

水稻低温白化突变体 *lta1* 的表型鉴定与基因定位

曹鹏辉¹, 郜素², 于雅洁¹, 陈雯静², 宋云生¹, 冯亚婷², 杜坛潇², 乔中英¹, 刘喜²

(¹江苏太湖地区农业科学研究所作物育种与栽培研究室, 苏州 215155; ²淮阴师范学院生命科学学院, 江苏淮安 223300)

摘要: 近年来, 全球低温极端气候频发, 对水稻生产带来严重的影响。低温严重限制了水稻种植区域的扩大。因此, 鉴定克隆水稻低温发育相关基因, 阐明其分子机理, 可为水稻低温分子育种奠定理论基础。本研究从水稻日本晴化学诱变突变体库筛选鉴定到1个低温叶片白化的突变体 *lta1* (*Low temperature albinism 1*)。相比野生型, 在 20 °C 生长条件下, 突变体 *lta1* 叶片白化, 叶绿素含量显著降低, 叶绿体结构发育异常; 在 30 °C 生长条件下, 突变体 *lta1* 与野生型生长无显著差异。通过图位克隆将突变基因 *lta1* 定位在第3号染色体短臂 InDel 标记 LTA1-3 与 LTA1-7 之间, 物理距离为 132 kb。基于水稻基因表达数据库, 在 132 kb 区间内有 17 个候选基因, 其中有 6 个候选基因翻译的蛋白可能定位于叶绿体。实时荧光定量 PCR 结果表明多数叶绿体编码基因的表达在突变体中受到显著抑制, 而多数叶绿素合成相关基因的表达未发生显著变化。本研究结果为进一步克隆 *LTA1* 基因与揭示水稻低温下叶绿体发育的机理提供可能。

关键词: 水稻; 低温; 叶绿体发育; *LTA1*

Phenotypic Identification and Genetic Mapping of Rice Low Temperature Albinism Mutant *lta1*

CAO Peng-hui¹, GAO Su², YU Ya-jie¹, CHEN Wen-jing², SONG Yun-sheng¹,
FENG Ya-ting², DU Tan-xiao², QIAO Zhong-ying¹, LIU Xi²

(¹Crop Breeding and Cultivation Research Laboratory, Taihu Agricultural Research Institute of Jiangsu, Suzhou 215155;

²College of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Jiangsu Huai'an 223300)

Abstract: In recent years, the global low temperature extreme weather occurs frequently, destabilizing the rice production. Low temperature is a factor that restricts the expansion of rice planting areas. Therefore, the identification and cloning of genes related to low-temperature and the elucidation of their molecular mechanism might lay a theoretical foundation in low-temperature molecular breeding of rice. In this study, a mutant *lta1* (*low temperature albinism 1*) showing low temperature leaf albinism was identified from the chemically-induced mutagenesis mutant library of rice Nipponbare. Compared with the wild type, the *lta1* mutant displayed albino leaves with significantly reduced chlorophyll content, and abnormal chloroplast structure development at 20 °C, whereas there was no significant difference between *lta1* and wild type at 30 °C. Through map-based cloning, the mutant gene *lta1* was allocated between the insertion/deletion markers LTA1-3 and LTA1-7 on the short arm of chromosome 3, with a physical distance of 132 kb. Based on the rice gene expression database, 17 candidate genes in the region were annotated, and the proteins of six candidate genes were proposed to be localized in chloroplasts. Real-time fluorescence quantitative PCR showed that most chloroplast encoding genes were observed with lower transcripts in the mutant, while most chlorophyll synthesis related genes did not change

收稿日期: 2022-08-02 修回日期: 2022-10-13 网络出版日期: 2022-10-28

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220802002>

第一作者研究方向为水稻分子育种, E-mail: salute272@163.com

通信作者: 刘喜, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: 1240623244@qq.com

乔中英, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: qiaozhongying@163.com

基金项目: 苏州市科技计划项目 (SNG2020048, SNG201914); 江苏省大学生创新实验计划 (202110323059Y)

Foundation projects: Science and Technology Foundation Project of Suzhou (SNG2020048, SNG201914); The Jiangsu University Student Innovation Program (202110323059Y)

significantly. Our results provide a possibility for further cloning the *LTA1* gene and revealing the mechanism of chloroplast development in rice under low temperature.

