

水稻黄叶转绿突变体 818-6-8 的目标基因定位与转录组分析

许扬^{1,2,3} 王芳权^{1,2} 李文奇^{1,2} 陶亚军^{1,2} 范方军^{1,2} 陈智慧^{1,2} 蒋彦婕^{1,2}
朱建平^{1,2} 李霞^{1,2} 杨杰^{1,2,3,*}

(¹农业农村部淮河流域种质创制重点实验室/江苏省农业科学院 粮食作物研究所/生物育种钟山实验室, 南京 210014; ²扬州大学 江苏省粮食作物现代化产业协同创新中心, 江苏 扬州 225009; ³江苏大学 生命科学学院, 江苏 镇江 212013; *通信作者, email: yangjie168@aliyun.com)

Gene Mapping and Transcriptome Analysis of a Green-revertible Yellow Leaf Mutant 818-6-8 in Rice

XU Yang^{1,2,3}, WANG Fangquan^{1,2}, LI Wenqi^{1,2}, TAO Yajun^{1,2}, FAN Fangjun^{1,2}, CHEN Zhihui^{1,2},
JIANG Yanjie^{1,2}, ZHU Jianping^{1,2}, LI Xia^{1,2}, YANG Jie^{1,2,3,*}

(¹Key Laboratory of Germplasm Innovation in Downstream of Huaihe River, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Zhongshan Biological Breeding Laboratory, Nanjing 210014, China; ²Jiangsu Co-innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; ³Institute of Life Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; *Corresponding author, email: yangjie168@aliyun.com)

Abstract: 【Objective】Leaf is the most important photosynthetic organ in rice. Screening and identification of rice leaf color mutants are beneficial for exploring the molecular regulatory mechanisms of chloroplast development and photosynthesis. 【Method】A green-revertible yellow leaf mutant 818-6-8 was obtained from the gene-editing lines of Jingeng 818. Phenotypic identification, genetic analysis, gene mapping, and transcriptome analysis for 818-6-8 were performed. 【Results】Compared with the wild type, the mutant showed an obvious yellow-leaf phenotype until the three-leaf stage, accompanied by a significant decrease in chlorophyll content. As it grew, the mutant turned green and gradually became indistinguishable from the wild type at the four-leaf stage. Fewer chloroplasts, abnormal thylakoid morphology and stromal lamellas structure were observed in the mutant. The yellow-leaf trait of 818-6-8 was controlled by a pair of recessive nuclear alleles. The target mutation site was located within a 2.29 Mb interval on chromosome 5, and 20 annotated candidate genes were listed. The expression levels of 2090 genes in the mutant were significantly changed compared to the wild type, of which 1343 genes were up-regulated and 747 genes were down-regulated. Further, the differentially expressed genes were enriched in biological processes such as chloroplast organization and cellular components such as chloroplasts. The expression of genes associated with chlorophyll biosynthesis and chloroplast development of 818-6-8 changed significantly. 【Conclusion】These results support the next studies for cloning target genes and analyzing chloroplast-development molecular mechanisms, and provide a germplasm resource for ornamental rice breeding.

Key words: rice; green-revertible yellow leaf mutant; gene mapping; transcriptome analysis

摘要: 【目的】叶片是水稻最重要的光合作用器官。筛选和鉴定水稻叶色突变体, 有利于探究叶绿体发育与光合作用的分子调控机制。【方法】在金粳 818 背景的基因编辑后代中获得一个黄叶转绿突变体 818-6-8, 并对其进行表型鉴定、遗传分析、基因定位和转录组分析。【结果】与野生型相比, 突变体三叶期前叶片明显黄化, 并伴随叶绿素含量显著降低; 第 4 叶开始, 突变体开始转绿并逐渐表现为与野生型无异。突变体中叶绿体数量较少、类囊体形态和基粒片层结构异常。818-6-8 黄叶性状受 1 对隐性核基因控制。突变位点被定位于 5 号染色体 2.29 Mb 的区间内, 分析并筛选得到 20 个候选基因。突变体中 2090 个基因表达量发生显著改变, 其中 1343 个上调, 747 个下调; 差异表达基因显著富集在叶绿体组织等生物学过程、叶绿体等细胞组分。突变体中多个叶绿素合成和叶绿体发育相关基因表达发生改变。【结论】本研究完成了突变体 818-6-8 的目标基因定位与转录组分析, 为下一步目标基因克隆和叶绿体发育分子调控机理解析提供支持, 为景观稻育种提供优异种质资源。

关键词: 水稻; 黄叶转绿突变体; 基因定位; 转录组分析

收稿日期: 2024-11-08; 修改稿收到日期: 2024-12-27。

基金项目: 江苏省重点研发计划资助项目 (BE2022383); 生物育种钟山实验室项目 (ZSBBL-KY2023-04-1)。

叶片是水稻进行光合作用的主要场所。叶色的改变与叶片光合作用同化能力紧密相关,影响植株体内有机物的产生与积累,进而影响生长发育和群体产量的形成^[1-4]。水稻的叶色突变是一种发生频率高、易于被发现的突变现象。在生产中,叶色突变体可以应用于培育高效率光合作用品种以及作为杂交育种的标记性状,对提高种子的纯度和质量起重要作用。此外,色彩丰富、遗传稳定的叶色突变体大面积种植,可以用来作为观赏稻,致力于打造乡村休闲农业观光旅游点,助力农民增收、农业增效^[5]。

随着分子生物学、功能基因组学等的发展,国内外学者对叶色变异的分子遗传机制进行了深入研究,已成功鉴定到超过150个水稻叶绿素含量相关基因,分布于全部12条染色体^[6]。从突变机制来看,叶色变异主要是叶片叶绿素合成及叶绿体分化和发育受阻导致的。其中,已克隆的叶绿素合成相关的酶编码基因包括 *OsCAO1/PGL*^[7]、*OsPORB*^[8]、*OsDVR*^[9]、*YGL1*^[10]、*Chl1*、*Chl9*^[11]和 *OsCAO2*^[12]等。叶绿体分化和发育相关基因包括 *PsaA*、*PsaB*、*OsFLU1*、*OsPIL1*、*RbcL*、*VYL*、*NDH2*、*NDH4*、*YGL8*等,这些基因涉及光系统I和光系统II构成^[13],或参与叶绿体基因表达^[14-17],或在类囊体膜上参与膜结构基因表达、电子传递或光呼吸^[18, 19]。上述基因中, *OsCAO1/PGL*、*OsPORB*、*OsDVR*、*YGL1*、*Chl1*、*Chl9*、*OsPIL1*和 *YGL8*为单隐性基因。

黄化或白化转绿型是叶色突变中比较特殊的一类,水稻苗期叶片中缺乏叶绿素,表现黄化或白化,但植株生长发育到一定时期又能正常合成叶绿素,植株逐渐恢复绿色,最终表现为正常绿色。近期克隆的相关基因包括 HNH 核酸内切酶基因 *WSL9*^[20]、30S 核糖体蛋白 S1 基因 *ASL4*^[21]、类胡萝卜素异构酶基因 *OsCRTISO*^[22]、氨酰-tRNA 合成酶基因 *RAI*^[23]、丝氨酸-tRNA 合成酶基因 *TSCD11*^[24]等。

目前虽然已报道了较多水稻叶色突变体并克隆了相应基因,但是鉴于叶绿素代谢及叶绿体发育具体机制的复杂性,需要筛选和鉴定更多叶色突变种质资源并进行调控基因的克隆与分析,完善叶绿素合成、叶绿体结构发育的分子调控网络。

1 材料与方法

1.1 植物材料

突变体 818-6-8 是以粳稻品种金粳 818 为背景,

利用碱基编辑创制的低直链淀粉含量新材料且 T-DNA 已经剔除^[25]的后代中获得的,其黄叶转绿性状能稳定遗传。野生型金粳 818 和突变体 818-6-8 于 2022 年正季种植于江苏省农业科学院水稻实验基地条池,用于农艺性状调查。

1.2 叶绿素含量测定

取 100~200 mg 叶片称量后剪碎,放置于 5 mL 的 95%酒精中,黑暗处理 48 h。离心后取上清液,用分光光度计法测定叶绿素 a、b 及类胡萝卜素含量。

1.3 农艺性状测定

成熟期考查野生型和突变体的株高、每株分蘖数、每穗粒数、结实率和千粒重。

1.4 透射电子显微镜观察

在水稻 3 叶期,取第 2 叶,用 2.5%戊二醛 4℃ 下固定 48 h 以上,经锇酸后固定过夜,用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗,经过 30%、50%、70%、80%、90%、100%丙酮脱水,环氧树脂 SPURR 包埋,利用超薄切片机切片后用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,用 JEM-1230 透射电子显微镜观察、拍照。

1.5 遗传分析

利用 2022 年正季于江苏省农业科学院水稻试验基地条池中种植的水稻材料进行杂交(金粳 818/818-6-8, 818-6-8/金粳 818, 818-6-8/9311, 818-6-8/蜀恢 881)共计 4 个杂交组合,2023 年正季种植 F₁, 2024 年正季单株种植 F₂ 群体。统计 4 个 F₂ 群体中幼苗正常叶色和黄化叶色单株并作遗传分析。

1.6 混池测序及数据分析

以金粳 818 和 818-6-8 杂交构建的 F₂ 群体($n = 883$)为定位群体,采用 BSA (Bulked segregate analysis)法构建突变体和野生型 2 个子代 DNA 混池,各包含 30 个单株。样品送南京集思慧远生物科技有限公司(Genepioneer Biotechnologies)进行 DNA 提取、等量混合、基因组重测序、InDel 和 SNP 位点检测等。使用 SAMtools^[26]和 GATK^[27]软件进行 SNP 和 InDel 变体调用,保留高质量 SNP(读取深度 ≥ 5 ,基础质量值深度 ≥ 30)以供进一步分析。BSA-seq 分析采用基于 SNP-index 的基因定位方法^[28, 29],关联算法简述如下:

