

一个水稻白化致死突变基因的精细定位和遗传研究

初志战¹ 刘小林² 陈远玲¹ 刘耀光^{1,*}

(¹华南农业大学 生命科学学院/亚热带农业生物资源保护与利用重点实验室, 广州 510642; ²江西宜春学院, 江西 宜春 336000;

* 通讯联系人, E-mail: ygliu@scau.edu.cn)

Genetic Analysis and Gene Mapping of an Albino Lethal Mutant in Rice

CHU Zhi-zhan¹, LIU Xiao-lin², CHEN Yuan-ling¹, LIU Yao-guang^{1,*}

(¹ College of Life Sciences, South China Agricultural University/State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangzhou 510642, China; ² Yichun University, Yichun 336000, China; * Corresponding author,

E-mail: ygliu@scau.edu.cn)

CHU Zhizhan, LIU Xiaolin, CHEN Yuanling, et al. Genetic analysis and gene mapping of an albino lethal mutant in rice. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(2): 136-142.

Abstract: An albino lethal mutant, temporarily termed as *all4* (*albino 14*), was obtained from ⁶⁰Co γ -ray radiated mutant pool of *japonica* rice variety Nipponbare. The mutant showed albino phenotype from germination, and died after 3-leaf stage. Genetic analysis revealed that the mutant phenotype was controlled by a single recessive nuclear gene. The chlorophyll and carotenoid contents in *all4* declined dramatically. Transmission electron microscopy examination showed there were no obvious chloroplasts except prolamellar bodies in *all4*. The expression level of most genes of photosystem I and photosystem II decreased dramatically, but the ribosomal genes and RNA polymerase genes in chloroplast increased notably in *all4* mutant. In *all4*, the expression amount of *PsbN*, a photosystem II protein N gene, was 118.23 times as high as that in wild type. By genetic mapping with an F₂ population generated by crossing the heterozygous *all4* plants with *indica* variety Huanghuazhan, the *all4* locus was mapped within 40 kb on chromosome 6. So far there is no reported gene relative to leaf color, so it is a novel gene controlling chloroplast development.

Key words: rice; albino; gene mapping

初志战, 刘小林, 陈远玲, 等. 一个水稻白化致死突变基因的精细定位和遗传研究. *中国水稻科学*, 2016, 30(2): 136-142.

摘要: 从粳稻品种日本晴经⁶⁰Co 诱变的 M₁ 代材料中发现了一个白化致死突变体, 该突变体从萌芽后一直表现白化, 3 叶期后逐渐衰亡。遗传分析表明, 该突变表型受一对隐性核基因控制, 将该白化突变体暂定名为 *all4*。与野生型相比, *all4* 突变体的叶绿素含量与类胡萝卜素含量显著降低。电子显微镜观察表明 *all4* 突变体不能形成完整的叶绿体, 只有原片层体结构。对叶绿体编码基因的表达分析发现, 突变体中光系统 I 和光系统 II 基因表达明显下调, 核糖体结构基因和质体编码的 RNA 聚合酶亚基基因表达明显上调, 但是 *PsbN* (photosystem II protein N) 却上调表达水平最高, 达到 118.23 倍。利用 *all4* 突变体与黄华占杂交获得的 F₂ 代分离群体进行基因定位, 将该基因定位于水稻第 6 染色体上约 40 kb 的范围。目前, 该范围内没有叶色相关基因的报道, 可能为一新的调控叶绿体发育的基因。

关键词: 水稻; 白化致死; 基因定位

中图分类号: Q755; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2016)02-0136-07

水稻是世界上三大粮食作物之一, 也是研究植物功能基因的模式作物。水稻的物质产量大部分来源于叶片的光合作用, 因此叶片的颜色、大小和形状直接影响水稻的产量和品质。水稻的叶色突变较为常见, 大多数的叶色突变都会导致叶绿体中叶绿素

a, 叶绿素 b 及类胡萝卜素等色素含量改变, 引起植株光合作用效率下降, 进而导致植株生长缓慢, 株型弱小, 结实率下降, 甚至植株死亡。叶绿体是半自主型细胞器, 其生物发生及发育是受核基因组和叶绿体基因组共同调控, 所以核基因或叶绿体基因的突

收稿日期: 2015-09-09; 修改稿收到日期: 2015-12-05。

基金项目: 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题资助项目(SKL-CUSAb-2013-04); 江西省教育厅科技计划资助项目(GJJ14707); 广东省自然科学基金-博士启动项目(2015A030310485)。