Key words: rice; low temperature; chloroplast development; *LTA1*

当前新冠病毒肆虐全球,局部战争时有发生,加剧了全球粮食短缺。水稻是我国最重要的粮食作物之一,保持水稻稳产高产是保障我国粮食安全的重要举措^[1]。然而,低温等非生物胁迫发生频率越来越高,严重影响水稻生产^[2]。在低温下水稻叶绿素合成和叶绿体发育受到抑制,导致植株不能进行光合作用,最终死亡^[3-4]。因此,鉴定克隆水稻低温叶绿素合成和叶绿体发育相关基因,阐明其分子调控机理,可为水稻分子育种奠定坚实的理论基础。叶色突变体是研究水稻叶绿素合成和叶绿体发育的理想材料,可以分为白化、黄化、条纹、温敏型叶色突变体等^[5-6]。温敏型叶色突变体表现为低温或高温敏感,在特定的温度下生长出现异常的叶色表型,而在正常温度下生长无异常的叶色表型。目前,在水稻中,研究者通过自然突变、化学诱变、T-DNA插入等方法分离鉴定了一些低温叶色突变体,进而克隆了至少20个控制这些突变体表型的基因,如 *TSV2*、*Temperature-sensitive virescent (TSV)*、*White stripe leaf5 (WSL5)*、*Thermo-sensitive chlorophyll-deficient (TCD3)*^[7-10]。*TSV*编码1个叶绿体定位的单加氧酶,通过与质体硫氧还蛋白OsTrxZ互作,维持低温下OsTrxZ的蛋白稳定性,调控低温下叶绿体的发育^[11]。*Temperature-sensitive albino (TSA)*编码1个叶绿体定位的GTP结合蛋白,参与调控叶绿体蛋白合成^[12]。突变体 *tsa* 在20℃下呈现白化转绿的表型,而在30℃下突变体与野生型表型无显著差异^[12]。PPR(Pentatricopeptide repeat)蛋白TCD10突变导致水稻植株在20℃下白化致死,而在32℃下,植株叶色正常^[13]。另一个PPR蛋白Chlorophyll deficient 4(CDE4)突变导致水稻植株在低温下叶绿素含量显著降低,叶绿体发育异常^[14]。进一步研究发现CDE4可以直接绑定到叶绿体基因 *rpl2*、*ndhA*、*ndhB*的转录本,影响这些基因的RNA剪切。此外,鸟苷酸激酶VIRESCENT 2(V2)与CDE4直接互作,维持CDE4蛋白稳定性^[14]。

本研究以从粳稻日本晴N-甲基-N-亚硝基脲(MNU, N-Nitroso-N-methylurea)诱变突变体库中获得的低温白化突变体 *Low temperature albinism 1 (lta1)* 为材料,通过表型观察、叶绿体透射电镜观察、基因定位、基因表达分析等方面,初步完成突

体突变基因精细定位与候选基因测序分析,为进一步克隆 *LTA1* 提供了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

突变体 *lta1* 筛选自粳稻日本晴N-甲基-N-亚硝基脲诱变突变体库,经多代自交,低温白化表型已能够稳定遗传。以突变体 *lta1* 为母本,与籼稻南京11杂交获得F₁,F₁自交获得的F₂群体用于基因定位。粳稻日本晴与籼稻南京11种子为江苏太湖地区农业科学研究所作物育种与栽培研究室自行保存。

1.2 叶绿素含量测定

分别取在室内20℃与30℃条件下连续生长2周的野生型(日本晴)和突变体 *lta1* 叶片0.2 mg,叶绿素含量测定方法参考许子怡等^[15]。叶片剪碎,置于15 mL离心管内,加入5 mL 95%乙醇色素提取液,室温静置48 h,期间摇匀3~4次,设置3个生物学重复。利用双通道紫外分光光度计(TU1901,北京)测定在663与645 nm波长下的吸光值。叶绿素a=13.95 OD₆₆₃-6.88 OD₆₄₅;叶绿素b=24.96 OD₆₄₅-7.32 OD₆₆₃(OD为吸光值)。

1.3 叶绿体透射电镜观察

取在室内20℃条件下连续生长2周的野生型和突变体叶片,切成1~2 mm小块,置于含有2.5%戊二醛固定液的2.0 mL圆底离心管内,真空泵抽气1~2 h。固定好的样品委托青岛科创质量检测有限公司进行后续样品处理与利用JEM-1200Ex型透射电子显微镜观察拍照。

1.4 水稻DNA提取

剪取少量水稻叶片,置于200 μL离心管中,加入30 μL M5 Hiper 光速 mix 直接扩增最佳伴侣(#MF859,北京聚合美生物科技有限公司),96℃加热10 min,700 g离心2 min,取上清放于-20℃备用。

1.5 分子标记连锁分析

从 *lta1*/南京11杂交衍生的F₂群体中挑选与 *lta1* 低温白化表型一致的单株,提取DNA,利用有多态性的覆盖水稻全基因组的SSR标记与InDel标记进行连锁分析。然后,再进一步扩大极端个体数量与加密分子标记进行精细定位。基因定位所用引物见表1。