$Windex = \frac{\text{显性混池中隐性基因型频率}}{\text{显性混池中隐性基因型频率} + \text{显性混池中显性基因型频率}}$ 。

$Mindex = \frac{\text{隐性混池中隐性基因型频率}}{\text{隐性混池中隐性基因型频率} + \text{隐性混池中显性基因型频率}}$ 。

对在同一条染色体上的 SNP 标记 delta (SNP_index),进行 Loess 的回归拟合,选择 99%分位

数的阈值以上的区域作为与性状相关的关联区域。

1.7 转录组分析

在野生型和突变体 3 叶期, 取第 2 叶(野生型为绿叶, 突变体为黄叶), 在 5 叶期, 取第 4 叶(野生型和突变体均为绿叶), 分别进行转录组分析。每个样品 3 次重复。RNA 提取、建库、测序和数据分析委托南京集思慧远生物科技有限公司完成。使用 HTSeq 统计比对到每个基因, 得到 Read Count 值, 作为基因的原始表达量, 采用 FPKM(Fragments per kilo base per million fragments)方法对基因表达量进行标准化^[30]。利用 DESeq2^[31]对野生型和突变体中基因表达量进行差异分析, 差异表达基因(Differentially expressed genes, DEG)的筛选条件为基因表达量变化大于 2 倍($|\log_2\text{FoldChange}| > 1$), 显著性 $P < 0.05$ 。利用 Blast2 Go(<http://www.geneontology.org/>)对 DEG 进行 GO 功能注释, 利用 topGO 进行 GO 富集分析。利用 KAAS(<http://www.kegg.jp/kegg/genome/>)^[32]对 DEG 进行 KEGG 注释, 利用 KOBAS 软件进行代谢通路富集分析。

1.8 水稻叶片总 RNA 提取和荧光定量 PCR 分析

利用天根生化科技(北京)有限公司植物总

RNA 提取纯化试剂盒, 对野生型和突变体 3 叶期的第 2 叶进行叶片总 RNA 提取, 提取步骤见说明书。使用 TaKaRa 生物公司的反转录试剂盒(PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit)进行 RNA 反转录。内参基因为 *Actin* 基因, 在罗氏(Roche)公司 Light Cycler 480 PCR 仪上扩增, 按 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析基因的相对表达量, 每个样本 3 次重复。数据分析用 GraphPad Prism 9 和 Excel 2010 软件。所用引物如表 1 所示。

2 结果与分析

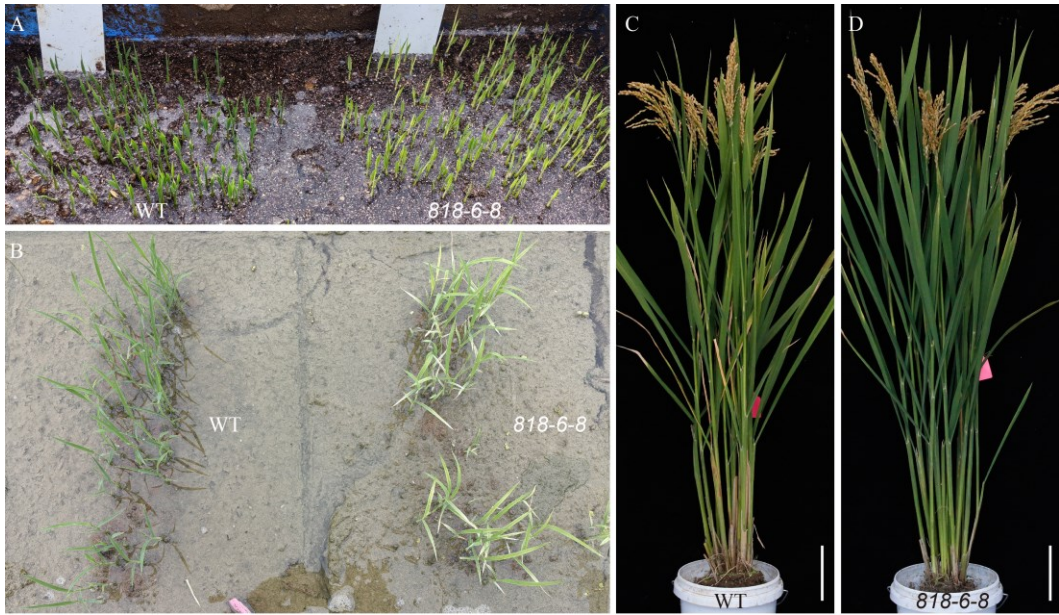
2.1 突变体 818-6-8 的表型分析

自然生长条件下, 突变体 818-6-8 幼苗 1 叶期(图 1-A)开始至 3 叶期, 叶片黄色, 而野生型叶片为正常绿色(图 1-B)。为了鉴定突变体黄叶是否由叶绿素含量变化引起, 测定 3 叶期叶片的叶绿素和类胡萝卜素含量。如表 2 所示, 818-6-8 叶绿素 a 含量与野生型无明显差异; 叶绿素 b 含量(0.147 mg/g)较野生型(0.953 mg/g)减少 84.58%, 总叶绿素含量(2.332 mg/g)较野生型(3.162 mg/g)下降 26.25%, 类

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1. Primer sequences for qRT-PCR

目标基因 Target gene	前引物 Forward primer (5'-3')	后引物 Reverse primer (5'-3')
<i>OsCAOI</i>	GATCCATACCCGATCGACAT	CGAGAGACATCCGGTAGAGC
<i>OsDVR</i>	AGCCCAGGTTCATCAAGGT	TGATCACCTCTCGAAGAACT
<i>OsYGLI</i>	TGTTGGTGGGTCCCTTGCTTT	ACTGAAGCCCCAGAGCTCTA
<i>OsPORA</i>	ATGGCTCTCCAAGTTCAG	TGGCTCACGCTAAGGAAC
<i>OsPORB</i>	CCGCAAGGAGGGAGCGGTG	CCTCTTGGTGCTAAGGCCG
<i>OsCHLH</i>	AACTGGATGAGCCAGAAGAGA	AAATGCAAAAGACTTTCGACT
<i>OsCHLD</i>	TCCTTTAGCTCACGGCCTTA	GTCCAACATCACCGCTCTTT
<i>OsNYCI</i>	TTTTGAGCGGTTCTTCTCAGA	CCTTTCACAACTCGCATCCT
<i>OsNYC3</i>	TCTATCTAGGTGCCAAAGGC	ATTCTGGCACCTGTGTGTTT
<i>OsNYC4</i>	CGTCTATGACCAACTCATGG	TGCGTCAGCTCTGTATTGCT
<i>OsNOL</i>	TCACAAGCCTTACGACCCAC	GCTCCCTCTCCATCATCTGC
<i>OsHEMA</i>	CGCTATTTCTGATGCTATGGGT	TCTTGGGTGATGATTGTTTGG
<i>OsPAO</i>	AAGCCTCCGATGTTACCGAA	CGAGGGTTTCCAGAATTGTA
<i>OsRCCR1</i>	GGATCGACGATTGATTTCATG	GTCGAGGCGTTCAGAAAGAT
<i>Actin</i>	TGGCATCTCTCAGCACATTCC	TGCACAATGGATGGGTCAGA
<i>rpoA</i>	CCATTCCCACAAGCAAAAAT	TCTTACCGCCTTCCGTAGAA
<i>rpoB</i>	TGGTACATATCCCTTATCTCAA	CTCCAGGACCCAAACAACCTC
<i>rbcL</i>	CTTGGCAGCATTCCGAGTAA	ACAACGGGCTCGATGTGATA
<i>rbcS</i>	GCTTGGAGTTCAGCAAGGTC	AACGAAGGCATCAGGGTATG
<i>PsaA</i>	TTAGAAATCCGCCAATCCA	TGCTAGGCTCTACAACCAAT
<i>PsaD</i>	CCGCTCCAAGTACAAGATCA	AAGAGCAGCCTGACAGATGA
<i>PsbA</i>	ACCCCTATTAGCAGATTTCGT	GATTGTATTCCAGGCAGAGC
<i>PsbD</i>	AAGACAGATTCCGAGGGTGG	TGATTGCTAGGGATTAAAGAG



A: 野生型金粳 818 (WT) 和突变体 818-6-8 幼苗期表型; B: 野生型金粳 818 (WT) 和突变体 818-6-8 的 3 叶期表型; C: 野生型金粳 818 (WT) 灌浆期植株, 标尺=10 cm; D: 突变体 818-6-8 灌浆期植株, 标尺=10 cm。
A, Phenotypes of wild type Jingeng 818 (WT) and mutant 818-6-8 at the seedling stage; B, Phenotypes of wild type Jingeng 818 (WT) and mutant 818-6-8 at the three-leaf stage; C, Wild type Jingeng 818 (WT) plant at the grain filling stage(bar=10 cm); D, Mutant 818-6-8 plant at the grain filling stage(bar=10 cm).

图 1 野生型金粳 818 和突变体 818-6-8 表型
Fig. 1. Phenotypes of the wild-type Jingeng 818 and the mutant 818-6-8

表 2 野生型金粳 818 和 818-6-8 的叶绿素含量

Table 2. Chlorophyll content in Jingeng 818 and 818-6-8				mg/g
材料	叶绿素 a 含量	叶绿素 b 含量	总叶绿素含量	类胡萝卜素含量
Material	Chlorophyll a content	Chlorophyll b content	Total chlorophyll content	Carotenoid content
WT	2.209±0.228	0.953±0.139	3.162±0.284	0.565±0.067
818-6-8	2.185±0.206 ns	0.147±0.023**	2.332±0.218**	0.038±0.010**

**表示差异极显著 ($P < 0.01$); ns 表示无显著性差异。
** indicate significant difference ($P < 0.01$); ns indicate no significant difference.

