

专论与综述 Reviews

植物叶色突变体

何冰 刘玲珑 张文伟 万建民*

南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏省植物基因工程中心, 南京 210095

Plant Leaf Color Mutants

HE Bing, LIU Ling-Long, ZHANG Wen-Wei, WAN Jian-Min*

National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Plant Gene Engineering Center of Jiangsu Province, Nanjing 210095, China

提要 叶色变异是比较常见的突变性状。叶色突变体在基础研究和育种工作中越来越显得重要。文章概述叶色突变体的分类方法、来源、遗传方式和突变的分子机制, 着重介绍其应用价值及前景。

关键词 叶色突变体; 分子机制; 育种研究

叶色变异是比较常见的突变性状, 一般在苗期表达, 但少数突变体直到生育后期才发生叶色突变。由于突变基因往往是直接或间接影响叶绿素的合成和降解, 改变叶绿素含量, 所以叶色突变体也称为叶绿素突变体。

叶色变异通常影响突变体光合效率, 造成作物减产, 严重时甚至导致植株死亡, 因此过去常被认为是无意义的突变。近年来, 叶色突变体的利用价值受到越来越多关注。在育种工作中, 叶色变异可作为标记性状, 简化良种繁育(马志虎等2001)和杂交种生产(Zhao 2000); 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了优秀的种质资源(Gan和Amasino 1995)。在基础研究中, 叶色突变体是研究植物光合作用(Fambrini等2004)、光形态建成(Parks和Quail 1991)、激素生理(Agrawal等2001)以及抗病机制(Singh等2000)等一系列生理代谢过程的理想材料; 同时利用此种突变体可分析鉴定基因功能(Hansson等1999), 了解基因间互作(Lopez-Juez等1998)。本文综述了叶色突变体研究现状, 并对其在遗传育种、功能基因组学和植物生理学研究中的应用前景作了展望。

1 叶色突变体的分类

1.1 苗期叶色分类法 叶色突变常在苗期表达, 且易于识别, 因此苗期叶色一直是最为常用的叶色突变体分类标准。然而苗期叶色分类法以表型

性状为基础, 具有一定的局限性。植物的表型性状与内部的遗传物质之间的关系并非一一对应。同一叶色突变性状可能受不同基因控制; 同一基因发生突变, 由于基因功能缺损的程度不同, 可能造成不同表现型。番茄黄叶突变体 *au* 和 *yg-2* 的表型性状极为相似, 而研究表明在这两个突变体中分别发生了血红素加氧酶(heme oxygenase)和光敏色素生色团合酶(P Φ B synthase)基因突变(Terry和Kendrick 1999)。Kumar和Sol1 (2000)将 *HEMA* 基因(编码谷氨酰-tRNA还原酶)的反义RNA转入拟南芥后, 转基因植株间即存在明显的叶色差异, 并且叶色变异程度与 *HEMA* 基因的表达水平成反比。由此可见, 简单以叶色为标准对突变体进行划分, 很可能不利于研究基因的生物功能。但由于还未找到更为合理的分类方法, 所以目前仍然根据苗期叶色划分叶色突变体。

1.2 其它分类法 对于突变性状在苗期之后表达的叶色突变体, 必须采取其它分类方法。如常绿(stay green)突变体是常见的苗期后叶色变异体, 在拟南芥(Sung等1997)、菊花(Reyes-Arribas等2001)、羊茅(*Festuca pratensis*) (Vincentini等1995)

收稿 2005-05-08 修定 2005-11-17

资助 国家科技攻关计划(2004BA525B02-04)、江苏省自然科学基金(BK2003076)和农业部“948”项目(2004-224)。

*通讯作者(E-mail: wanjm@mail.njau.edu.cn, Tel: 025-84396516)。

等很多物种中都有发现, 其最明显的特征是生育末期叶片保绿时间较长甚至完全不黄化。

常绿突变以外的苗期后叶色变异比较少见, 通常根据突变发生时的叶色对突变体进行归类, 这一类突变体中研究比较透彻的是来自于小麦矮变一号的返白突变体(王保莉等 1996)。