表 1 基因定位所用引物

Table 1 Primers for gene mapping

引物名称 Primer name	正向引物 Forward primer sequence (5'-3')	反向引物 Reverse primer sequence (5'-3')
RM7	TTCGCCATGAAGTCTCTCG	CCTCCCATCAATTCGTTGTT
RM5748	CAGTTGGCAATTGTCACGAG	TCGAACATATCCAAGCCTCC
RM14810	GGAAAGGGAAACCACAGATAAGC	AACAAGCACACACCCACCTCTCC
RM14822	GTCCTTCTTCGTCTACGCCATGC	CTTCCGCTCCTTGTTCTTCTTGC
YSL9	AATTGCACTATCTTTGTCTA	ACAAGTATTACCTCCATCAT
YSL12	TCACCTGCTAAATTCTCATC	GAGTTAGAAGCTAGAAACCC
YSL15	TCAGATGTTGAAGAAGAAAGGGGTAG	AAGTCCAAGCTGGGGAGGGT
LTA1-3	GCAGAACAGATGGCATAGAGC	TACCCTATGCCAAGGCCAAA
LTA1-7	AGTGATCCATGCCATGTCTCT	CCGTGTGACAGGATCTAACCT

根据 Gramene (<https://www.gramene.org/>) 和 RiceXPro (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>) 数据库获得的基因组序列信息, 利用 Primer Premier 5 软件设计引物扩增野生型和突变体 *lta1* 候选基因, 委托安徽通用生物股份有限公司进行测序拼接。扩增引物详见 <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220802002>, 附表 1。

1.6 基因表达分析

取室内 20 °C 连续生长 2 周的野生型与突变体 *lta1* 叶片, 液氮磨碎。利用康为世纪植物 RNA 提取试剂盒 (#CW0559) 提取 RNA, 反转录成 cDNA, 放入 -20 °C 备用。采用 TaKaRa TB Green® Premix Ex Taq™ (#RR420, Tli RNaseH Plus 荧光染料) 进行 qPCR 定量分析, 以水稻内参基因 *UBQ* (*LOC_Os03g13170*) 作为对照, 设置 3 个生物学重复。基因表达分析涉及的基因扩增引物参照张天雨等^[16]与 Liu 等^[17]。

1.7 亚细胞定位预测

根据 Gramene 和 RiceXPro 数据库获得的候选基因产物的氨基酸序列信息, 利用亚细胞定位分析软件 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 进行蛋白定位分析。

2 结果与分析

2.1 突变体 *lta1* 的表型鉴定

lta1 (Low temperature albinism 1) 是从粳稻日本晴 MNU 诱变突变体库中筛选鉴定到 1 个低温白化突变体。在低温 20 °C 条件下苗期突变体 *lta1* 叶片白化, 叶绿素 a 和叶绿素 b 含量约为野生型的 10%, 叶绿素含量显著降低, 多数白化苗会枯萎死亡 (图 1A、C), 而在正常 30 °C 条件下苗期突变体与野生型生长一致, 叶绿素含量无显著差异 (图 1B、D)。

2.2 叶绿体透射电镜观察

为了探究低温下野生型和突变体叶绿体结构

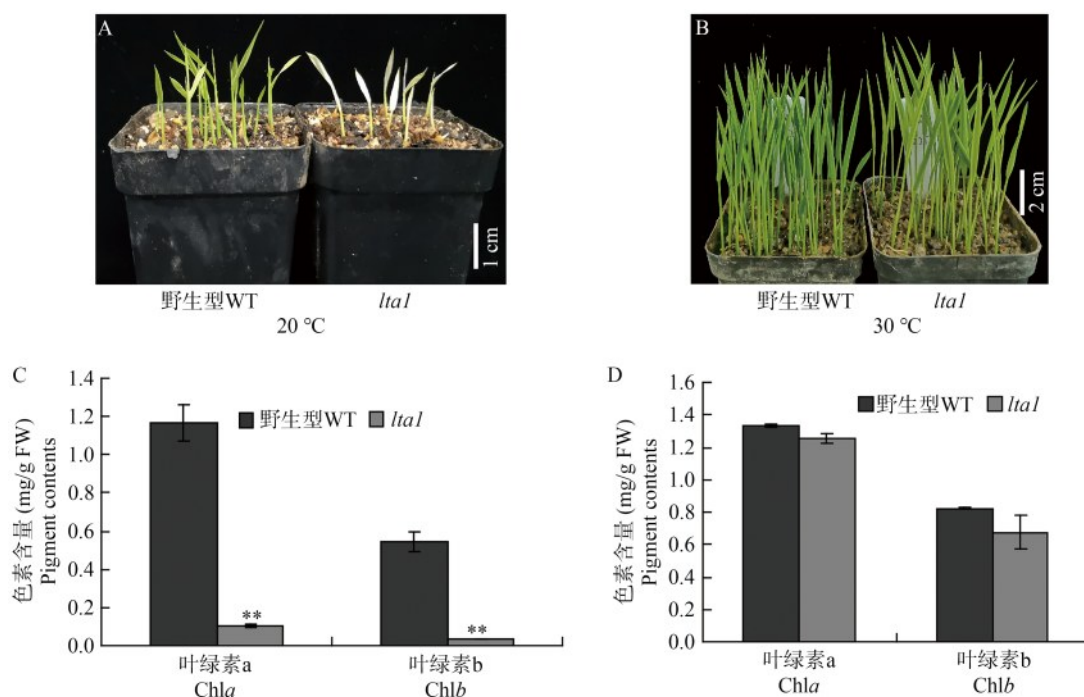
的差异, 通过透射电子显微镜观察了低温下野生型和突变体叶片叶绿体形态。如图 2A、B 所示, 野生型叶绿体发育正常, 有完整的类囊体结构, 基粒排列有序。然而, 突变体 *lta1* 叶肉细胞无完整的叶绿体结构, 叶绿体发育异常, 不能有效进行光合作用 (图 2C、D)。

