变也会导致类似的表型变异。

结合前人对 *IMMUTANTS* 以及独脚金内酯的研究结果,我们推测 *hfa-1* 白化转绿和多分蘖矮秆的突变机制如下(图 8)。*hfa-1* 由于 *IM* 突变导致苗期光合

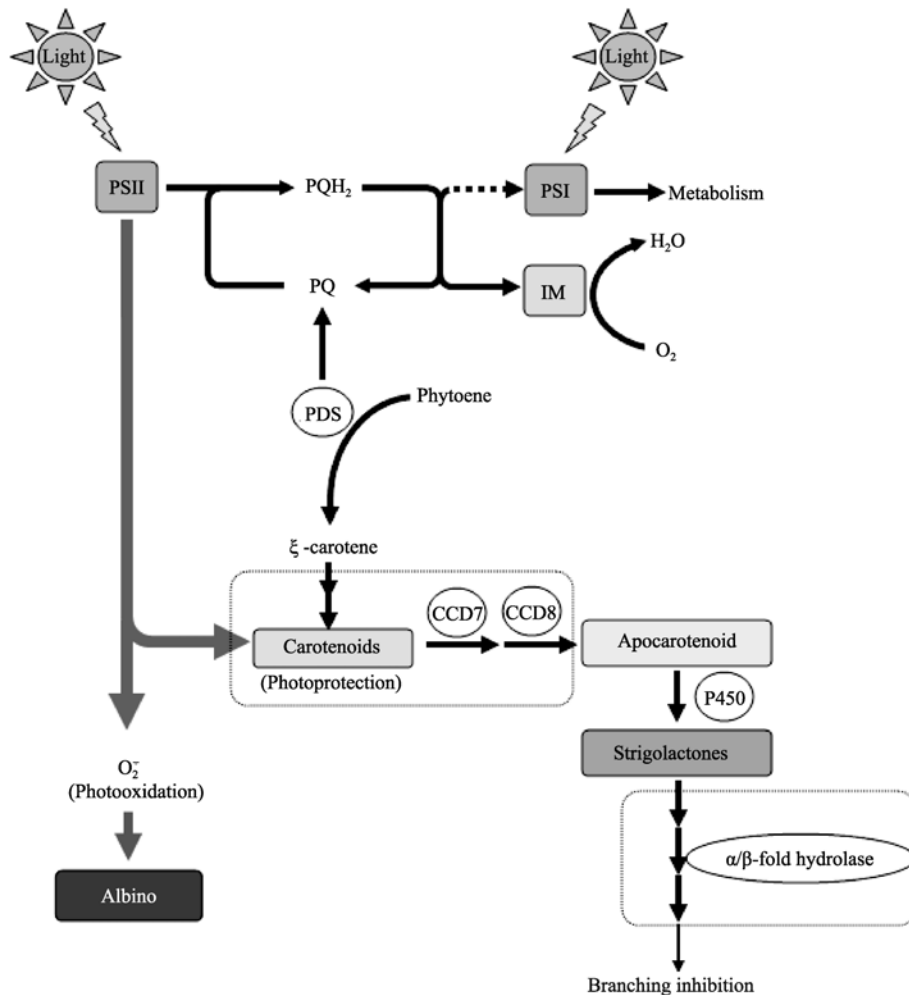


图 8 *hfa-1* 的白化转绿和多分蘖矮秆模型

Fig. 8 Model of green-revertible albino and high-tillering dwarf in *hfa-1*

PSII: 光合系统 II; PSI: 光合系统 I; PQ: 质体醌; PDS: 八氢番茄红素去饱和酶; CCD: 类胡萝卜素裂解双加氧酶;

P450: 细胞色素 P450。

PSII: photosystem II; PSI: photosystem I; PQ: plastoquinone; PDS: phytoene desaturase; CCD: carotenoid cleavage dioxygenases; P450: cytochrome P450.

系统 II(PSII)的电子传递受阻, PSII 能量持续积累, 产生大量单线态氧; PSII 电子传递受阻同时导致苗期胡萝卜素含量减少, 缺少类胡萝卜素保护的叶绿体被单线态氧破坏, 产生白化表型。与此同时, 由于苗期缺乏类胡萝卜素, 独脚金内酯合成不足, 从而减少对分蘖芽的抑制, 导致突变体产生提前分蘖、多分蘖矮秆表型。尽管 *IM* 影响质体醌(PQ)池的电子传递, 但 *IM* 对 PQ 池电子传递并非是不可或缺的。植物体内可能存在其他可弥补 *IM* 缺失的电子传递途径^[56]。随着植物的生长发育, 其他电子传递途径开始起作用, 逐渐修复 *IM* 突变造成的损伤。此时类胡萝卜素含量逐渐增加, 同时 PSII 的电子传递也日趋顺畅, 最终使叶片颜色逐渐恢复正常。