胡萝卜素含量(0.038 mg/g)较野生型(0.565 mg/g)降低 93.27%, 差异均达到极显著水平($P < 0.01$)。这表明突变体 818-6-8 幼苗期叶片黄化可能是其叶绿素 b 和类胡萝卜素含量下降导致的。

从 4 叶期开始, 818-6-8 叶片逐渐转绿, 最终与野生型无显著差异。至成熟期, 818-6-8 的植株形态(图 1-C、D)和基本农艺性状(包括株高、每株分蘖数、抽穗期、每穗粒数、结实率、千粒重等)与野生型相比, 均无显著差异(表 3)。

2.2 叶绿体超微结构分析

为了分析突变体叶色变化的细胞学机制, 利用透射电子显微镜观察叶肉细胞中叶绿体的超微结构。结果显示, 野生型叶绿体内部类囊体基粒片层结构清晰, 排列整齐紧凑, 片层结构间淀粉粒数量丰富(图 2-A、B); 而突变体的叶绿体数量较野生型偏少, 类囊体形态异常, 呈扁长形, 基粒片层结构

模糊, 淀粉粒数量显著减少(图 2-C、D)。上述结果表明, 818-6-8 中基因突变影响幼叶类囊体和基粒片层的发育, 导致叶绿体结构存在缺陷。

2.3 遗传分析

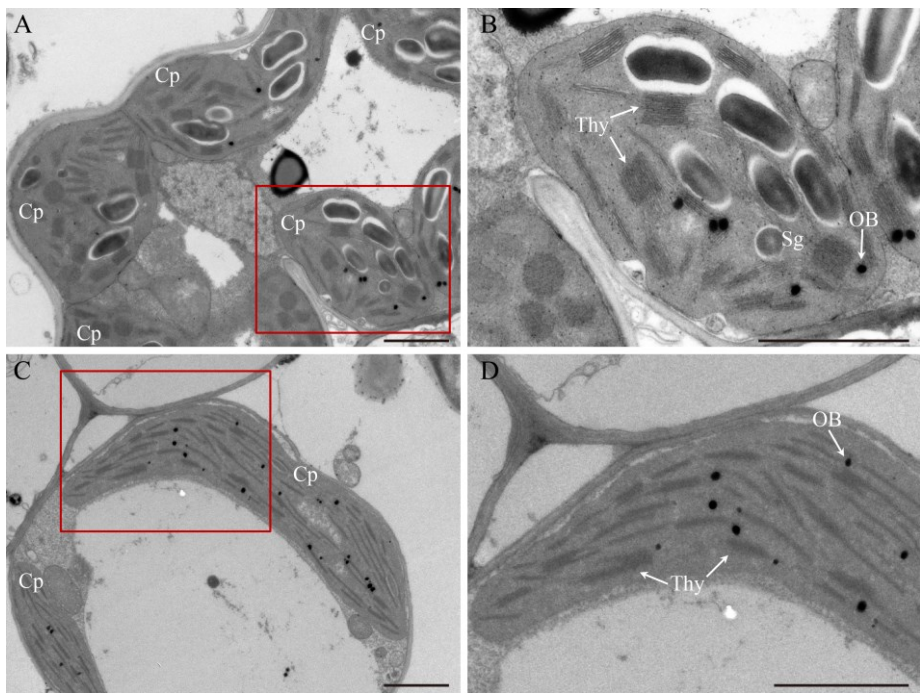
突变体 818-6-8 幼苗黄叶表型在不同年份种植过程中稳定遗传。以野生型金粳 818 为母本, 突变体 818-6-8 为父本杂交, F_1 代幼苗表现为正常绿色, F_2 群体分离出正常绿色和异常黄叶植株, 共计 883 个 F_2 单株中, 绿叶植株 679 株, 黄叶植株 204 株, 卡方测验表明符合 3 : 1 的分离比($\chi^2 = 2.73 < \chi^2_{0.05} = 3.84$)。此外, 以突变体 818-6-8 为母本, 分别与金粳 818、9311、蜀恢 881 进行杂交, 各自 F_1 均表现为幼苗正常绿色, F_2 中绿叶植株与黄叶植株比分别为 657 : 201, 836 : 253, 876 : 331, 均符合 3 : 1 的分离比($\chi^2 = 1.05 < \chi^2_{0.05} = 3.84$, $\chi^2 = 1.72 < \chi^2_{0.05} = 3.84$, $\chi^2 = 3.65 < \chi^2_{0.05} = 3.84$)(表 4)。上述结果表

表 3 野生型金粳 818 和 818-6-8 的部分农艺性状比较

Table 3. Comparison of some agronomic traits between Jingeng 818 and 818-6-8

农艺性状 Agronomic trait	金粳 818 Jingeng 818	818-6-8
株高 Plant height(cm)	96.8 ± 2.3	96.7 ± 2.4 ns
每株分蘖数 Tiller number per plant	12.1 ± 2.6	12.0 ± 2.1 ns
抽穗期 Heading date(d)	90.0 ± 1.0	89.0 ± 2.0 ns
每穗粒数 Number of grains per panicle	103.5 ± 5.8	106.0 ± 6.4 ns
结实率 Seed-setting rate(%)	95.2 ± 0.5	94.7 ± 1.6 ns
千粒重 1000-grain weight(g)	27.6 ± 1.4	27.9 ± 0.9 ns

ns 表示无显著性差异。
ns indicate no significant difference.



A: 野生型叶绿体超微结构; B: A 图中红框放大区域; C: 突变体叶绿体超微结构; D: C 图中红框放大区域。Cp: 叶绿体; Thy: 类囊体; OB: 嗜锇体; Sg: 淀粉粒。标尺= 2 μm。

A, Chloroplast ultrastructure in the wild type; B, The magnified image of the selected area in A; C, Chloroplast ultrastructure in mutant; D, The magnified image of the selected area in C. Cp, Chloroplast; Thy, Thylakoid lamellae; OB, Osmiphilic body; Sg, Starch granule. Bars = 2 μm.

图 2 野生型金粳 818 和突变体 818-6-8 叶绿体超微结构

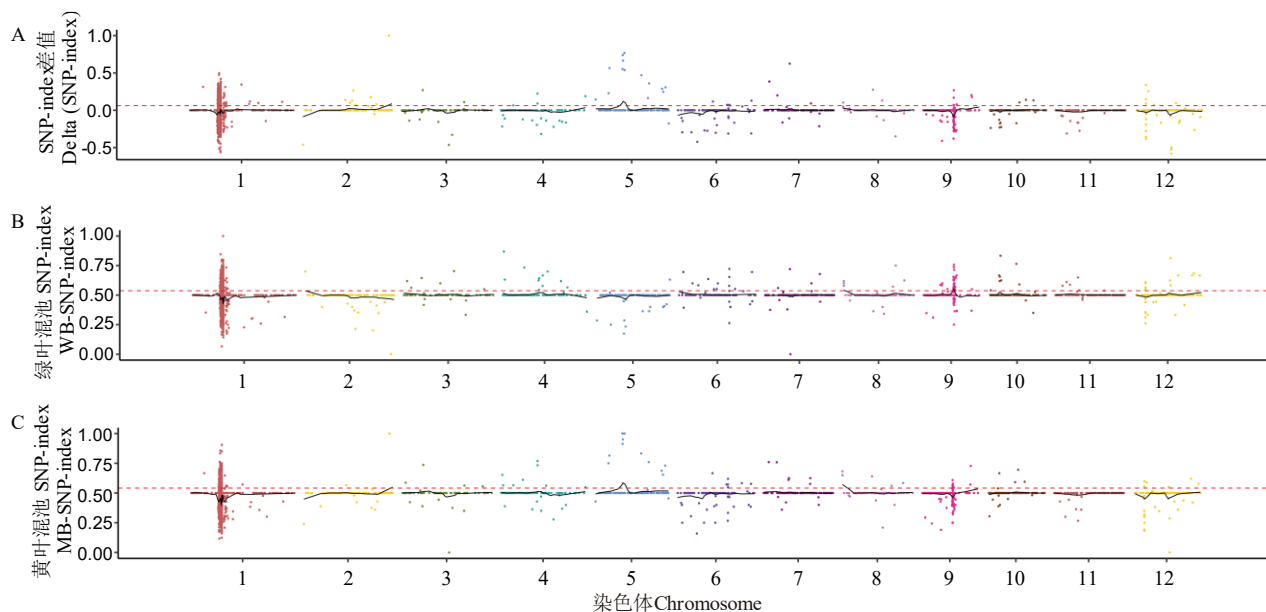
Fig. 2. TEM images of chloroplast structure in the wild-type Jingeng 818 and the mutant 818-6-8

表 4 818-6-8 和正常绿色品种杂交 F₂ 的叶色分离

Table 4. Segregation of leaf color in F₂ populations from the crosses between 818-6-8 and green leaf varieties

杂交组合 Material	总株数 Total number of plants	绿叶植株数 No. of green leaf plants	黄叶植株数 No. of yellow leaf plants	χ^2
金粳 818/818-6-8	883	679	204	2.73
Jingeng 818/818-6-8				
818-6-8/金粳 818	858	657	201	1.05
818-6-8/Jingeng 818				
818-6-8/9311	1089	836	253	1.72
818-6-8/蜀恢 881	1207	876	331	3.65
818-6-8/Shuhui 881				

$\chi^2_{0.05} = 3.84$ 。



A: Delta 拟合图; B: 显性性状样品的 SNP-index 拟合图; C: 隐性性状样品的 SNP-index 拟合图。图中横坐标表示染色体的位置; 散点表示计算得到 delta SNP-index 和 SNP-index 值; 黑色曲线表示相应的拟合值; 红色虚线表示 Loess 拟合值为 99% 的阈值线。

A, The delta fitting plot; B, The SNP-index fitting plot for dominant trait samples; C, The SNP-index fitting plot for recessive trait samples. The X axis represents the position of chromosomes; The scattered points represent the values of delta SNP-index and SNP-index; The black curves represent the corresponding fitting value; The red dashed lines represent the threshold line with a Loess fitting value of 99%.