变都有可能影响到叶绿体的正常发育,因此,研究叶色调控不仅可以深入研究叶绿体的形成发育过程,也可以从分子水平对水稻株型改良,尤其是叶色的改良及水稻的高产提供选择。

迄今为止,已报道的水稻叶色突变体超过 180 个,大多数定位到染色体的特定区间(超过 140 个),已成功克隆的叶色相关基因有 37 个。从叶色突变基因的分布来看,突变基因在 12 条染色体上均有发现,第 3 染色体上最多。在已报道的水稻叶色突变体中,大多数为单基因控制的隐性突变体;黄化突变基因,返绿型突变基因和白化突变基因较多,其中白化突变基因目前已报道的超过 28 个。引起叶色变异的机理较多,其中参与叶绿素、类胡萝卜素等色素合成过程中的酶发生突变,导致叶绿素合成缺陷,是目前发现的最多的一类。OsCAO1(水稻叶绿素 a 加氧酶)是催化叶绿素 a 合成叶绿素 b 的关键酶,该酶失活会导致水稻叶片黄化、植株矮化^[1]。YGL1^[2] 编码叶绿素合酶,催化叶绿素酸酯 a 形成叶绿素 a,突变体表型为黄绿。OsDVR(*Oryza sativa* divinyl reductase,水稻二乙烯还原酶),催化二乙烯叶绿素(酸酯) a 转化为单乙烯叶绿素(酸酯) a,突变后水稻叶色黄绿,植株矮小^[3]。OsPDS(水稻八氢番茄红素脱氢酶)、OsZDS(水稻 ζ -胡萝卜素脱氢酶)、OsCRTISO(水稻类胡萝卜素异构酶)、 β -OsLCY(水稻番茄红素 β -羟化酶)这 4 个酶都参与类胡萝卜素前体-ABA 的合成,任何一个发生突变均可导致突变体中 ABA 含量下降,引起穗萌和白化^[4]。叶绿体自身结构发育异常也常常导致叶色的突变,Kusumi 等^[5]在转绿型白叶突变体 *v1* 中发现,核基因组编码的叶绿体 RNA 聚合酶蛋白 OsRpoTp 表达量急剧减少,导致叶绿体发育不良,是造成早期叶色白化的主要原因。Sumimoto 等^[6]发现叶绿体不良的转绿型白叶突变体 *v2* 也属于此类型。Gothandam 等^[7]发现叶绿体发育相关的基因 *OsPPR1* 表达水平降低会导致水稻叶片白化。Zhao 等^[8]发现 *OsCHR4* 参与了水稻近轴叶肉细胞叶绿体早期分化,其功能的丧失阻碍近轴叶肉细胞叶绿体的发育,所以 *OsCHR4* 突变体表现叶片近轴部白化。叶绿素分解代谢障碍也可以导致叶色突变,大多突变表型为叶色常绿。Jiang 等^[9-11]发现基因 *Sgr* 可能参与调控 PaO 脱镁叶绿酸 a 加氧酶活性,*Sgr* 可与 LHCP II(捕光叶绿素 a/b 结合蛋白 II)结合,在类囊体膜上形成 *Sgr*-LHCP II 复合物,诱导

LHCP II 降解,促使叶绿素的降解,其突变体表现出叶片滞绿。*NYCI* (Non-yellow coloring)^[12] 编码叶绿素 b 还原酶,该酶是叶绿素降解过程中的第 1 个酶,突变可引起叶绿体基粒和捕光系统 II 退化减慢,叶片常绿。

本实验室利用⁶⁰Co 诱变日本晴,*M*₁ 代获得一个水稻白化致死突变体,将该白化突变体暂命名为 *all14*。遗传分析表明,该性状是由单个隐性基因控制的。本研究对该突变体进行生理生化分析和显微观察,并对该突变基因进行了精细定位,以期为该基因的克隆及对叶绿体发育过程的功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 突变体材料

白化致死突变体来源于水稻日本晴(粳稻品种)的⁶⁰Co 辐射诱变 *M*₁ 代。由于突变体苗期白化致死,因此 *M*₁ 代表型正常植株单株挂牌,单株收种保存。播种 *M*₂ 代种子,可以分离出白化苗的株系,单株收种,田间材料按常规管理。