尽管上述推导能够将白化与多分蘖矮秆表型的变异有机联系起来。但要验证上述推论, 需要补充以下实验。第一, 对 *hw-1(t)* 进行图位克隆, 确定突变基因是否为 *IM* 基因。第二, 不同时期内源类胡萝卜素的含量测定, 确定突变体苗期和分蘖期类胡萝卜素含量是否低于突变体亲本。第三, 苗期施加独脚金内酯的人工合成类似物 GR24^[59], 看能否抑制多分蘖矮秆性状。当然, 在技术成熟的情况下, 直接测定独脚金内酯的含量将更直截了当。除此之外, 目前并未能排除另一种植物激素 细胞分裂素(cytokinin, CK)对 *hfa-1* 多分蘖表型的影响, 因为相关研究已证明 CK 也参与植物的分枝发育调控^[60]。对突变体 CK 含量的测定将有助于进一步阐明 *hfa-1* 的多分蘖矮秆突变机制。目前, 后续验证工作正在陆续开展。

4 结论

从水稻空间诱变后代群体中发现新型白化突变体 *hfa-1*, 其多个突变性状均受单隐性基因 *hw-1(t)* 控制。*hw-1(t)* 属新型白化基因, 可能编码 IMMUTANTS 蛋白, 进一步对其图位克隆和功能分析将有助于了解植物生长发育调控的机理。

References

- [1] Gustafsson A. The plastid development in various types of chlorophyll mutations. *Hereditas*, 1942, 28: 483–492
- [2] Tanya G F, Staehelin L A. Partial blocks in the early steps of the chlorophyll synthesis pathway: a common feature of chlorophyll *b*-deficient mutants. *Physiol Plant*, 1996, 97: 311–320
- [3] Wu D-X(吴殿星), Shu Q-Y(舒庆尧), Xia Y-W(夏英武), Liu G-F(刘贵付). ⁶⁰Co gamma-ray induced temperature-regulatory

- leaf color albino mutated gene expression mutant line in rice (*Oryza sativa* L.). *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1997, 30(3): 95–95 (in Chinese with English abstract)
- [4] Zhao Y, Wang M L, Zhang Y Z, Du L F, Pan T. A chlorophyll-reduced seedling mutant in oilseed rape, *Brassica napus*, for utilization in F₁ hybrid production. *Plant Breed*, 2000, 119: 131–135
- [5] Gan S, Amasino R M. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 1995, 270: 1986–1988
- [6] Fambrini M, Castagna A, Vecchia F D. Characterization of a pigment-deficient mutant of sunflower (*Helianthus annuus* L.) with abnormal chloroplast biogenesis, reduced PS II activity and low endogenous level of abscisic acid. *Plant Sci*, 2004, 167: 79–89
- [7] Parks B M, Quail P H. Phytochrome-deficient *hy1* and *hy2* long hypocotyls mutants of Arabidopsis are defective in phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant Cell*, 1991, 3: 1177–1186
- [8] Singh U P, Prithiviraj B, Sarma B K. Development of *Erysiphe pisi* (powdery mildew) on normal and albino mutants of pea (*Pisum sativum* L.). *J Phytopathol*, 2000, 148: 591–595
- [9] Xing S, Miao J, Li S, Qin G, Tang S, Li H, Gu H, Qu L J. Disruption of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (*DXR*) gene results in albino, dwarf and defects in trichome initiation and stomata closure in *Arabidopsis*. *Cell Res*, 2010, 20: 688–700
- [10] Schwartz S H, Qin X, Zeevaart J A. Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes and enzymes. *Plant Physiol*, 2003, 131: 1591–1601
- [11] Agrawal G K, Yamazaki I M, Kobayashi I M. Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon Tos17 insertion tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel *OsTATC* gene. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1248–1257
- [12] Beale S I. Green genes gleaned. *Trends Plant Sci*, 2005, 10: 301–312
- [13] Morita R, Sato Y, Masuda Y, Nishimura M, Kusaba M. Defect in non-yellow coloring 3, an alpha/beta hydrolase-fold family protein, causes a stay-green phenotype during leaf senescence in rice. *Plant J*, 2009, 59: 940–952
- [14] Terry M J, Kendrick R E. Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient aurea and *yellow-green-2* mutants of tomato. *Plant Physiol*, 1999, 119: 143–152
- [15] Chen G, Bi Y R, Li N. EGY1 encodes a membrane-associated and ATP-independent metalloprotease that is required for