图3 Delta SNP-index 和 SNP-index 在染色体上的分布

Fig. 3. Distribution of delta SNP-index and SNP-index on chromosomes

明, 突变体 818-6-8 幼苗黄叶表型受一对隐性核基因控制。

2.4 目的基因定位

在野生型金粳 818 和突变体 818-6-8 杂交的 F₂ 群体中, 3 叶期各取 30 个绿叶单株叶片和黄叶单株叶片, 分别构建野生型和突变型单株的 DNA 混池, 与亲本一起进行基因组重测序。将野生型混池、突变体混池和双亲的测序数据一起检测 InDel 和 SNP 位点, 共检测到 720 个 InDel 和 4144 个 SNP 位点。SNP 指数分析结果显示, 5 号染色体上 10037963–12329534 之间 2.29 Mb 的区间内, 检测到的 SNP 位点的 Delta SNP 指数较基因组其他区域明显增加, 表明幼苗黄叶性状关联的位点可能位于该区间内(图 3)。

上述 2.29 Mb 区间内共有 332 个基因, 其中有 329 个基因有功能注释(附表 1)。利用数据库功能注释进行分析 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>, <https://www.ricedata.cn/>), 发现其中已克隆基因有 11 个, 包括精细胞特异表达基因 *OsGCSI*^[33]、减数分裂过程起关键作用的含 SUN 结构域基因 *OsSUN1*^[34]、参与 ABA 介导的种子萌发和幼苗生长抑制的蛋白磷酸酶调节亚基因 *OsINH3*^[35]、生殖生长和逆境胁迫表达的水稻 DICER 相似蛋白基因

OsDCL1c^[36]、控制水稻生长和花粉发育的三角状五肽重复基因/内含子剪接因子 *OsPPR939*^[37]、介导水稻根系生长的细胞壁松弛蛋白编码基因 *OsEXPA3*^[38]、控制木质素阿魏酸酯的形成阿魏酰辅酶 A 木质素转移酶编码基因 *OsFMT*^[39]、水稻免疫反应负调控因子的 E3 泛素连接酶基因 *EBR1*^[40]、小 GTP 结合蛋白 *rgp2*^[41]、花粉管伸长相关的类受体激酶基因 *OsMTD2*^[42] 和非生物胁迫下调控制水稻根系发育的锌指蛋白编码基因 *OsZFP350*^[43]。此外, 区间内转座子和逆转座子数目较多, 分别有 28 个和 208 个。进一步对叶绿素合成、叶绿体结构发育等能引起叶色变异的功能注释基因进行筛选, 得到目标区间的候选基因如表 5 所示。

2.5 转录组分析

3 叶期取第 2 叶进行转录组测序与差异表达基因分析, 共筛选出 2090 个差异表达基因(附表 2)。与野生型金粳 818 相比, 突变体 818-6-8 中表达量上调的基因有 1343 个, 表达量下调的有 747 个(图 4)。

对差异表达基因进行 GO 富集分析, 按照生物学过程(Biological Process, BP)、细胞组分(Cell Component, CC)、分子功能(Molecular Function, MF)分类并富集分析。每项显示富集最显著的前 10 个

表 5 候选基因
Table 5. Candidate gene

基因编号 Gene ID	基因注释 Gene annotation	显著差异表达 Significantly differential expression
<i>LOC_Os05g18150</i>	BKRF1 编码类 EBNA-1 蛋白 BKRF1 Encodes an EBNA-1-like protein	否 No
<i>LOC_Os05g18294</i>	含 CRAL-TRIO 结构域的蛋白质 C589.09, 线粒体亚型 X4 C589.09, SEC14 细胞质因子家族蛋白, 推测, 表达 protein containing CRAL-TRIO domain, mitochondrial isoform X4, SEC14 cytosolic factor family protein, putative, expressed	否 No
<i>LOC_Os05g18470</i>	随机 Slug 蛋白, 含 CRAL/TRIO 结构域蛋白, 表达 5 Random Slug protein 5, Protein containing CRAL/TRIO domain, expressed	否 No
<i>LOC_Os05g18660</i>	未鉴定蛋白 LOC4338253, OsFBDUF24-F-box 和含 DUF 结构域蛋白, 表达 Uncharacterized protein LOC4338253, OsFBDUF24-F-box and DUF domain-containing protein, expressed	否 No
<i>LOC_Os05g18670</i>	S 型阴离子通道 SLAH4-like, C ₄ 二羧酸转运蛋白/含有苹果酸转运蛋白结构域蛋白, 表达 S-type anion channel SLAH4-like, C ₄ -dicarboxylate transporter/malate transporter domain-containing protein, expressed	否 No
<i>LOC_Os05g18750</i>	50S 核糖体蛋白 L25, 核糖体蛋白 L25, 推测, 表达 50S ribosomal protein L25, Ribosomal protein L25, putative, expressed	否 No
<i>LOC_Os05g18790</i>	Os05g0270800 甲酰基转移酶 Formyltransferase	否 No
<i>LOC_Os05g18850*</i>	水稻 DICER 相似蛋白基因 <i>OsDCL1c</i> Rice DICER-like protein gene <i>OsDCL1c</i>	升高 Increased
<i>LOC_Os05g18950</i>	含五肽重复序列的蛋白 At1g10330, 五肽, 推测, 表达 Protein containing pentatricopeptide repeat At1g10330, Pentatricopeptide, putative, expressed	否 No
<i>LOC_Os05g19150</i>	Os05g0273800 水解酶, 含有 α/β 折叠家族结构域蛋白, 表达 Hydrolase, alpha/beta fold family domain-containing protein, expressed	否 No
<i>LOC_Os05g19370</i>	60S 核糖体蛋白 L15, 60S 核糖体蛋白 L15, 推测表达 60S ribosomal protein L15, 60S ribosomal protein L15, putative, expressed	否 No
<i>LOC_Os05g19380</i>	含五肽重复序列的蛋白质 At2g18940, 叶绿体, 五肽, 推测, 表达 Protein containing pentatricopeptide repeat At2g18940, chloroplast, Pentatricopeptide, putative, expressed	否 No
<i>LOC_Os05g19390*</i>	三角状五肽重复蛋白 <i>OsPPR939</i> ; <i>OsPPR920</i> Pentatricopeptide repeat protein OsPPR939; OsPPR920	否 No
<i>LOC_Os05g19480</i>	过氧化物酶体生物发生蛋白 2, 过氧化物酶体组装蛋白, 推测, 表达 Peroxisome biogenesis protein 2, Peroxisome assembly protein, putative, expressed	否 No
<i>LOC_Os05g19954</i>	tRNA 假尿苷合酶 A1, tRNA 假尿苷合酶家族蛋白, 推测表达 tRNA pseudouridine synthase A1, tRNA pseudouridine synthase family protein, putative, expressed	否 No
<i>LOC_Os05g20100</i>	可能的甘油-3-磷酸酰基转移酶 3, 甘油-3-磷酸酰基转移酶, 推测, 表达 Probable glycerol-3-phosphate acyltransferase 3, Glycerol-3-phosphate acyltransferase, putative, expressed	否 No
<i>LOC_Os05g17604</i>	可能的 LRR 受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 At1g56130 亚型 X1, SHR5 受体样激酶, 推测表达 Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56130 isoform X1 SHR5 receptor-like kinase, putative, expressed	升高 Increased
<i>LOC_Os05g18274</i>	未知蛋白, 表达蛋白 Unknown protein, Expressed protein	升高 Increased
<i>LOC_Os05g19010</i>	Os05g0272300 表达蛋白, 阿魏酰辅酶 A 木质素转移酶 Expressed protein	升高 Increased
<i>LOC_Os05g19910*</i>	<i>OsFMT</i> ; <i>OsAT5</i> Feruloyl-CoA: monolignol transferase OsFMT; OsAT5	降低 Decreased