1.2 叶绿素含量测定

分别取 3 叶期前期突变体和野生型材料的叶片,测定其叶绿素 a、叶绿素 b 及类胡萝卜素含量,重复 3 次,取平均值。测定方法参照文献^[13],并略加修改。

1.3 叶绿体显微结构观察

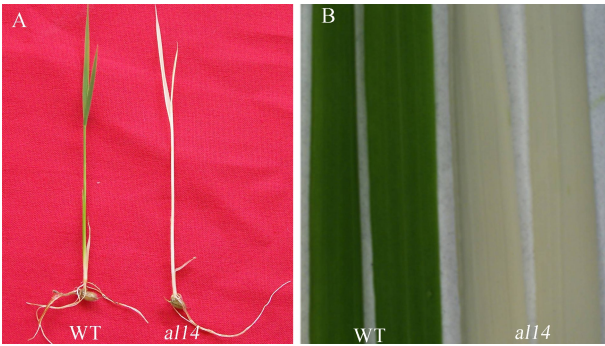
取播种 12 d 的野生型及突变体叶片,用 4% 戊二醛(用 pH7.2 的磷酸缓冲溶液配置)4℃ 固定过夜,磷酸缓冲溶液冲洗 3 次,1% 锇酸固定 1 h,磷酸缓冲溶液冲洗 3 次,用 30%、50%、70%、80%、95%、100% 的乙醇和丙酮逐级脱水 5 min,最后用树脂包埋样品,切片后用醋酸铀染色,再用透射电镜进行观察。

1.4 定位群体的构建

选取苗期能够分离出白化突变体的 *M*₂ 株系(上一代为杂合单株),随机选取 6 株生长正常的单株,分别与籼稻品种黄华占杂交,获得 *F*₁ 种子。播种 *F*₁ 后,自交繁殖获得 *F*₂ 种子,单株收种。分株系种植 *F*₂ 代,以能分离出白化苗的 *F*₂ 群体为定位群体。

1.5 基因定位

基因初步定位:采用 SDS 法^[14] 提取 20 株白化苗叶片总 DNA 用于基因定位。基因精细定位:根



A—秧苗; B—叶片。
A—Seedling; B—Leaf.

图 1 突变体 *all14* 及其野生型(WT)的表型
Fig.1. Phenotypes of *all14* and its wild type(WT).

据初步定位结果,采用快速打叶法^[15]对定位群体植株进行两侧标记检测,并利用内部 InDel 引物进一步缩小定位区间。

本研究用于基因定位的分子标记为 InDel 标记:一部分为本实验室已有的,另一部分为根据已公布的水稻品种 93-11 和日本晴全基因组序列自行开发。这些标记均匀分布于水稻 12 条染色体,共 147 对。

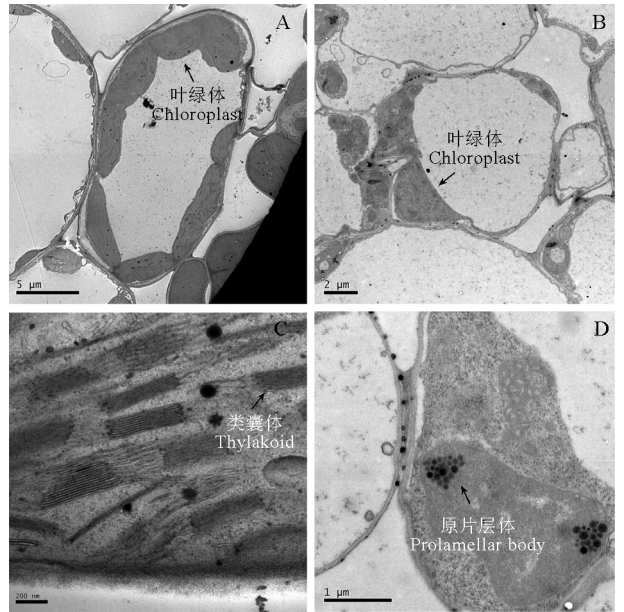
1.6 叶绿体基因表达分析

取 2 叶期的叶片提取 RNA,反转录成 cDNA,利用 β -Actin(Os03g0718100)(F:CACATTCCAGCAGATGTGGA; R: ACCACAGGTAGCAATAGGTA)作为内参基因,64 对引物检测突变体中叶绿体基因组基因的表达量。根据 BioRad 公司的《荧光定量 PCR 应用指南》所述,进行数据处理,通过计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值来确定每个基因在野生型和突变体中的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 突变体表型鉴定

正常的自然条件下, *all14* 种子萌发后,子叶为



1—叶绿体; 2—类囊体; 3—原片层体。
1, Chloroplast; 2, Thylakoid; 3, Prolamellar body.