2 叶色突变体的来源

叶色突变体的来源十分广泛, 包括自发突变、人工诱发突变、插入突变和基因沉默突变。每种来源的突变体各有其优缺点, 只有了解这些特点, 才可有针对性的选择突变体应用策略。

自发突变在自然条件下发生, 未经过复杂的生物技术操作手段, 将其直接用于常规育种, 不存在转基因安全性问题。但自发叶色突变的频率极低, 即使获得了感兴趣的突变体, 也需要通过繁琐的图位克隆法分离自发突变基因, 时间长, 难度大。这些不利因素极大限制了自发叶色突变在功能基因组学研究中的应用。

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。通过人工诱变可在较短时间内获得大量突变体, 由此而产生的叶色突变已广泛应用于植物育种工作, 并取得了很大的成就(Zhao等 2000)。然而诱发突变在功能基因组学研究中的应用价值有限。理化因素通常诱发点突变和缺失突变, 仍需通过图位克隆的方法分离突变基因; 组织培养引起的染色体断裂和重排(Phillips等 1994)以及DNA的甲基化(Kaeppler等 1998), 在基因功能鉴定中难以利用。

插入突变最大的优点在于, 可将插入元件作为标签从基因组中分离出相应的基因。从正向遗传学来看, 可以鉴定插入叶色突变体, 根据插入序列迅速克隆到突变基因, 确定突变基因的功能, 阐明叶色变异机制。从反向遗传学来看, 可以根据目的基因序列设计引物, 通过PCR技术从突变体库中筛选出目的基因发生插入突变的叶色突变体, 以全面了解叶色突变基因功能。值得注意的是, 插入突变以转基因技术为基础, 涉及转基因安全性问题, 在将插入叶色突变体用于农业生产之前, 必须对其环境安全性和食品安全性进行深入的研究和分析。

基因沉默引起的叶色突变体主要用于分析特定基因功能。目前仅从烟草(Monde等 2000)、拟南芥(Kumar和Soll 2000)等少数植物中分离出基因沉默叶色突变体。

3 叶色突变体的遗传方式

叶色变异种类繁多, 不同突变体的遗传规律相差很大。叶色突变可能是数量性状, 也可能是质量性状; 可能是细胞核遗传, 也可能是细胞质遗传。例如, 芽黄突变体多数受单隐性核基因控制, 少数受两对核基因控制(肖松华等 1995), 在大豆中还发现了细胞质遗传芽黄突变体(马国荣等 1994)。与细胞核遗传叶色突变体相比, 已发现的细胞质突变体较少, 仅在小麦(王保莉等 1996)、大豆(马国荣等 1994)、烟草(Monde等 2000; Barak等 2000)等作物中有少量报道。这可能与植物细胞中含有多个细胞器(叶绿体、线粒体) DNA分子有关。

4 叶色突变的分子机制

叶色突变的分子机制较为复杂。突变基因可直接或间接干扰叶绿素的合成及稳定, 经由多种途径引起叶色变异。

根据叶色突变体的研究结果, 目前, 对其发生机制的推测主要有以下几种观点:

4.1 叶绿素生物合成途径中的基因突变 绿色植物和某些藻类的叶绿素形成从谷氨酰-tRNA开始, 至叶绿素a、b合成结束(Beale 2005)。目前, 被子植物叶绿素合成途径中所有的关键酶都已被鉴定出来(图1、表1), 该途径中任何基因发生突变都可能阻碍叶绿素形成, 改变叶绿体中各种色素的比例, 引起叶色变异。

事实上, 叶色突变体在研究植物叶绿素生物合成的过程中曾发挥过作用。以叶色突变体为研究对象, 不仅可分离、鉴定参与叶绿素合成的基因, 还可验证前人对叶绿素合成的种种假说。在以往的研究中, 用叶色突变体不但鉴定出了CAO(Oster等 2000)、CHLH(Jung等 2003)、CHL11(Petersen等1999)(表1)等对叶绿素合成起决定作用的基因, 而且验证了谷氨酰-tRNA还原酶(Kumar和Soll 2000)、NADPH:原叶绿素酸酯氧化还原酶(Frick等 2003)、叶绿素合酶(Gaubier等