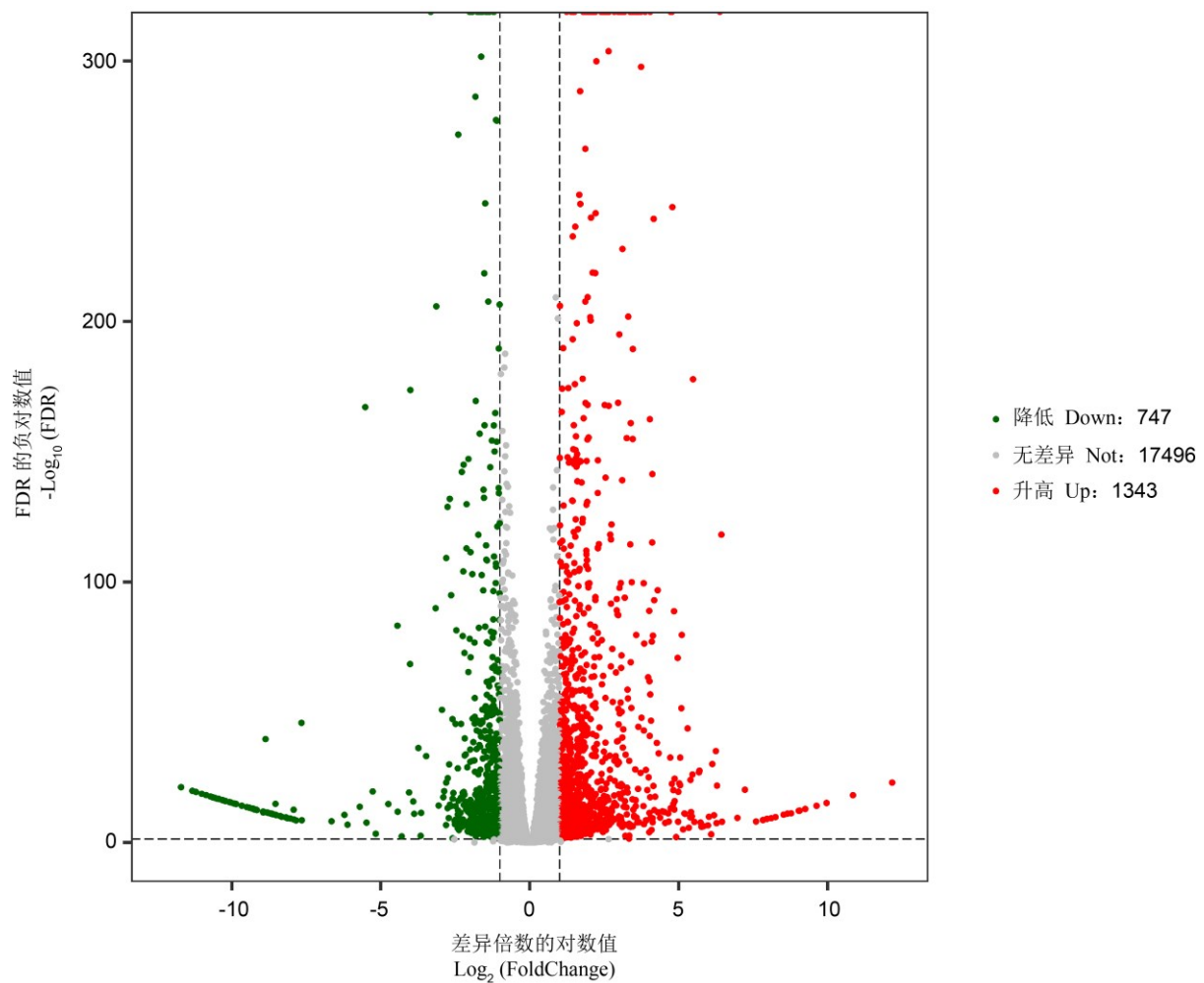
*已克隆基因。

* Cloned gene.

GO term(图 5)。在生物学过程类别中 DEG 显著富集在叶绿体组织、异戊烯基二磷酸生物合成、叶绿体靶向蛋白、质体转录等过程; 细胞组分类别中 DEG 显著富集在叶绿体、叶绿体基质、叶绿体膜、

叶绿体类囊体膜等区域; 在分子功能类别中 DEG 显著富集在铁离子结合、血红素结合、rRNA 结合等功能组中。

利用 KEGG 数据库对突变体和野生型中 DEG



红点表示显著上调的基因，绿点表示显著下调的基因，灰点表示表达量无显著差异的基因。
Red dots indicate significant up-regulated genes; the green dots indicate significant down-regulated genes; Gray dots indicate the genes with no significant difference in expression levels.

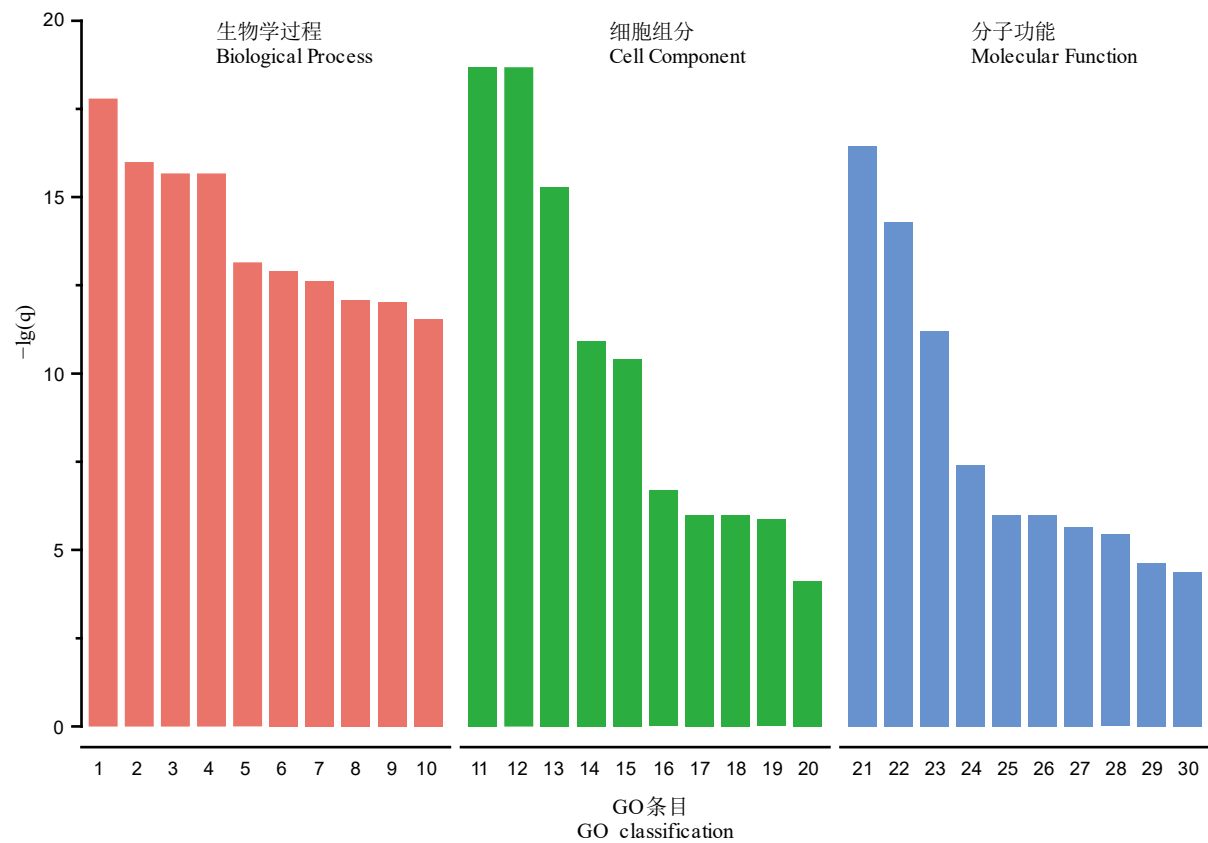
图4 突变体818-6-8与金粳818叶片中差异表达基因火山图
Fig. 4. Volcano map of DEG, in leaves of Jingeng 818 and 818-6-8

进行功能分类和通路注释，有 362 个 DEG 可以详细注释到 104 个通路类型。富集最显著的前 20 条通路中(图 6)，有 130 个 DEG 显著富集在新陈代谢通路中，如二萜生物合成、淀粉和蔗糖代谢、苯丙素生物合成和苯丙氨酸代谢等；有 73 个 DEG 显著富集在遗传信息处理，如核糖体、氨基酰基 tRNA 生物合成、RNA 降解和碱基切除修复等；16 个 DEG 显著富集在环境信号处理，参与植物 MAPK 信号通路。

5 叶期取第 4 叶(突变体已转绿)进行转录组测序，完成后进行差异表达基因分析，结果共筛选出 558 个差异表达基因(附表 3)。与野生型金粳 818 相比，突变体 818-6-8 中表达量上调的基因有 340 个，表达量下调的有 218 个(附图 1)。GO 富集分析结果显示，DEG 显著富集在脂质代谢过程等生物学过

程，胞外区等细胞组分区域，水解酶活性等分子功能类别(附图 2)。KEGG 通路富集分析显示，最显著的前 20 条通路中，有 52 个 DEG 显著富集在新陈代谢通路中，如角质层、木栓层和蜡的生物合成、苯丙素的生物合成等；有 5 个 DEG 显著富集在生物系统，参与植物-病原体相互作用；12 个 DEG 显著富集在环境信号处理，参与植物激素信号转导、植物 MAPK 信号通路(附图 3)。

利用上一结果中得到的 2.29 Mb 区间内有功能注释的 329 个基因及此结果中 DEG 进行联合分析，结果显示 329 个基因中有 5 个基因在黄叶中显著性差异表达(表 5，附表 2)，同时，该 5 个基因在突变体叶片转绿后与野生型相比表达量无差异(附表 3)。此外，利用在线网站(<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/Zapping/>)进行基因时空表达分析，部分结果如附



1: 叶绿体组织; 2: 异戊烯基二磷酸生物合成, 甲基赤藓糖醇 4-磷酸途径; 3: 叶绿体靶向蛋白; 4: 质体转录; 5: tRNA 代谢; 6: 核糖体核糖核酸; 7: 类囊体膜组织; 8: 氧化还原; 9: DNA 模板转录正向调控; 10: 蛋白质再折叠; 11: 叶绿体; 12: 叶绿体基质; 13: 叶绿体膜; 14: 叶绿体类囊体膜; 15: 细胞质; 16: 叶绿体类囊体腔; 17: 谷氨酰 tRNA (Gln) 氨基转移酶复合物; 18: 质体大核糖体亚基; 19: 类囊体膜的组分; 20: 叶绿体拟核; 21: 铁离子结合; 22: 血红素结合; 23: rRNA 结合; 24: 假尿苷合酶活性; 25: 氧化还原酶活性; 26: 多糖结合; 27: 单加氧酶活性; 28: 谷氨酰 tRNA 合酶 (谷氨酰胺水解) 活性; 29: 金属离子结合; 30: 氧化还原酶活性。

1, Chloroplast organization; 2, Isopentenyl diphosphate biosynthetic process, methylerythritol 4-phosphate pathway; 3, Protein targeting to chloroplast; 4, Plastid transcription; 5, tRNA metabolic process; 6, rRNA processing; 7, Thylakoid membrane organization; 8, Oxidation-reduction process; 9, Positive regulation of transcription, DNA-templated; 10, Protein refolding; 11, Chloroplast; 12, Chloroplast stroma; 13, Chloroplast envelope; 14, Chloroplast thylakoid membrane; 15, Cytoplasm; 16, Chloroplast thylakoid lumen; 17, Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase complex; 18, Plastid large ribosomal subunit; 19, Integral component of thylakoid membrane; 20, Chloroplast nucleoid; 21, Iron ion binding; 22, Heme binding; 23, rRNA binding; 24, Pseudouridine synthase activity; 25, Oxidoreductase activity, acting on paired donors; 26, Polysaccharide binding; 27, Monooxygenase activity; 28, Glutamyl-tRNA synthase (glutamine-hydrolyzing) activity; 29, Metal ion binding; 30, Oxidoreductase activity, acting on paired donors.