图 2 野生型(A,C)和 *all14* 突变体(B,D)的超微结构
Fig. 2. Transmission electron microscopy observation of wild type(A, C) and *all14* mutant(B,D).

白色,从真叶长出至 3 叶期,叶片完全为白色,3 叶期后,逐渐死亡(图 1)。

2.2 突变体的叶绿素含量变化

通过测定突变体 *all14* 及其野生型叶片的叶绿素、类胡萝卜素的含量,发现 *all14* 的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜含量明显下降,与野生型相比均差异显著,表明 *all14* 的叶绿素合成受到明显抑制(表 1)。

2.3 叶绿体的显微结构

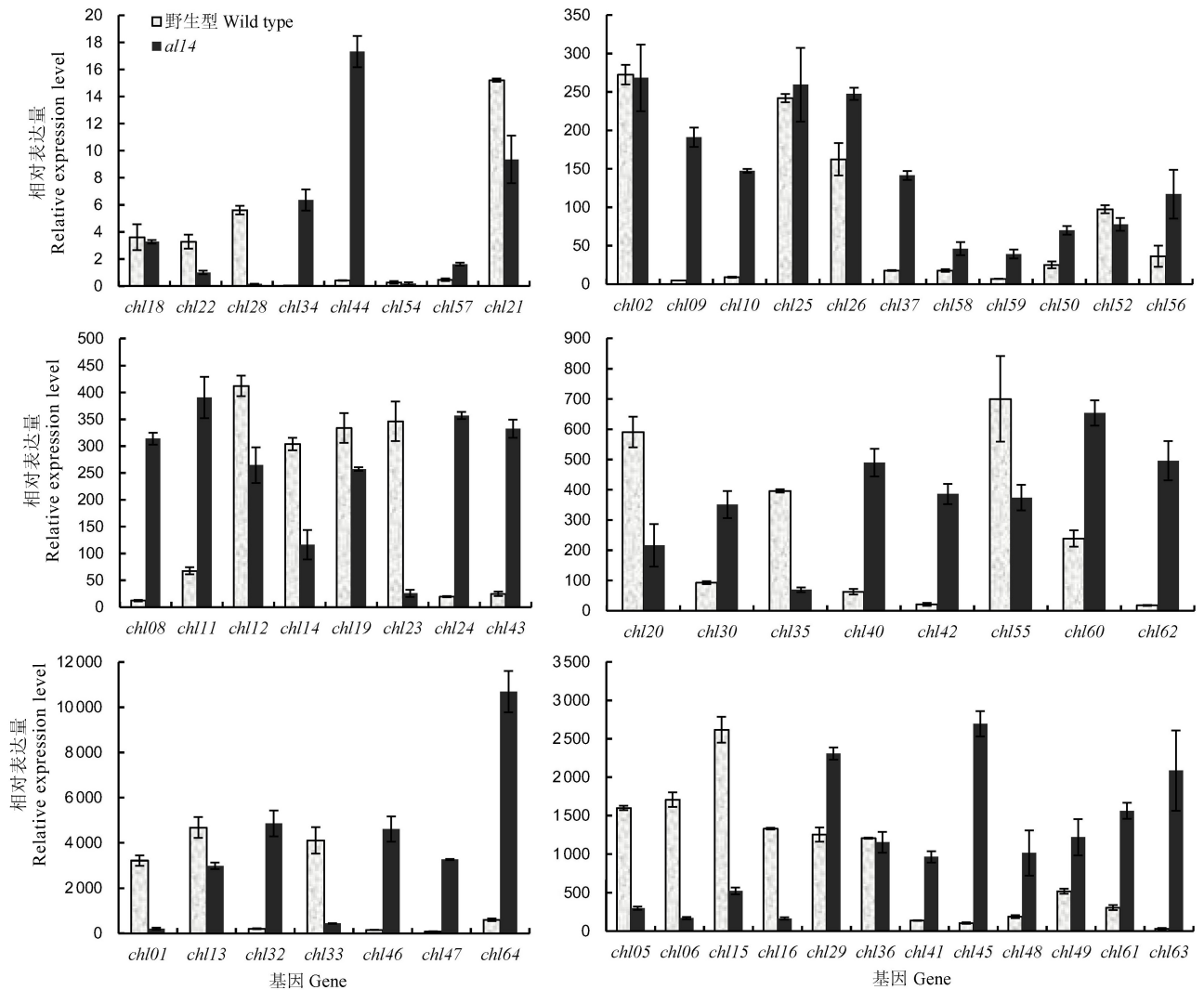
利用透射电镜观察 *all14* 及其野生型的叶绿体结构,野生型细胞中叶绿体含量丰富,基粒结构清晰,而 *all14* 中没有明显的叶绿体结构,没有类囊体结构,仅有原片层体结构(图 2)。

表 1 突变体 *all14* 及其野生型中色素含量

Table 1. Photosynthetic pigments contents in *all14* and its wild type.