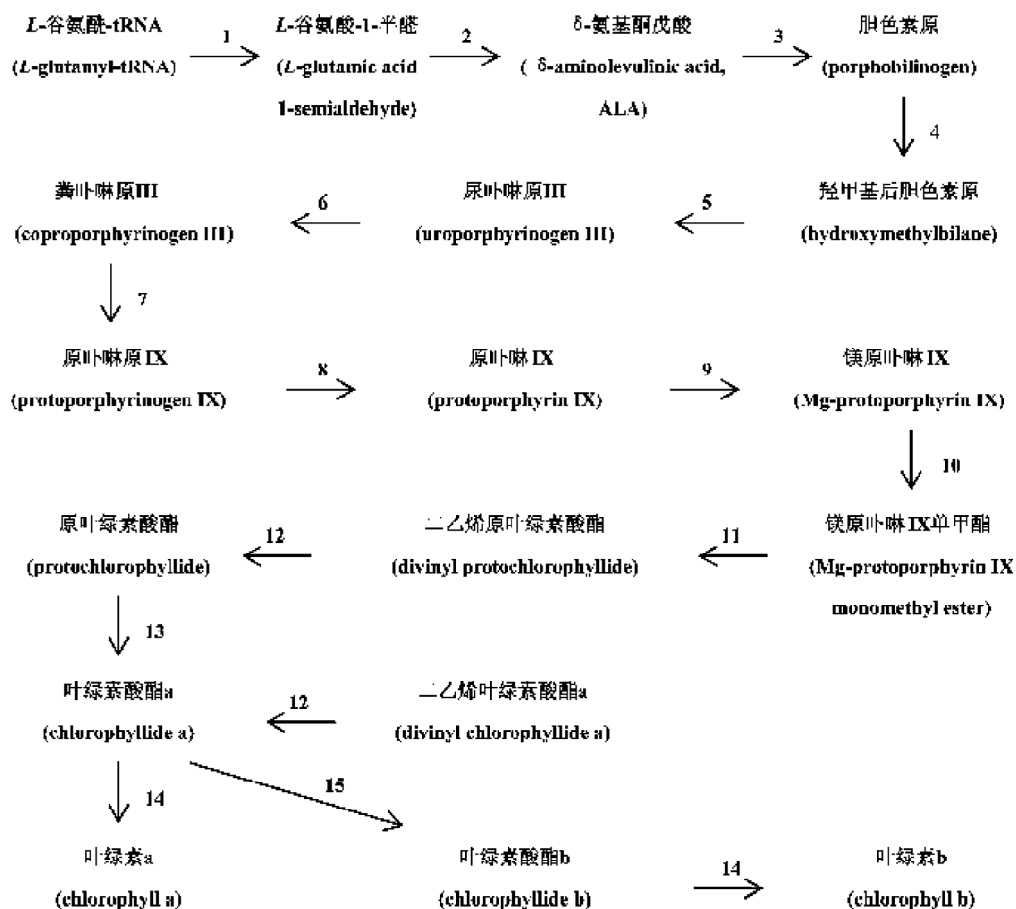


图1 被子植物叶绿素生物合成途径(Beale 2005)

标有数字的箭头涉及表1中所列的酶；根据有效底物发生反应12或13；反应14可利用2种底物。

1995)等关键酶在叶绿素合成过程中的功能。

4.2 血红素→光敏色素生色团生物途径中基因突变

叶绿素生物合成和血红素生物合成是四吡咯生物合成途径的两个分支，原叶啉 IX 与 Mg^{2+} 螯合产生镁原叶啉 IX，与 Fe^{2+} 螯合形成血红素，血红素经一系列反应最终形成光敏色素生色团(图2)。叶绿素合成速率受细胞内血红素含量影响，若血红素→光敏色素生色团途径受阻、细胞内血红素含量上升，过剩的血红素将反馈抑制叶绿素合成，引起突变体叶色变异(Terry和Kendrick 1999)。