图 5 突变体 818-6-8 与金粳 818 叶片中差异表达基因 GO 功能分类

Fig. 5. GO functional classification of differentially expressed genes in leaves of Jingeng 818 and 818-6-8

图 4 所示。综上, 共计筛选得到 20 个候选基因(表 5), 突变体 818-6-8 幼苗黄叶性状可能为其中一个突变导致的。

2.6 叶绿素合成、叶绿体发育及光合作用相关基因表达

对叶绿素合成、叶绿体发育和光合作用相关基因的表达量进行检测(图 7)。结果显示, 与野生型相比, 818-6-8 叶绿素合成相关基因中 *OsYGLI*、*OsCHLH*、*OsCHLD* 等的表达水平显著升高, 而 *OsPORA* 的表达水平显著降低; 叶绿素降解相关基因 *OsNYC1* 和 *OsNYC3* 的表达量显著升高。在叶绿体发育和光合作用相关基因中, 与野生型相比, 突变体中 *rpoA*、*rpoB*、*rbcL*、*rbcS* 和 *PsaA* 表达水平显著升高, *PsbA* 的表达量略下降。上述结果表明,

突变体 818-6-8 中多个叶绿素合成、叶绿体发育及光合作用相关基因的表达出现紊乱。

3 讨论

由于多数水稻叶色突变体的叶色突变同时伴随产量降低, 甚至植株的死亡, 过去常被认为是无意义的突变, 其价值没有得到重视。随着近年来对于转绿型叶色突变体研究的深入, 其逐渐成为研究光合作用、光形态建成、质-核基因互作、叶绿素合成和叶绿体发育等基础研究的理想材料, 同时也能较好规避生产上无法应用的弊端。

水稻叶色突变体已有较多相关研究, 尽管导致叶绿素缺乏的原因各异, 但许多叶色突变体在细胞

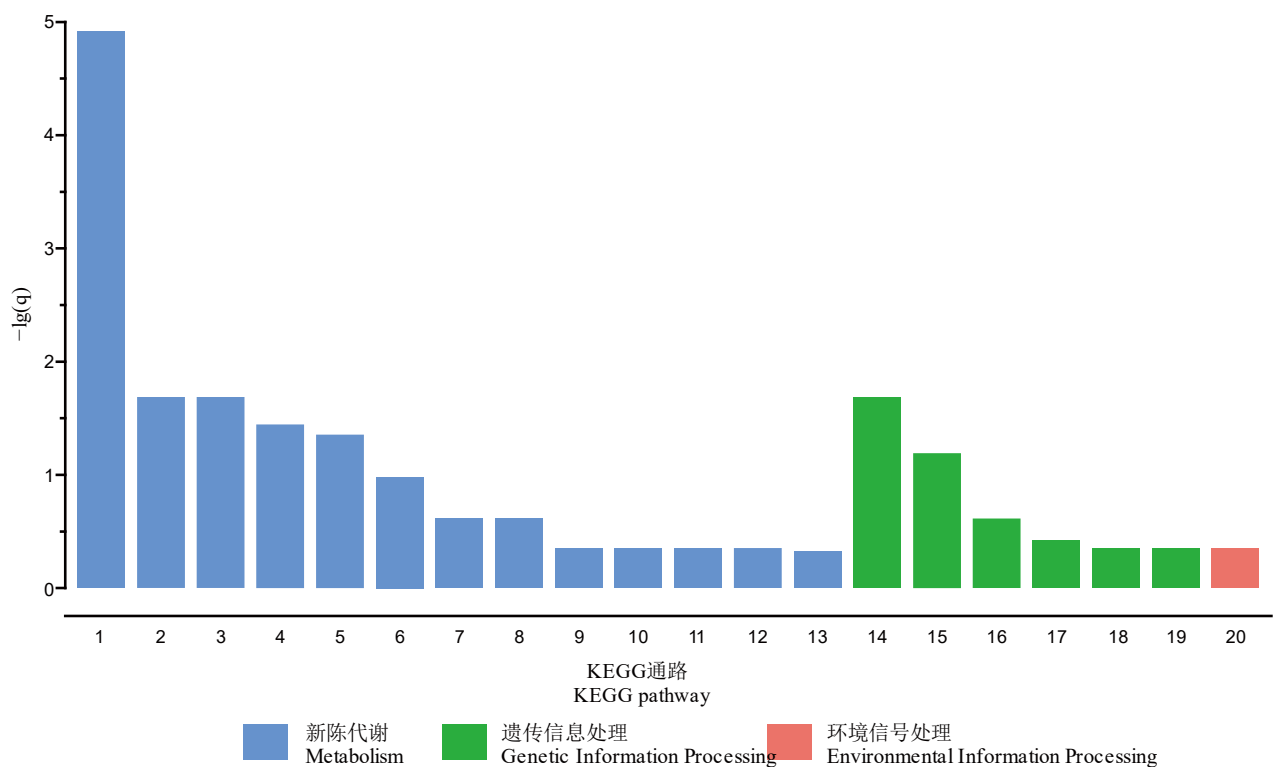
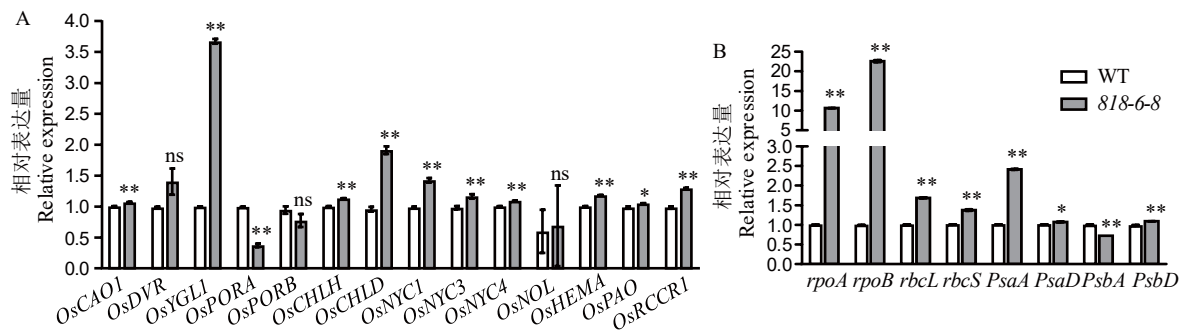


图 6 突变体 818-6-8 与金梗 818 叶片中差异表达基因 KEGG 通路富集分析
Fig. 6. KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes in leaves of Jingeng 818 and 818-6-8



A: 叶绿素合成相关基因的表达量; B: 叶绿体发育及光合作用相关基因的表达量。**表示差异极显著水平 ($P < 0.01$); *表示差异显著水平 ($P < 0.05$); ns 表示无显著性差异。
A, The expression levels of genes related to chlorophyll synthesis; B, The expression levels of genes related to chloroplast development and photosynthesis. ** indicate significant differences at 0.01 level; * indicate differences at 0.05 level; ns indicate no significant difference.

图 7 野生型金梗 818 和突变体 818-6-8 叶绿素合成、叶绿体发育及光合作用相关基因的表达量
Fig. 7. Expression levels of chlorophyll synthesis, chloroplast development and photosynthesis related genes in the wild-type Jingeng 818 and its mutant 818-6-8

学水平上表现出一致性或相似性^[4]。叶绿体形态/数目、类囊体的形态/数量/排列、基粒片层结构/层数等的变化是引起叶色变异的主要原因。如 YSA 编码一个含有 16 个串联 PPR 基序的三角状五肽重复 (pentatricopeptide repeat, PPR) 蛋白, ysa 突变体 3 叶期以前叶白化, 类囊体存在结构缺陷, 基粒片层堆

叠密度低^[4]。*WPI* 编码一个 Val-tRNA 合成酶 OsVALRS2。*wpl* 突变体幼苗出现淡绿色到白化表型, 叶和穗中质体变小, 形状异常, 无类囊体膜^[44]。类似地, 本研究中突变体 818-6-8 幼叶的叶绿体与野生型相比, 表现出类囊体呈扁长形、无明显类囊体膜结构、基粒片层无法清楚辨别等异常(图 2)。该细胞学结果与其幼苗黄叶表型(图 1)、总叶绿素含量降低(表 2)、第二叶转录组 DEG 的 GO 富集分析结果(图 5), 以及叶绿素合成、叶绿体发育和光合作用相关基因表达紊乱结果(图 7)一致。由此推测, 突变体中目标基因突变, 影响了叶绿素合成和叶绿体发育相关基因的正常表达, 进而导致叶绿体发育异常、叶绿素合成受阻, 最终引起幼苗黄叶表型。