- chloroplast development. *Plant J*, 2005, 41: 364–375
- [16] Kushnir S, Babiychuk E, Storozhenko S, Davey M W, Papenbrock J, Rycke R D, Engler G, Stephan U W, Lange H, Kispal G, Lill R, Van M M. A mutation of the mitochondrial ABC transporter *Stal* leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *starik*. *Plant Cell*, 2001, 13: 89–100
- [17] Shu Q-Y(舒庆尧), Wu D-X(吴殿星), Xia Y-W(夏英武), Liu G-F(刘贵付). Study on greenism characteristics of greenable albino mutation line W25 of rice (*Oryza sativa* L.). *J Zhejiang Agric Univ* (浙江农业大学学报), 1996, 22(2): 219–220 (in Chinese with English abstract).
- [18] Zhao H-J(赵海军), Wu D-X(吴殿星), Shu Q-Y(舒庆尧), Shen S-Q(沈圣泉), Ma C-X(马传喜). Breeding and characteristics of photo-thermo sensitive genic male sterile rice Yutu S labeled with green-revertible albino leaf marker. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2004, 18(6): 515–521 (in Chinese with an English abstract)
- [19] Zhang Y(张毅), Lü J(吕俊), Li Y-F(李云峰), Yang K(杨昆), Shen F-C(沈福成), Zhang Q-L(张巧玲), Peng Q-L(彭其莲), Zhou Y-L(周亚林), He G-H(何光华). Effects of green-revertible albino gene on the agronomy traits and appearance quality in rice. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2008, 34(2): 284–289 (in Chinese with an English abstract)
- [20] Guo S-W(郭士伟), Wang Y-F(王永飞), Ma S-M(马三梅), Li X(李霞), Gao D-Y(高东迎). Genetic analysis and fine mapping of a green-revertible albino leaf mutant in rice. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2011, 25(1): 95–98 (in Chinese with an English abstract)
- [21] Shen S-Q(沈圣泉), Shu Q-Y(舒庆尧), Bao J-S(包劲松), Wu D-X(吴殿星), Cui H-R(崔海瑞), Xia Y-W(夏英武). Development of a greenable leaf colour mutant Baifeng A and its application in hybrid rice production. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2004, 18(1): 34–38 (in Chinese with English abstract)
- [22] Wu W(吴伟), Liu X(刘鑫), Shu X-L(舒小丽), Shu Q-Y(舒庆尧), Xia Y-W(夏英武), Wu D-X(吴殿星). Two-line hybrid rice male sterile line ‘NHR111S’ with a marker of green-revertible albino leaves. *J Nucl Agric Sci* (核农学报), 2006, 20(2): 103–105 (in Chinese with English abstract)
- [23] Li R-Q(李瑞清), Wu L-Q(武立权), Shu Q-Y(舒庆尧), Zhao H-J(赵海军), Wu D-X(吴殿星), Wang R-F(王荣富). Characterization of a new green-revertible mutant G9 of rice. *J Nucl Agric Sci* (核农学报), 2010, 24(5): 881–886 (in Chinese with English abstract)
- [24] Fang X-T(房贤涛), Ma H-L(马洪丽), Zhao F-Y(赵福源), Zhang Q-Q(章清杞), Zhang S-B(张书标). Studied on the breeding application of six photo-thermo-sensitive genic male sterile line mutants with greenable albino leaf. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学报), 2011, 27(1): 45–51 (in Chinese with English abstract)
- [25] Liu G-F(刘贵付), Shu Q-Y(舒庆尧), Xia Y-W(夏英武). Utilization of Greenable albino mutation lines of thermosensitive genic male sterile rice (*Oryza sativa* L. ssp *indica*). *J Nucl Agric Sci* (核农学报), 1996, 10(3): 129–132 (in Chinese with English abstract)
- [26] Chen T, Zhang Y, Zhao L, Zhu Z, Lin J, Zhang S, Wang C. Physiological character and gene mapping in a new green-revertible albino mutant in rice. *J Genet Genomics*, 2007, 34: 331–338
- [27] Chen T, Zhang Y, Zhao L, Zhu Z, Lin J, Zhang S, Wang C. Fine mapping and candidate gene analysis of a green-revertible albino gene *gra(t)* in rice. *J Genet Genomics*, 2009, 36: 117–123
- [28] Xia J C, Wang Y P, Ma B T, Yin Z Q, Hao M, Kong D W, Li S G. Ultrastructure and gene mapping of the Albino mutant *all2* in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Genet Sin*, 2006, 33: 1112–1119
- [29] Ueguchi M, Fujisawa Y, Kobayashi M, Ashikari M, Iwasaki Y. Rice dwarf mutant *d1*, which is defective in the a subunit of the heterotrimeric G protein, affects gibberellin signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 11639–11643
- [30] Lanahan M B, Ho T H. Slender barley: a constitutive gibberellin-response mutant. *Planta*, 1988, 175: 107–114
- [31] Dobrev P I, Kaminek M. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J Chromatogr A*, 2002, 950: 21–29
- [32] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8: 4321–4325
- [33] Shen Y J, Jiang H, Jin J P, Zhang Z B, Xi B, He Y Y, Wang G, Wang C, Qian L, Li X, Yu Q B, Liu H J, Chen D H, Gao J H, Huang H, Shi T L, Yang Z N. Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. *Plant Physiol*, 2004, 135: 1198–1205
- [34] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregation analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation population. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9828–9832
- [35] Takeda K. Internode elongation and dwarfism in some graminaceous plants. *Gamma Field Sym*, 1977, 17: 1–18
- [36] Wang G, Römheld V, Li C, Bangerth F. Involvement of auxin and CKs in boron deficiency induced changes in apical dominance of