2.3 低温白化基因 *LTA1* 的基因定位

为了克隆控制突变体 *lta1* 低温白化的基因, 利用突变体 *lta1* 与籼稻南京 11 杂交再自交形成的 F₂ 遗传定位群体进行基因连锁分析。取 10 个低温白化极端个体进行全基因组分子标记分析, 将目标基因初步定位在第 3 染色体短臂 SSR 标记 RM7 与 RM5748 之间, 物理距离为 2498 kb (图 3)。通过进一步扩大极端个体数量与加密分子标记, 最终将目标基因精细定位在 InDel 标记 LTA1-3 与 LTA1-7 之间, 物理距离为 132 kb (图 3)。

2.4 候选基因分析

基于水稻基因表达数据库 (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>), 精细定位 132 kb 区间内有 17 个表达基因 (表 2)。LOC_Os03g19540、LOC_Os03g19550、LOC_Os03g19570、LOC_Os03g19580、LOC_Os03g19690、LOC_Os03g19730、LOC_Os03g19600 编码产物为表达蛋白与反转录转座子蛋白; LOC_Os03g19700 编码一个 DUF247 未知功能蛋白; LOC_Os03g19590 编码光敏色素 OsphyB; LOC_Os03g19530、LOC_Os03g19610、LOC_Os03g19670、LOC_Os03g19680、LOC_Os03g19720 编码产物为酶与钙结合蛋白; LOC_Os03g19560、LOC_Os03g19650 编码三角状重复蛋白。Plant-mPLoc 亚细胞定位预测发现有 6 个基因编码产物可能定位于叶绿体。因而, 在野生型和突变体中对这 6 个基因进行测序。测序结果表明, 6 个基因在野生型和突变体中都无序列差异。

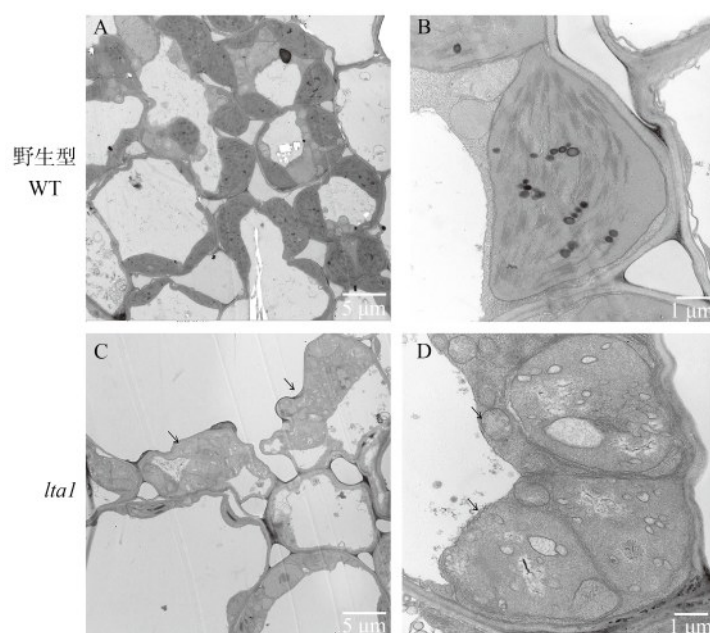


A: 在 20 °C 生长条件下苗期突变体和野生型的表型; B: 在 30 °C 生长条件下苗期突变体和野生型的表型; C: 在 20 °C 生长条件下突变体和野生型的叶绿素含量; D: 在 30 °C 生长条件下突变体和野生型的叶绿素含量; **代表在 $P < 0.01$ 水平上达到显著差异, 下同

A: Phenotypes of the seedlings of the mutant and wild type at 20 °C; B: Phenotypes of the seedlings of the mutant and wild type at 30 °C; C: Chlorophyll content of the mutant and wild-type at 20 °C; D: Chlorophyll contents of the mutant and wild-type at 30 °C; **Represents a significant difference at $P < 0.01$ level, the same as below

图 1 苗期突变体 *lta1* 的表型鉴定

Fig.1 Phenotype identification of the *lta1* mutant at seedling stage



A~B: 在低温下野生型叶片的叶绿体透射电镜观察; C~D: 在低温下突变体叶片的叶绿体透射电镜观察; 黑色箭头指示突变体发育异常的叶绿体

A-B: Transmission electron microscope observation of chloroplasts of wild-type leaves under low temperature condition; C-D: Chloroplast observation of the mutant leaves under low temperature condition by transmission electron microscope; Black arrows indicate abnormal developed chloroplasts of the mutant