本研究还对突变体转为绿色的叶片进行了转录组分析(附图 1~3)。与利用第 2 叶进行的转录组分析结果(图 4~6)相比, 该结果中 DGE 数量明显减少, 富集的 GO term 和 KEGG 通路也明显不同。上述结果推测, 与叶片为绿色的野生型相比, 突变体黄叶中大多数 DEG 是由于目标基因突变引起的。鉴于上一个研究中被编辑的靶基因(*Wx*, *LOC_Os06g04200*)主要在籽粒中表达, 在叶片和幼苗中表达量较低, 推测突变体叶片转绿后的 DEG 并非由该靶基因被编辑所致, 而可能是组培突变或基因编辑过程中未知因素引起的脱靶效应导致的。

BSA-seq 分析结果表明, 突变体幼苗黄叶性状关联的位点位于 5 号染色体上 10037963–12329534 之间 2.29 Mb 的区间内(图 3), 进一步在该区间内筛选得到 20 个候选基因(表 5)。其中, *LOC_Os05g18294* 为拟南芥叶绿体 Sec14-like 磷脂酰肌醇转移蛋白编码基因 *AtPITP7*^[45] 的同源基因; 同时, 该基因与候选基因中 *LOC_Os05g18470* 编码的蛋白都含有 CRAL/TRIO 结构域, 含有该结构域的已报道基因 *OsTPT1*, 被证明在叶片和胚芽鞘等组织中高表达, 编码蛋白定位在叶绿体内膜^[46]。*LOC_Os05g18670* 编码蛋白含有 C₄-二羧酸转运蛋白/苹果酸转运蛋白功能域, 与该功能域关联的 *SLAC7* 被报道是一个光响应基因, 对于维持水稻叶绿体的稳定性十分重要, 敲低 *SLAC7* 表达会导致叶绿素含量、光合效率以及 *F_v/F_m* 比例均显著降低^[47], 同样与该功能域关联的阴离子通道蛋白编码基因 *OsSLAC1* 在茎基部包括发育叶片中有较高表达^[48], 功能缺失突变体出现早衰表型, 叶片的光合色素含量和净光合速率显著下降^[49]。*LOC_Os05g18750* 和 *LOC_Os05g19370* 被注释为核糖体蛋白, 已克隆的核糖体蛋白编码基因 *ASL4* 定位在叶绿体, 对叶绿体核

糖体的生物发生和叶绿体早期发育至关重要^[21]。*LOC_Os05g18850* 为已克隆的水稻 DICER 相似蛋白基因 *OsDCL1c*^[36], 其所在家族其他成员参与水稻叶片原基发育、小 RNA 生物发生、株型控制等^[50–53]。*LOC_Os05g18950* 被预测为 PPR 编码基因, 同时, *LOC_Os05g19390* 为已克隆的 PPR 编码基因 *OsPPR939*, 前人研究中已有多个 PPR 基因, 包括 *YSA*^[4]、*WSL*^[54]等, 被证明与水稻叶色直接相关。*LOC_Os05g19150* 注释为一类水解酶基因, 相关联的乙酰胆碱酯酶编码基因 *ACHE* 被证明主要在水稻幼苗早期生长和发育阶段发挥功能^[55]。*LOC_Os05g19480* 注释与过氧化物酶体相关联, 前人研究表明抗坏血酸过氧化物酶编码基因 *OsAPX4* 在叶片中表达水平最高, RNAi*OsAPX4* 转基因植株表现早衰表型, 黄叶数量多, 叶绿素含量积累低^[56]。一般而言, SNP/InDel 同样能影响附近基因的表达。本研究利用 BSA-Seq 和转录组结果进行联合分析, 筛选得到突变体黄叶中显著差异表达而在转绿叶片中无表达差异的基因 5 个, 同样将其列为了候选基因。

此外, 基因时空表达情况同样是对候选基因进行筛选的重要因素, 本研究中利用在线网站对 20 个候选基因进行分析, 发现 *LOC_Os05g18150*、*LOC_Os05g20100* 等多个基因在幼苗、叶片等绿色组织中并不表达(附图 4), 上述结果将在后续研究中进行确认。

综上, 研究人员将进一步重点鉴定和分析本研究得到的候选基因, 以期克隆导致突变体 818-6-8 幼苗黄叶的目标基因。

在线辅助性信息: 附图 1~4 和附表 1~3 请见《中国水稻科学》网站(<http://www.ricesci.cn>)。

参考文献:

- [1] 徐娜, 徐江民, 蒋玲欢, 饶玉春. 水稻叶片早衰成因及分子机理研究进展[J]. 植物学报, 2017, 52(1): 102–112. Xu N, Xu J M, Jiang L H, Rao Y C. Advances in understanding leaf premature senescence and its molecular mechanism in rice[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2017, 52(1): 102–112. (in Chinese with English abstract)
- [2] 周亭亭, 饶玉春, 任德勇. 水稻卷叶细胞学与分子机制研究进展[J]. 植物学报, 2018, 53(6): 848–855. Zhou T T, Rao Y C, Ren D Y. Research advances in the cytological and molecular mechanisms of leaf rolling in rice[J]. *Bulletin of Botany*, 2018, 53(6): 848–855. (in Chinese)
- [3] 张萍, 柳梦林, 叶胜海, 翟荣荣, 朱国富, 叶靖, 张小

- 明. 水稻叶色突变体研究进展[J]. 分子植物育种, 2021, 19(17): 5712-5719.
- Zhang P, Liu M L, Ye S H, Zhai R R, Zhu G F, Ye J, Zhang X M. Research progress of rice leaf color mutants[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(17): 5712-5719. (in Chinese with English abstract)
- [4] Su N, Hu M L, Wu D X, Wu F Q, Fei G L, Lan Y, Chen X L, Shu X L, Zhang X, Guo X P, Cheng Z J, Lei C L, Qi C K, Jiang L, Wang H, Wan J M. Disruption of a rice pentatricopeptide repeat protein causes a seedling-specific albino phenotype and its utilization to enhance seed purity in hybrid rice production[J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(1): 227-238.
- [5] 戴红燕, 华劲松. 对观赏稻的认识和思考[J]. 作物杂志, 2020(4): 1-8.
- Dai H Y, Hua J S. Understanding and thinking about ornamental rice[J]. *Crops*, 2020(4): 1-8. (in Chinese with English abstract)
- [6] 杨颜榕, 黄纤纤, 赵亚男, 汤佳玉, 刘喜. 水稻叶色基因克隆与分子机制研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2020, 21(4): 794-803.
- Yang Y R, Huang X X, Zhao Y N, Tang J Y, Liu X. Advances on gene isolation and molecular mechanism of rice leaf color genes[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(4): 794-803. (in Chinese)
- [7] Yang Y, Xu J, Huang L, Leng Y, Dai L, Rao Y, Chen L, Wang Y, Tu Z, Hu J, Ren D, Zhang G, Zhu L, Guo L, Qian Q, Zeng D. PGL, encoding chlorophyllide a oxygenase 1, impacts leaf senescence and indirectly affects grain yield and quality in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(5): 1297-1310.
- [8] Sakuraba Y, Rahman M L, Cho S H, Kim Y S, Koh H J, Yoo S C, Paek N C. The rice faded green leaf locus encodes protochlorophyllide oxidoreductase B and is essential for chlorophyll synthesis under high light conditions[J]. *The Plant Journal*, 2013, 74(1): 122-133.
- [9] Wang P, Gao J, Wan C, Zhang F, Xu Z, Huang X, Sun X, Deng X. Divinyl chlorophyll(ide) a can be converted to monovinyl chlorophyll(ide) a by a divinyl reductase in rice[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(3): 994-1003.
- [10] Wu Z, Zhang X, He B, Diaol L, Sheng S, Wang J, Guo X, Su N, Wang L, Jiang L, Wang C, Zhai H, Wan J. A chlorophyll-deficient rice mutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(1): 29-40.
- [11] Zhang H, Li J, Yoo J H, Yoo S C, Cho S H, Koh H J, Seo H S, Paek N C. Rice Chlorina-1 and Chlorina-9 encode ChlD and ChlI subunits of Mg-chelatase, a key enzyme for chlorophyll synthesis and chloroplast development[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 62(3): 325-337.
- [12] Lee S, Kim J H, Yoo E S, Lee C H, Hirochika H, An G. Differential regulation of chlorophyll a oxygenase genes in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 57(6): 805-818.
- [13] Webber A N, Malkin R. Photosystem I reaction-centre proteins contain leucine zipper motifs: A proposed role in dimer formation[J]. *FEBS Letters*, 1990, 264(1): 1-4.
- [14] Li Z, Mo W, Jia L, Xu Y C, Tang W, Yang W, Guo Y L, Lin R. Rice FLUORESCENT1 is involved in the regulation of chlorophyll[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2019, 60(10): 2307-2318.
- [15] Sakuraba Y, Kim E Y, Han S H, Piao W, An G, Todaka D, Yamaguchi-Shinozaki K, Paek N C. Rice Phytochrome-Interacting Factor-Like1 (*OsPIL1*) is involved in the promotion of chlorophyll biosynthesis through feed-forward regulatory loops[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(15): 4103-4114.
- [16] Andersson I, Backlund A. Structure and function of rubisco[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46(3): 275-291.
- [17] Dong H, Fei G L, Wu C Y, Wu F Q, Sun Y Y, Chen M J, Ren Y L, Zhou K N, Cheng Z J, Wang J L, Jiang L, Zhang X, Guo X P, Lei C L, Su N, Wang H, Wan J M. A rice virescent-yellow leaf mutant reveals new insights into the role and assembly of plastid caseinolytic protease in higher plants[J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(4): 1867-1880.
- [18] Peng L, Yamamoto H, Shikanai T. Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1807(8): 945-953.
- [19] Zhu X, Guo S, Wang Z, Du Q, Xing Y, Zhang T, Shen W, Sang X, Ling Y, He G. Map-based cloning and functional analysis of *YGL8*, which controls leaf colour in rice (*Oryza sativa*)[J]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1): 134.
- [20] Zhu X, Mou C, Zhang F, Huang Y, Yang C, Ji J, Liu X, Cao P, Nguyen T, Lan J, Zhou C, Liu S, Jiang L, Wan J. *WSL9* encodes an HNH endonuclease domain-containing protein that is essential for early chloroplast development in rice[J]. *Rice*, 2020, 13(1): 45.
- [21] Zhou K, Zhang C, Xia J, Yun P, Wang Y, Ma T, Li Z. Albino seedling lethality 4; chloroplast 30S ribosomal protein S1 is required for chloroplast ribosome biogenesis and early chloroplast development in rice[J]. *Rice*, 2021, 14(1): 47.
- [22] Yin C C, Ma B, Collinge D P, Pogson B J, He S J, Xiong Q, Duan K X, Chen H, Yang C, Lu X, Wang Y Q, Zhang W K, Chu C C, Sun X H, Fang S, Chu J F, Lu T G, Chen S Y, Zhang J S. Ethylene responses in rice roots and coleoptiles are differentially regulated by a carotenoid isomerase-mediated abscisic acid pathway[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(4): 1061-1081.
- [23] Zheng H, Wang Z, Tian Y, Liu L, Lv F, Kong W, Bai W, Wang P, Wang C, Yu X, Liu X, Jiang L, Zhao Z, Wan J.