材料 Material	叶绿素 a 含量 Chlorophyll a content/(mg · g ⁻¹)	叶绿素 b 含量 Chlorophyll b content/(mg · g ⁻¹)	类胡萝卜素含量 Carotenoids content/(mg · g ⁻¹)	叶绿素 a/叶绿素 b Chlorophyll a/ chlorophyll b
野生型 Wild type	3.83±0.27	1.30±0.12	0.78±0.03	2.97±0.07
<i>all14</i>	0.34±0.03**	0.46±0.08**	0.09±0.01**	0.76±0.06**

** P<0.01.

图3 部分叶绿体编码基因在野生型和 *all4* 突变体的表达比较Fig. 3. Expression analysis of some chloroplast-encoded genes in wild type and *all4* mutant.

2.4 叶绿体编码基因的定量表达分析

通过定量结果可以看出,该叶色突变对叶绿体编码基因的表达影响是全面的,共有 29 个基因表达明显上调(上调倍数 >2),上调基因主要为核糖体结构基因(*chl63*, *chl44*, *chl46*, *chl47*, *chl62*, *chl45*, *chl42*)和 RNA 聚合酶亚基基因(*chl09*, *chl08*),但是上调表达幅度最大的基因为 *chl34*,上调了 118.23 倍,明显高出其他上调基因;表达量明显降低的基因多为光系统 I 和光系统 II 基因(*chl28*, *chl01*, *chl06*, *chl33*, *chl16*, *chl35*, *chl05*)及 Rubisco 大亚基基因(图 3)。

2.5 突变体的遗传分析及定位结果

突变材料 M_1 代中,野生型植株与白化突变植株分别为 49 株和 13 株,符合 3 : 1 的分离关系(χ^2

$=0.344$, $\chi^2_{0.05}=3.84$; $P>0.05$)。单株收获 M_1 代叶色正常的植株种子,种植 M_2 代,约有 1/3 的植株后代全部叶色正常,不再分离,其余 2/3 的植株后代又表现出大致 3 : 1 的分离比。在可分离出白化突变植株的 M_2 群体中,随机选取 6 株叶色正常单株与籼稻亲本黄华占杂交。随机选择 5 个发生分离的 F_2 代群体,分别统计正常植株与白化苗数目,正常植株与白化突变植株分别为 260 株和 91 株,分离比例符合 3 : 1 ($\chi^2_c=0.115$, $\chi^2_{0.05}=3.84$; $P>0.05$),因此确定该突变为单基因隐性遗传。

选取均匀分布于水稻 12 条染色体上在两亲本间有多态性的 InDel 标记 147 个。用 20 株白化苗进行初定位,将白化基因初步定位在第 6 染色体短臂上的 InDel 标记 606949 与 608312 之间,