图 2 低温下野生型和突变体叶绿体形态观察

Fig.2 Observation of chloroplast morphology of wild type and the mutant under low temperature condition

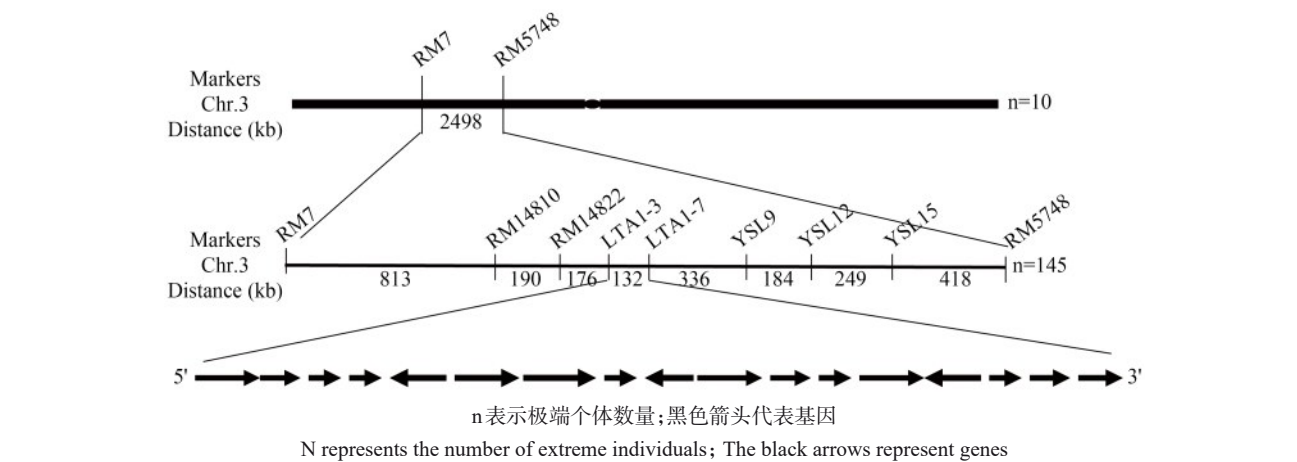


图3 *LTA1* 的图位克隆

Fig.3 Map-based cloning of *LTA1*

表 2 候选基因列表

Table 2 List of 17 candidate genes

基因名称	功能	亚细胞定位
Gene name	Function	Subcellular localization
<i>LOC_Os03g19530</i>	DEAD/DEAH DNA 解旋酶	细胞核
<i>LOC_Os03g19540</i>	表达蛋白	叶绿体
<i>LOC_Os03g19550</i>	表达蛋白	细胞膜
<i>LOC_Os03g19560</i>	三角状四肽重复蛋白	叶绿体
<i>LOC_Os03g19570</i>	表达蛋白	细胞核
<i>LOC_Os03g19580</i>	表达蛋白	细胞
<i>LOC_Os03g19590</i>	光敏色素 B	细胞核
<i>LOC_Os03g19600</i>	反转录转座子蛋白	细胞核
<i>LOC_Os03g19610</i>	果胶甲基酯酶	细胞壁
<i>LOC_Os03g19650</i>	三角状五肽重复蛋白	叶绿体
<i>LOC_Os03g19670</i>	类 GDSL 脂肪酶/酰基水解酶	细胞外
<i>LOC_Os03g19680</i>	烯醇辅酶 A 水合酶/异构酶家族蛋白	叶绿体/过氧化物酶体
<i>LOC_Os03g19690</i>	表达蛋白	叶绿体
<i>LOC_Os03g19700</i>	DUF247 未知功能蛋白	细胞膜
<i>LOC_Os03g19720</i>	超敏反应相关的钙结合蛋白	细胞膜
<i>LOC_Os03g19730</i>	表达蛋白	细胞核
<i>LOC_Os03g19760</i>	水解酶家族蛋白	叶绿体

2.5 叶绿体基因与叶绿素合成基因表达分析

为了探究低温下在野生型和突变体中叶绿体编码基因与叶绿素合成相关基因的表达水平差异,取低温下生长 10 d 的野生型和突变体叶片进行 RNA 提取与实时荧光定量 PCR。如图 4 所示,相比野生型, *petB*、*psbK*、*atpF*、*ndhA*、*petD*、*ndhD* 等叶绿体编码基因的表达水平在突变体中显著下调,而 *petA*、*rps14*、*rps3*、*rpl22* 等基因表达水平显著上调。

叶绿素合成相关基因 *HEME* 的表达水平在突变体中显著升高,而其他 7 个基因表达水平在野生型和突变体中无显著差异(图 5)。上述研究表明, *LTA1* 突变可能通过影响叶绿体编码基因与叶绿素合成基因的表达,导致叶绿体发育异常。