- Rice albino 1*, encoding a glycyl-tRNA synthetase, is involved in chloroplast development and establishment of the plastidic ribosome system in rice[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 139: 495-503.
- [24] Fang G, Yang S, Ruan B, Liu C, Zhang A, Jiang H, Ding S, Tian B, Zhang Y, Jahan N, Zhu L, Zhang G, Dong G, Zhang Q, Zeng D, Guo L, Gao Z, Qian Q. Isolation of *TSCD11* gene for early chloroplast development under high temperature in rice[J]. *Rice*, 2020, 13(1): 49.
- [25] Xu Y, Lin Q, Li X, Wang F, Chen Z, Wang J, Li W, Fan F, Tao Y, Jiang Y, Wei X, Zhang R, Zhu Q H, Bu Q, Yang J, Gao C. Fine-tuning the amylose content of rice by precise base editing of the *Wx* gene[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(1): 11-13.
- [26] Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. The sequence alignment/map format and SAMtools[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(16): 2078-2079.
- [27] McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo M A. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. *Genome Research*, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [28] Fekih R, Takagi H, Tamiru M, Abe A, Natsume S, Yaegashi H, Sharma S, Sharma S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Mitsuoka C, Utsushi H, Uemura A, Kanzaki E, Kosugi S, Yoshida K, Cano L, Kamoun S, Terauchi R. MutMap+: Genetic mapping and mutant identification without crossing in rice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68529.
- [29] Takagi H, Uemura A, Yaegashi H, Tamiru M, Abe A, Mitsuoka C, Utsushi H, Natsume S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Yoshida K, Cano L M, Kamoun S, Terauchi R. MutMap-Gap: Whole-genome resequencing of mutant F₂ progeny bulk combined with *de novo* assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii*[J]. *The New Phytologist*, 2013, 200(1): 276-283.
- [30] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren M J, Salzberg S L, Wold B J, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(5): 511-515.
- [31] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [32] Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa A C, Kanehisa M. KAAS: An automatic genome annotation and pathway reconstruction server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35: W182-W185.
- [33] Wong J L, Leydon A R, Johnson M A. HAP2(GCS1)-dependent gamete fusion requires a positively charged carboxy-terminal domain[J]. *PLoS Genetics*, 2010, 6(3): e1000882.
- [34] Zhang F, Ma L, Zhang C, Du G, Shen Y, Tang D, Li Y, Yu H, Ma B, Cheng Z. The SUN domain proteins OsSUN1 and OsSUN2 play critical but partially redundant roles in meiosis[J]. *Plant Physiology*, 2020, 183(4): 1517-1530.
- [35] Jadoon S, Qin Q, Shi W, Yan L, Hou S. Rice protein phosphatase 1 regulatory subunits OsINH2 and OsINH3 participate actively in growth and adaptive responses under abscisic acid[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 990575.
- [36] Kapoor M, Arora R, Lama T, Nijhawan A, Khurana J P, Tyagi A K, Kapoor S. Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 451.
- [37] Zheng P, Liu Y, Liu X, Huang Y, Sun F, Wang W, Chen H, Jan M, Zhang C, Yuan Y, Tan B C, Du H, Tu J. OsPPR939, a nad5 splicing factor, is essential for plant growth and pollen development in rice[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134(3): 923-940.
- [38] Qiu S, Ma N, Che S, Wang Y, Peng X, Zhang G, Wang G, Huang J. Repression of *OsEXPA3* expression leads to root system growth suppression in rice[J]. *Crop Science*, 2014, 54(5): 2201-2213.
- [39] Smith R A, Beebe E T, Bingman C A, Vander Meulen K, Eugene A, Steiner A J, Karlen S D, Ralph J, Fox B G. Identification and characterization of a set of monocot BAHD monolignol transferases[J]. *Plant Physiology*, 2022, 189(1): 37-48.
- [40] You Q, Zhai K, Yang D, Yang W, Wu J, Liu J, Pan W, Wang J, Zhu X, Jian Y, Liu J, Zhang Y, Deng Y, Li Q, Lou Y, Xie Q, He Z. An E3 ubiquitin ligase-BAG protein module controls plant innate immunity and broad-spectrum disease resistance[J]. *Cell Host & Microbe*, 2016, 20(6): 758-769.
- [41] Youssefian S, Nakamura M, Sano H. Molecular characterization of *rgp2*, a gene encoding a small GTP-binding protein from rice[J]. *Molecular & General Genetics*, 1993, 237(1/2): 187-192.
- [42] Kim Y J, Kim M H, Hong W J, Moon S, Kim S T, Park S K, Jung K H. OsMTD2-mediated reactive oxygen species (ROS) balance is essential for intact pollen-tube elongation in rice[J]. *The Plant Journal*, 2021, 107(4): 1131-1147.
- [43] Kang Z, Qin T, Zhao Z. Overexpression of the zinc finger protein gene *OsZFP350* improves root development by

- increasing resistance to abiotic stress in rice[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2019, 66(2): 183-190.
- [44] Wang Y, Wang C, Zheng M, Lyu J, Xu Y, Li X, Niu M, Long W, Wang D, Wang H, Terzaghi W, Wang Y, Wan J. WHITE PANICLE1, a val-tRNA synthetase regulating chloroplast ribosome biogenesis in rice, is essential for early chloroplast development[J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(4): 2110-2123.
- [45] Yang M, Sakruaba Y, Ishikawa T, Ohtsuki N, Kawai-Yamada M, Yanagisawa S. Chloroplastic Sec14-like proteins modulate growth and phosphate deficiency responses in *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Physiology*, 2023, 192(4): 3030-3048.
- [46] Wang Q, Chen J, Wang X, Sun J, Sha W. Molecular cloning and expression analysis of the rice triose phosphate/phosphate translocator gene[J]. *Plant Science*, 2002, 162(5): 785-790.
- [47] Fan X, Wu J, Chen T, Tie W, Chen H, Zhou F, Lin Y. Loss-of-function mutation of rice SLAC7 decreases chloroplast stability and induces a photoprotection mechanism in rice[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2015, 57(12): 1063-1077.
- [48] Kusumi K, Hirotsuka S, Kumamaru T, Iba K. Increased leaf photosynthesis caused by elevated stomatal conductance in a rice mutant deficient in SLAC1, a guard cell anion channel protein[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(15): 5635-5644.
- [49] Zhang Y, Chen X, Du D, Ma L, He G. Identification and cloning of early senescence leaf mutant *esl13* in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Crop Science*, 2023, 63(3): 1102-1113.
- [50] Itoh J I, Kitano H, Matsuoka M, Nagato Y. SHOOT ORGANIZATION genes regulate shoot apical meristem organization and the pattern of leaf primordium initiation in rice[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(11): 2161.
- [51] Nagasaki H, Itoh J, Hayashi K, Hibara K, Satoh-Nagasawa N, Nosaka M, Mukouhata M, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M, Nagato Y, Sato Y. The small interfering RNA production pathway is required for shoot meristem initiation in rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(37): 14867-14871.
- [52] Song X, Li P, Zhai J, Zhou M, Ma L, Liu B, Jeong D, Nakano M, Cao S, Liu C, Chu C, Wang X, Green P J, Meyers B C, Cao X. Roles of DCL4 and DCL3b in rice phased small RNA biogenesis[J]. *The Plant Journal*, 2012, 69(3): 462-474.
- [53] Wei L, Gu L, Song X, Cui X, Lu Z, Zhou M, Wang L, Hu F, Zhai J, Meyers B C, Cao X. Dicer-like 3 produces transposable element-associated 24-nt siRNAs that control agricultural traits in rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(10): 3877-3882.
- [54] Wang Y, Ren Y, Zhou K, Liu L, Wang J, Xu Y, Zhang H, Zhang L, Feng Z, Wang L, Ma W, Wang Y, Guo X, Zhang X, Lei C, Cheng Z, Wan J. WHITE STRIPE LEAF4 encodes a novel P-type PPR protein required for chloroplast biogenesis during early leaf development[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1116.
- [55] Yamamoto K, Shida S, Honda Y, Shono M, Miyake H, Oguri S, Sakamoto H, Momonoki Y S. Overexpression of acetylcholinesterase gene in rice results in enhancement of shoot gravitropism[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 465(3): 488-493.
- [56] Ribeiro C W, Korbes A P, Garighan J A, Jardim-Messeder D, Carvalho F E L, Sousa R H V, Caverzan A, Teixeira F K, Silveira J A G, Margis-Pinheiro M. Rice peroxisomal ascorbate peroxidase knockdown affects ROS signaling and triggers early leaf senescence[J]. *Plant Science*, 2017, 263: 55-65.