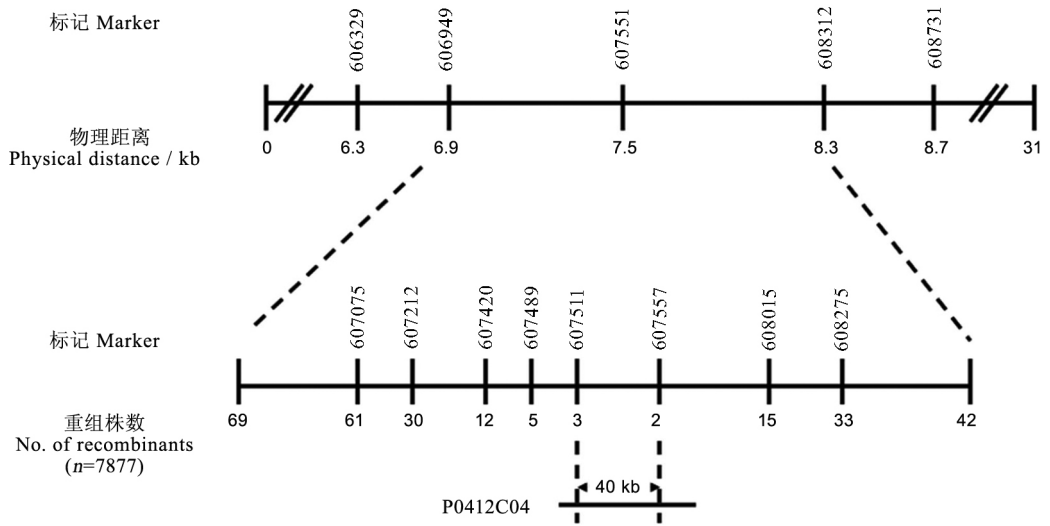


图 4 *all4* 在水稻第 6 染色体的定位
 Fig. 4. Location of *all4* on rice chromosome 6.

物理距离约为 1400 kb 的范围。

为了进一步缩小定位区间,选取了 F₂ 群体中 2012 株白化植株和 5865 株正常表型植株作为精细定位群体。根据公布的粳稻日本晴与籼稻 9311 序列,在 InDel 标记 606949 与 607551 之间,找到了 8 对在两个亲本有差异的新标记(表 2),并最终将白化基因 *all4* 定位在 InDel 标记 607511 与 607551 之间,物理距离约 40 kb 的范围(图 4)。

2.6 候选基因分析

通过作物和模式植物基因组数据库 Gramene (<http://www.gramene.org/>)预测该区域的基因组序列,得到 5 个 ORF,其中有 2 个假定的表达蛋白(expressed protein),一个为假定的热重复家族蛋白,一个 PE-PGRS 家族蛋白和 1 个假定的转座子蛋白(表 3)。根据突变体表型分析,突变基因很可

能带有叶绿体定位信号。通过 PSORT (<http://psort.hgc.jp/form.html>)预测亚细胞定位结果发现,这 5 个候选基因中只有基因 4 具有叶绿体定位信号,但通过测序排除了基因 4 的可能,因而需要对其余几个候选基因进行测序分析,以确定该白化基因。

3 讨论

水稻叶色白化致死突变是一种比较极端,也比较常见的叶色突变,本研究的突变体中看不到清晰的叶绿体结构,更看不到类囊体堆叠成基粒的结构;叶绿素、类胡萝卜素含量明显下降,这与大部分的白化突变体研究结果相似^[16-17]。水稻(*Oryza sativa*)叶绿体基因组测序工作在 1989 年已经完成^[18],叶绿体编码蛋白预测超过 100 个^[19]。通过对 64 个叶

表 2 用于精细定位的新 InDel 标记
 Table 2. New InDel markers for mapping.

标记 Marker	正向引物 Forward primer(5'-3')	反向引物 Reverse primer(5'-3')
607075	TGAGGATGGTTTTGGATGGG	CAATAGGGCAAACCTCAAC
607212	GAGTGAGCACTTACATTCGGT	ATCCTCCCTACACAAGGAGT
607420	GTCATTGCCAGGTAGATC	CTTCGGGACCAAATACAC
607489	AAATGTCCATGTGTTTGCTTC	CATGTGTGGAATGTGGTTG
607511	GTACCATCATTCTCCTACTCAC	TTCTACCTGAACCTGGAGTTC
607551	AAACGAGATCAGCCACGGAC	CTAGTGGAAGAGGTGGCTAC
608015	GCGCTGTTGGATATCATG	AATTCCTAGGCCACACAC
608275	GTAGCATAGGTATCGGATCTG	AATGGACGAAGTGCAGTCATG

表 3 定位区间基因功能注释

Table 3. Gene annotated in mapping region.

编号 No.	基因 Gene	注释 Description
1	LOC_Os06g13590	假定的 PE-PGRS 家族蛋白 PE-PGRS family protein, putative, expressed
2	LOC_Os06g13600	假定的热重复家族蛋白 HEAT repeat family protein, putative, expressed
3	LOC_Os06g13610	表达蛋白 Expressed protein
4	LOC_Os06g13620	表达蛋白 Expressed protein
5	LOC_Os06g13630	假定的转座子蛋白 Transposon protein, putative, mutator sub-class, expressed