3 讨论

水稻在遇到低温胁迫时,叶绿素合成、叶绿体发育等过程会受到显著抑制。目前,一些与水稻低温叶绿素合成与叶绿体发育相关基因被鉴定克隆,初步阐明了低温下水稻叶绿素合成和叶绿体发育的分子调控网络^[18]。然而,水稻低温叶绿素合成与叶绿体发育过程十分复杂,亟待鉴定克隆新的基因。本研究从水稻 MNU 突变体库筛选到 1 个低温白化的突变体 *lta1*。相比野生型,突变体 *lta1* 在 20 ℃ 下叶绿素含量降低,叶绿体发育异常,而在 30 ℃ 下叶绿素含量正常,叶绿体发育正常,说明突变体 *lta1* 是一个低温敏感型突变体。

随着现代生物技术的飞速发展,在水稻、小麦、油菜等作物中都鉴定克隆了叶色相关基因,为研究植物光合作用提供了材料^[19-20]。迄今为止,在水稻中至少 20 个低温叶色基因被克隆,包括 *Thermo-sensitive chlorophyll deficient 12* (*TCD12*)^[21]、*DUA1*^[22]、*Thermo-sensitive chlorosis mutant 12* (*TCM12*)^[23]。*TCD12* 编码 1 个叶绿体定位的 RNA 聚合酶 σ 因子,影响低温(<23 ℃)下叶绿体基因的表达,其突变体在低温下呈现白化的表型^[21],说明 *TCD12* 对低温下水稻叶绿体基因的正常表达至关重要。叶绿体定位的 PPR 蛋白 *DUA1* 与叶绿体基因 RNA 编辑因子 White-stripe leaves and panicles (*WSP1*) 互作,协同调控叶绿体基因 *rps8* 的 RNA 编辑,控制低温下水稻

叶绿体发育^[22]。*TCM12* 编码 1 个细胞核与膜双定位的 2,3-二磷酸甘油酯非依赖性磷酸甘油酯变位酶,催化 3-磷酸甘油酸 3-PGA 可逆转化为 2-磷酸甘