缺乏光敏色素生色团的叶色突变体是研究血红素对叶绿素合成的调节作用的理想材料，也是研究高等植物光形态建成的理想材料。光敏色素生色团是光形态建成的光受体——光敏色素的必需组分，对光敏色素活性起决定作用(Terry 1997)。Terry等(1993)以缺乏光敏色素生色团-叶色突变体

为对象，研究了光敏色素的生物合成，Fankhauser和Chory (1997)的工作让人们加深了对光感受和信号转导的了解。

4.3 编码其它叶绿体蛋白的基因突变 叶绿体蛋白由叶绿体和细胞核基因共同编码，其中叶绿体基因组编码蛋白不足100种，大量的蛋白质由核基因编码在细胞质中合成，而后借助叶绿体外套(chloroplast envelope)上的异位子(translocon)转入叶绿体(Sato等1999)。蛋白质是叶绿体结构和功能的基础，异位子、代谢过程的催化剂——酶和叶绿体中的翻译机器——叶绿体核糖体的主要成分是蛋白质，蛋白与细胞色素、质体蓝素等结合构成电子传递链，包括叶绿素在内的所有色素都与蛋白质结合形成复合体(潘瑞炽和董愚得1995)。

四吡咯合成途径之外的叶绿体蛋白基因主要通过3种途径引起叶色突变。(1)基因突变间接干

表1 参与被子植物叶绿素合成途径的酶的基因 (Beale 2005)

步骤 ^a	酶名称		基因名 ^b
	中文名	英文名	
1	谷氨酰-tRNA 还原酶	glutamyl-tRNA reductase	<i>HEMA 1</i> <i>HEMA 2</i> <i>HEMA 3</i>
2	谷氨酸-1-半醛转氨酶 (谷氨酸-1-半醛氨基变位酶)	glutamate 1-semialdehyde aminotransferase (glutamate 1-semialdehyde aminomutase)	<i>GSA 1</i> (<i>HEML 1</i>) <i>GSA 2</i> (<i>HEML 2</i>)
3	胆色素原合酶 (δ -氨基酮戊酸脱水酶)	porphobilinogen synthase (5-aminolevulinic acid dehydratase)	<i>HEMB 1</i> <i>HEMB 2</i>
4	羟甲基后胆色素原合酶 (胆色素原合酶脱氨酶)	hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase)	<i>HEMC</i>
5	尿卟啉原 III 合酶 (尿卟啉原 III 共合成酶)	uroporphyrinogen III synthase (uroporphyrinogen III co-synthase)	<i>HEMD</i>
6	尿卟啉原脱羧酶	uroporphyrinogen decarboxylase	<i>HEME 1</i> <i>HEME 2</i>
7	粪卟啉原氧化脱羧	coproporphyrinogen oxidative decarboxylase	<i>HEMF 1</i> <i>HEMF 2</i>
8	原卟啉原氧化酶	protoporphyrinogen oxidase	<i>HEMG 1</i> <i>HEMG 2</i>
9	镁螯合酶 D 亚基 镁螯合酶 H 亚基 镁螯合酶 I 亚基	Mg chelatase D subunit Mg chelatase H subunit Mg chelatase I subunit	<i>CHLD</i> <i>CHLH</i> <i>CHLI 1</i> <i>CHLI 2</i>
10	镁原卟啉 IX 甲基转移酶	Mg-protoporphyrin IX methyltransferase	<i>CHLM</i>
11	镁原卟啉 IX 单甲酯环化酶	Mg-protoporphyrinogen IX monomethylester cyclase	<i>CRD 1</i> (<i>ACSF</i>)
12	二乙烯还原酶	divinyl reductase	<i>DVR</i>
13	NADPH: 原叶绿素酸酯氧化还原酶	NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase	<i>PORA</i> <i>PORB</i> <i>PORC</i>
14	叶绿素合酶	chlorophyll synthase	<i>CHLG</i>
15	叶绿素酸酯 a 氧化酶	chlorophyllide a oxygenase	<i>CAO (CHL)</i>

a: 步骤数与图1中数字对应; b: 基因名为该基因在拟南芥中的名称, 可变基因名和酶名用括号表示, 除 *POR* 基因用字母后缀表示, 编码同一基因的多个酶用数字后缀表示。