绿体基因组基因表达的定量分析发现,光系统 I 和光系统 II 基因表达下调明显,这可能与光系统 I 和光系统 II 位于类囊体膜有关。叶绿体基因组转录需要至少两种 RNA 聚合酶。核基因组编码的 RNA 聚合酶(NEP),主要转录叶绿体内的转录/翻译相关基因,如 *rpoA* 和 *rpoB*,而质体基因组编码的 RNA 聚合酶(PEP),主要转录叶绿体内光合作用相关基因^[20-21]。PEP 由 *rpoA*、*rpoB*、*rpoC1* 和 *rpoC2* 编码的 4 个亚基组成,一旦这些亚基发生突变就会引起 PEP 的功能受损,从而产生白化表型^[22-24]。在 *all4* 突变体中,核糖体结构基因和质体编码的 RNA 聚合酶亚基基因表达上调明显,目前没发现有这方面的报道,猜测可能是植物的应激反应。在上调基因中,基因 *chl34* (*PsbN*, photosystem II protein N)上调了 118.23 倍,上调幅度最高,该基因位于 *psbB* 操纵子的互补链上,*psbT* 和 *psbH* 之间。实际上目前关于 *PsbN* 的编码框也一直存在争议,Kashino^[25] 和 Gomez 等^[26] 通过基因组学研究没有发现 *PsbN* 蛋白,所以 Kashino 认为 *PsbN* 应为 *PsbTc*^[25];Zghidi 等^[27] 证实了拟南芥的 *PsbN* 反义 RNA 不仅仅局限于 *psbN* 和 *psbH* 之间的区间,甚至包含了 *psbT* 的整个编码区。我们通过定量分析发现 *PsbN* 在野生型材料中表达量很低,这可能是为什么 Kashino 等和 Gomez 等难以用基因组学检测到 *PsbN* 蛋白的原因。对于 *PsbN* 蛋白的功能研究,Mayes^[28] 发现在胞藻的 *psbN* 和 *psbH* 双突变和 *psbH* 的单突变表型没有明显差别,因此认为 *psbN* 对光合自养生物的生长不是必需的,但是 Torabi S 等^[29] 发现,烟草的 *psbN* 突变体对光很敏感,光抑制后不能修复,只能在低光强下生活。Zghidi 等在 *sig3* 突变体中发现 *psbN* 的转录水平急剧下降(几乎检测不到),也表明 *psbN* 的表达受到 *sig3* 的调控,SIG3 ($\sigma 3$) 作为一个辅助因子与 PEP (plastid encoded RNA polymerase) 共同起作用。

all4 突变体材料中,*PsbN* 表达量急剧上升,RNA 聚合酶多个亚基的表达量也显著增加,*PsbN* 基因表达量的上升与 RNA 聚合酶亚基表达量的提高是否有关? 是否受到 *sig3* 的调控? 这些都需要进一步的分析。

通过图位克隆将目标基因 *all4* 定位在第 6 染色体 40 kb 的范围。目前,在水稻第 6 染色体上已报道了 16 个与叶色发育相关的基因,其中白化表型的有 3 个,分别为 *AL1*, *V3* 和 *GWS/ST1*。在 *all4* 目标区域 40 kb 范围内没有相关叶色基因报道,可能为一个新基因。

谢辞:感谢华南农业大学张群宇老师提供叶绿体基因组定量分析引物。

参考文献:

- [1] Lee S C, Kim J H, Yoo E S, et al. Differential regulation of chlorophyll a oxygenase genes in rice. *Plant Mol Biol*, 2005, 57(6): 805-818.
- [2] Wu Z M, Zhang X, He B, et al. A Chlorophyll-deficient rice mutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiol*, 2007, 145(1): 29-40.
- [3] Wang P R, Gao J X, Wan C M, et al. Divinyl chlorophyll(a) can be converted to monovinyl chlorophyll(a) by a divinyl reductase in rice. *Plant Physiol*, 2010, 153(3): 994-1003.
- [4] Fang J, Chai C, Qian Q, et al. Mutations of genes in synthesis of the carotenoid precursors of ABA lead to preharvest sprouting and photo-oxidation in rice. *Plant J*, 2008, 54(2): 177-189.
- [5] Kusumi K, Yara A, Mitsui N, et al. Characterization of a rice nuclear-encoded plastid RNA polymerase gene *OsRpoTp*. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(9): 1194-1201.
- [6] 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. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(8): 985-996.
- [7] Gothandam K M, Kim E S, Cho H, et al. OsPPR1, a pentatricopeptide repeat protein of rice is essential for the chloro-