油酸 2-PGA^[23]。突变体 *tcm12* 在 20 °C 下呈白化转绿的表型,叶绿体发育异常,但在高温下突变体呈现正常绿色表型^[23]。

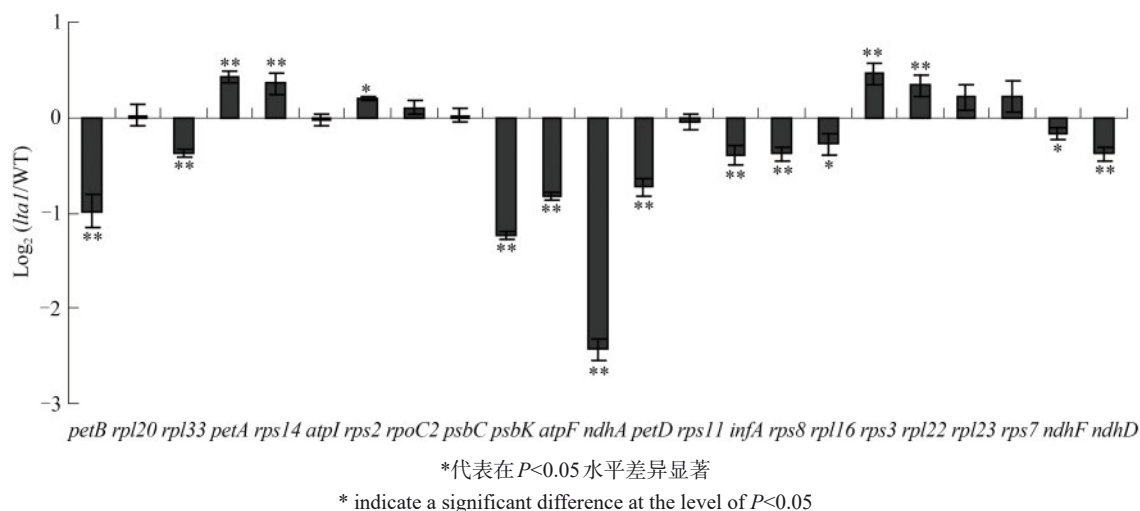


图4 叶绿体编码基因表达水平分析

Fig.4 Expression level analysis of chloroplast coding genes

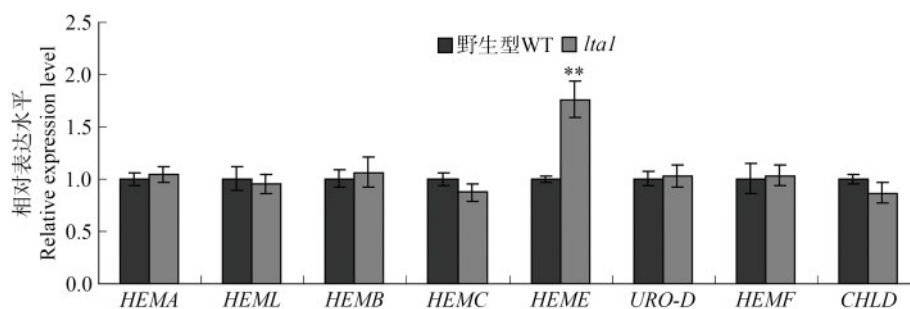


图5 叶绿素合成相关基因表达水平分析

Fig.5 Expression level analysis of genes related to chlorophyll biosynthesis

在本研究中,通过突变体与籼稻南京 11 杂交构建基因定位群体,利用分子标记进行基因定位,最终将目标基因定位在第 3 号染色体短臂 132 kb。通过查阅水稻表达数据库与相关文献,在该区间内含有 17 个表达基因,均没有被报道参与水稻叶绿体发育的调控,说明 *LTA1* 可能是 1 个新的调控水稻叶绿体发育基因。在 17 个候选基因中,有 2 个候选基因编码 PPR 蛋白,暗示其可能是 *LTA1*,但是基因测序显示在野生型和突变体之间无序列差异。*LTA1* 基因突变影响叶绿体编码基因和叶绿素合成基因 *HEME* 的正常表达,导致水稻叶绿体发育和叶绿素合成发生异常。本研究进一步丰富了水稻低温下叶绿体发育的调控网络,为克隆 *LTA1* 基因奠定了基础。

参考文献

- [1] Wei S, Li X, Lu Z, Zhang H, Ye X, Zhou Y, Li J, Yan Y, Pei H, Duan F, Wang D, Chen S, Wang P, Zhang C, Shang L,

- Zhou Y, Yan P, Zhao M, Huang J, Bock R, Qian Q, Zhou W. A transcriptional regulator that boosts grain yields and shortens the growth duration of rice. *Science*, 2022, 377(6604): eabi8455
- [2] Gong Z, Xiong L, Shi H, Yang S, Herrera-Estrella L R, Xu G, Chao D Y, Li J, Wang P Y, Qin F, Li J, Ding Y, Shi Y, Wang Y, Yang Y, Guo Y, Zhu J K. Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Science China-Life Sciences*, 2020, 63(5):635-674
- [3] Cui S, Huang F, Wang J, Ma X, Cheng Y, Liu J. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*, 2005, 5(12):3162-3172
- [4] Zhao Y, Han Q, Ding C, Huang Y, Liao J, Chen T, Feng S, Zhou L, Zhang Z, Chen Y, Yuan S, Yuan M. Effect of low temperature on chlorophyll biosynthesis and chloroplast biogenesis of rice seedlings during greening. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(4):1390
- [5] 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. *植物遗传资源学报*, 2020, 21(4):