- pea plants. *J Plant Physiol*, 2006, 163: 591–600
- [37] Ekamber K P, Kumar M. Hormonal regulation of tiller dynamics in differentially-tillering rice cultivars. *Plant Growth Regul*, 2007, 53: 215–223
- [38] Wilhelm R. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, 51: 501–531
- [39] Fujioka S, Yokota T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 137–164
- [40] Mitsunaga S, Tashiro T, Yamaguchi J. Identification and characterization of gibberellins-insensitive mutants selected from among dwarf mutants of rice. *Theor Appl Genet*, 1994, 87: 705–712
- [41] Morita R, Sato Y, Masuda Y, Nishimura M, Kusaba M. Defect in non-yellow coloring 3, an alpha/beta hydrolase-fold family protein, causes a stay-green phenotype during leaf senescence in rice. *Plant J*, 2009, 59: 940–952
- [42] Meskauskiene R, Nater M, Goslings D, Kessler F, Camp R, Klaus K. FLU: A negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 12826–12831
- [43] Jeon J S, Lee S, Jung K H, Jun S H, Jeong D H, Lee J, Kim C, Jang S, Yang K, Nam J, An K, Han M J, Sung R J, Choi H S, Yu J H, Choi J H, Cho S Y, Cha S S, Kim S I, An G. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J*, 2000, 22: 561–570
- [44] Miyao A, Tanaka K, Murata K, Sawaki H, Takeda S, Abe K, Shinozuka Y, Onosato K, Hirochika H. Target site specificity of the Tos17 retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell*, 2003, 15: 1771–80
- [45] Monde R A, Zito F, Olive J, Wollman F A, Stern D B. Post-transcriptional defects in tobacco chloroplast mutants lacking the cytochrome b6/f complex. *Plant J*, 2000, 21: 61–72
- [46] Kumar A M, Soll D. Antisense HEMA1 RNA expression inhibits heme and chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 2000, 122: 49–55
- [47] Xu Y Y, Jia J F, Wang B, Niu B T. Changes in isoenzymes and amino acids in forage and germination of the first post-flight generation of seeds of three legume species after space-flight. *Grass Forage Sci*, 1999, 54: 371–375
- [48] Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer P B, Puech-Pagès V, Dun E A, Pillot J P, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais J C, Bouwmeester H, Bécard G, Beveridge C A, Rameau C, Rochange S F. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 2008, 455: 189–194
- [49] Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyoizuka J, Yamaguchi S. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 2008, 455: 195–200
- [50] Xie X, Yoneyama K, Yoneyama K. The strigolactone story. *Annu Rev Phytopathol*, 2010, 48: 93–117
- [51] Beveridge C A, Kyoizuka J. New genes in the strigolactone-related shoot branching pathway. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13: 34–39
- [52] Bartley G E, Scolnik P A. Plant carotenoids: pigments for photo-protection, visual attraction, and human health. *Plant Cell*, 1995, 7: 1027–1038
- [53] Tracewell C A, Vrettos J S, Bautista J A, Frank H A, Brudvig G W. Carotenoid photooxidation in photosystem II. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 385: 61–69
- [54] Wu D, Wright D A, Wetzel C, Voytas D F, Rodermel S. The *IMMUTANS* variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *Plant Cell*, 1999, 11: 43–55
- [55] 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: 57–68
- [56] Aluru M, Yu F, Fu A, Rodermel S. *Arabidopsis* variegation mutants: new insights into chloroplast biogenesis. *J Exp Bot*, 2006, 57: 1871–1881
- [57] Aluru M R, Rodermel S R. Control of chloroplast redox by the *IMMUTANS* terminal oxidase. *Physiol Plant*, 2004, 120: 4–11
- [58] Josse E, Simkin A J, Gaffe J, Labourne A, Kuntz M, Carol P. A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiol*, 2000, 123: 1427–1436
- [59] Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 2005, 435: 824–827
- [60] Domagalska M A, Leyser O. Signal integration in the control of shoot branching. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12: 211–221
- [61] Arnon D I, Allen M B, Whatley F R. Photosynthesis by Isolated Chloroplasts. *Nature*, 1954, 174: 394–396