- plast biogenesis. *Plant Mol Biol*, 2005, 58(3): 421-433.
- [8] Zhao C F, Xu J M, Chen Y, et al. Molecular cloning and characterization of OsCHR4, a rice chromatin-remodeling factor required for early chloroplast development in adaxial mesophyll. *Planta*, 2012, 236(4): 1165-1176.
- [9] Jiang H W, Li M R, Liang N T, et al. Molecular cloning and function analysis of the stay green gene in rice. *Plant J*, 2007, 52(2): 197-209.
- [10] Sakuraba Y, Park S Y, Paek N C. The divergent roles of STAYGREEN (SGR) homologs in chlorophyll degradation. *Mol Cells*, 2015, 38(5): 390-395.
- [11] Park S Y, Yu J W, Park J S, et al. The senescence-induced stay-green protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell*, 2007, 19(5): 1649-1664.
- [12] Kusaba M, Ito H, Morita R, et al. Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell*, 2007, 19(4): 1362-1375.
- [13] Wellburn A R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Plant Physiol*, 1994, 144(3): 307-313.
- [14] Guillemat P, Maréchal-Drouard L. Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive, and reliable method. *Plant Mol Biol Rep*, 1992, 10(1): 60-65.
- [15] 王慧娜, 初志战, 马兴亮, 等. 高通量 PCR 模板植物基因组 DNA 制备方法. *作物学报*, 2013, 39(7): 1200-1205.
Wang H N, Chu Z Z, Ma X L, et al. A high through-put protocol of plant genomic DNA preparation for PCR. *Act Agron Sin*, 2013, 39(7): 1200-1205. (in Chinese with English abstract)
- [16] 程世超, 刘合芹, 翟国伟, 等. 水稻白化致死突变体 *abl4* 的鉴定和基因定位. *中国水稻科学*, 2013, 27(3): 240-246.
Cheng S C, Liu H Q, Zhai G W, et al. Genetic analysis and gene mapping of an albino lethal mutant in rice. *Chin J Rice Sci*, 2013, 27(3): 240-246. (in Chinese with English abstract)
- [17] 魏祥进, 宋建, 刘胜, 等. 水稻苗期低温白叶突变体 *ced2* 的鉴定和基因定位. *中国水稻科学*, 2014, 28(2): 111-118.
Wei X J, Song J, Liu S, et al. Identification and genetic mapping of a thermo-sensitive white leaf mutant in rice. *Chin J Rice Sci*, 2014, 28(2): 111-118. (in Chinese with English abstract)
- [18] Hiratsuka J, Shimada H, Whittier R, et al. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol Gen Genet*, 1989, 217(2): 185-194.
- [19] Cui L, Veeraraghavan N, Richter A, et al. Chloroplast DB: The chloroplast genome database. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(1): 692-696.
- [20] Hajdukiewicz P T J, Allison L A, Maliga P. The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J*, 1997, 16(13): 4041-4048.
- [21] Maliga P. Two plastid RNA polymerases of higher plants: An evolving story. *Trends Plant Sci*, 1998, 3(1): 4-6.
- [22] Serino G, Maliga P. RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme. *Plant Physiol*, 1998, 117(4): 1165-1170.
- [23] Krause K, Maier R M, Kofer W, et al. Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: Expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. *Mol Gene Genet*, 2000, 263(6): 1022-1030.
- [24] Legen J, Kemp S, Krause K, et al. Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant J*, 2002, 31(7): 171-188.
- [25] Kashino Y, Lauber W M, Carroll J A, et al. Proteomic analysis of a highly active photosystem II preparation from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals the presence of novel polypeptides. *Biochemistry*, 2002, 41(25): 8004-8012.
- [26] Gomez S M, Nishio J N, Faull K F, et al. The chloroplast grana proteome defined by intact mass measurements from liquid chromatography mass spectrometry. *Mol Cell Proteom*, 2002, 1(1): 46-59.
- [27] Zghidi W, Merendino L, Cottet A, et al. Nucleus-encoded plastid sigma factor SIG3 transcribes specifically the *psbN* gene in plastids. *Nucl Acids Res*, 2007, 35(2): 455-464.
- [28] Mayes S R, Dubbs J M, Vass I, et al. Further characterization of the *psbH* locus of *Synechocystis* sp. PCC 6803; inactivation of *psbH* impairs QA to QB electron transport in photosystem 2. *Biochemistry*, 1993, 32(6): 1454-1465.
- [29] Torabi S and Umate P. *PsbN* Is Required for Assembly of the Photosystem II Reaction. *Plant Cell*, 2014, 26(3): 1183-1199.