- 794-803
Yang Y R, Huang Q Q, Zhao Y N, Tang J Y, Liu X. Advances on gene isolation and molecular mechanism of rice leaf color genes. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(4): 794-803
- [6] 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. *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. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(17): 5712-5719
- [7] Wang X M, Kong R R, Zhang T, Gao Y Y, Xu J L, Piao Z Z, Lee G, Lin D Z, Dong Y J. A DEAD-box RNA helicase TCD33 that confers chloroplast development in rice at seedling stage under cold stress. *Journal of Plant Physiology*, 2020, 248: 153138
- [8] Liu X, Lan J, Huang Y, Cao P, Zhou C, Ren Y, He N, Liu S, Tian Y, Nguyen T, Jiang L, Wan J M. WSL5, a pentatricopeptide repeat protein, is essential for chloroplast biogenesis in rice under cold stress. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(16): 3949-3961
- [9] Jung Y J, Lee H J, Yu J, Bae S, Cho Y G, Kang K K. Transcriptomic and physiological analysis of *OsCAOI* knockout lines using the CRISPR/Cas9 system in rice. *Plant Cell Reports*, 2021, 40(6): 1013-1024
- [10] Lin D, Zhou W, Wang Y, Sun J, Pan X, Dong Y. Rice *TSV2* encoding threonyl-tRNA synthetase is needed for early chloroplast development and seedling growth under cold stress. *Genes, Genomes, Genetics*, 2021, 11(9): jkab196
- [11] Sun J, Zheng T, Yu J, Wu T, Wang X, Chen G, Tian Y, Zhang H, Wang Y, Terzaghi W, Wang C M, Wan J M. TSV, a putative plastidic oxidoreductase, protects rice chloroplasts from cold stress during development by interacting with plastidic thioredoxin Z. *New Phytologist*, 2017, 215(1): 240-255
- [12] Cai L, Liu Z, Cai L, Yan X, Hu Y, Hao B, Xu Z, Tian Y, Liu X, Liu L, Jiang L, Zhou S, Wan J. Nuclear encoded elongation factor EF-Tu is required for chloroplast development in rice grown under low-temperature conditions. *Journal of Genetics and Genomics*, 2022, 49(5): 502-505
- [13] Wu L, Wu J, Liu Y, Gong X, Xu J, Lin D, Dong Y J. The rice pentatricopeptide repeat gene *TCD10* is needed for chloroplast development under cold stress. *Rice*, 2016, 9(1): 67
- [14] Liu X Y, Zhang X, Cao R, Jiao G, Hu S, Shao G, Sheng Z, Xie L, Tang S, Wei X, Hu P S. *CDE4* encodes a pentatricopeptide repeat protein involved in chloroplast RNA splicing and affects chloroplast development under low-temperature conditions in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(10): 1724-1739
- [15] 许子怡, 程行, 沈奇, 赵亚男, 汤佳玉, 刘喜. 水稻黄绿叶突变体 *yg13* 的鉴定与基因功能分析. *中国农业科学*, 2021, 54(15): 3149-3157
Xu Z Y, Cheng H, Shen Q, Zhao Y N, Tang J Y, Liu X. Identification and gene functional analysis of yellow green leaf mutant *yg13* in rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(15): 3149-3157
- [16] 张天雨, 周春雷, 刘喜, 孙爱伶, 曹鹏辉, Thanhliem NGUYEN, 田云录, 翟虎渠, 江玲. 一个水稻温敏黄化突变体的表型分析和基因定位. *作物学报*, 2017, 43(10): 1426-1433
Zhang T Y, Zhou C L, Liu X, Sun A L, Cao P H, Thanhliem N, Tian Y L, Zhai H Q, Jiang L. Phenotypes and gene mapping of a thermo-sensitive yellow leaf mutant of rice. *Acta Agronomica Sinica*, 2017, 43(10): 1426-1433
- [17] Liu X, Cao P H, Huang Q Q, Yang Y R, Tao D D. Disruption of a rice chloroplast-targeted gene *OsHMBPP* causes a seedling-lethal albino phenotype. *Rice*, 2020, 13(1): 51
- [18] 唐辉武, 张兰, 蔡培荣, 黄潇溢, 秦银娇, 吴梓鹏, 朱嘉慧, 王丽敏. 水稻白化转绿叶色突变体研究进展. *广东农业科学*, 2021, 48(8): 9-18
Tang H W, Zhang L, Cai P R, Huang X Y, Qin Y J, Wu Z P, Zhu J H, Wang L M. Research progress of rice green-revertible albino mutants. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2021, 48(8): 9-18
- [19] Żur I, Gajęcka M, Dubas E, Krzewska M, Szarejko I. Albino plant formation in androgenic cultures: An old problem and new facts. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2288: 3-23
- [20] 刘艳霞, 林冬枝, 董彦君. 水稻温敏感叶色突变体研究进展. *中国水稻科学*, 2015, 29(4): 439-446
Liu Y X, Lin D Z, Dong Y J. Research advances in thermosensitive leaf coloration mutants in rice. *Chinese Journal of Rice Science*, 2015, 29(4): 439-446
- [21] Yu Y, Zhou Z, Pu H, Wang B, Zhang Y, Yang B, Zhao T, Xu D. *OsSIG2A* is required for chloroplast development in rice (*Oryza sativa* L.) at low temperature by regulating plastid genes expression. *Functional Plant Biology*, 2019, 46(8): 766-776
- [22] Cui X, Wang Y, Wu J, Han X, Gu X, Lu T, Zhang Z. The RNA editing factor *DUAL1* is crucial to chloroplast development at low temperature in rice. *New Phytologist*, 2019, 221(2): 834-849
- [23] Lin D, Zhang L, Mei J, Chen J, Piao Z, Lee G, Dong Y. Mutation of the rice *TCM12* gene encoding 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase affects chlorophyll synthesis, photosynthesis and chloroplast development at seedling stage at low temperatures. *Plant Biology*, 2019, 21(4): 585-594

附表 1 基因测序所用引物

Supplement Table 1 Primers for gene sequencing

引物名称	正向引物	反向引物
Primer name	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<i>LOC_Os03g19650</i>	ATGGCGCTCGCCGCCGCCGCA	TTACACATGGACAAGGTCAGTTG
<i>LOC_Os03g19540</i>	ATGCCGAAGCTGCCGATGGA	TCAGGCGGTGGCCGCCAAGT
<i>LOC_Os03g19560</i>	ATGGCGATGCGGCTCTTCCC	TTACGGAACAGGGAGAAGAG
<i>LOC_Os03g19690</i>	ATGGCGCCTTCCTGCTCCT	TTAGCGGACTGGTGAAGAGA
<i>LOC_Os03g19760</i>	ATGGCGCGGCACCTCGCGCC	CTATACCTTGCCGTTCTTTC
<i>LOC_Os03g19680</i>	ATGCAGTATTGCAGTGTCAA	TCACAGCTTTGATGGTGGCT