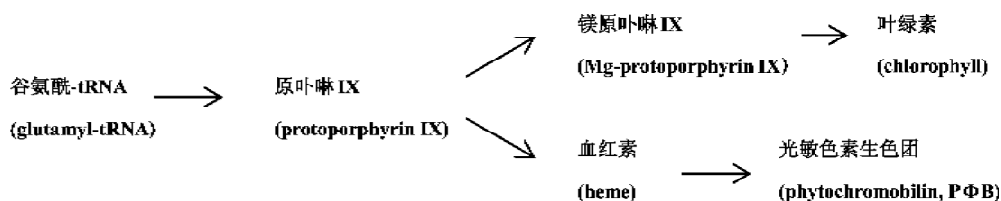


图2 四吡咯生物合成途径示意 (Terry和Kendrick 1999)

扰叶绿素生物合成。除谷氨酰-tRNA 还原酶之外, 四吡咯合成途径中的关键酶均由核基因编码 (Kannangara等 1988)。叶绿体核糖体的突变将影

响谷氨酰-tRNA 还原酶的合成, 进而削弱或阻断叶绿素合成的第一步反应 (Yaronskaya等 2003); 异位子蛋白的变异可能干扰异位子对关键酶的认识、

结合或转运,从而降低叶绿素合成速率(Reinbothe等2005)。(2)基因突变干扰叶绿素生物降解。叶片衰老时,叶绿素遭到降解(陈文峻和蒯本科2001),叶色黄化。而在某些常绿突变体中,叶绿素生物降解途径中的基因发生突变,叶片长时间保持绿色(Vincentini等1995)。(3)突变基因影响光合色素的稳定性。几乎所有的光合色素都包埋在类囊体膜中,与蛋白质以非共价键结合(潘瑞炽和董愚得1995)。叶绿体蛋白突变可导致叶绿体内部膜结构发育缺陷,进而影响叶绿素及其它光合色素的稳定性,最终改变叶绿体中各种色素的含量及比例(Chen等2005)。

现已发现了很多叶绿体蛋白突变的叶色突变体,通过这些突变体已分离、鉴定了大量与质体发育和分化(Babiychuk等2003)、质体翻译(Schultes等2000)、蛋白输入(Reinbothe 2005)、光合功能(Motohashi等2003)和叶片衰老有关(Vincentini等1995)的位点。

4.4 与光合系统无直接关系基因突变 光合系统以外基因突变同样可引起叶色变异,但突变机制尚未得到彻底阐明。Kushnir等(2001)认为这可能与细胞内核-质间信号传导有关。Robson等(2004)发现将玉米衰老增强启动子和农杆菌*IPT*基因(*IPT*基因表达导致细胞分裂素含量升高)融合转入玉米后,转基因植株表现出常绿性状。推测这是细胞分裂素改变了合成代谢和分解代谢之间的平衡,叶绿素含量上升和稳定性增强可能是突变体新陈代谢过程变异的结果。

5 叶色突变体的应用前景

目前,叶色突变体已广泛应用于基础研究和生产实践。随着植物生理学研究手段的不断发展,以及分子生物学、功能基因组学和生物信息学研究的不断深入,相信对叶色突变体的应用研究将不断取得新的突破。

5.1 叶色变异作为标记性状 叶色突变性状极易识别,并且通常在苗期表达。将叶色变异作为标记性状用于良种繁育和杂交育种,不但可以测定种子纯度,还可在苗期剔除受外源花粉污染的种子和假杂种。

5.1.1 良种繁育 品种纯度鉴定始于1975年。种子

纯度是种子定级的主要依据,也是种子生产过程中最重要的环节之一。根据国家《农作物种子检验规程》,种子纯度的检测一直以田间鉴定为主,缺乏快速有效的方法(马志虎等2001)。利用隐性叶色突变性状,可完全克服由于外来花粉的干扰,确保良种的纯度及质量,大大降低原种生产成本。

5.1.2 杂交育种 纯度不稳定是制约杂交种生产的一大因素,因此准确测定杂交种的纯度十分重要。如果将叶色变异性状导入杂交亲本,那么既可在种子应用于生产之前,确定杂种纯度,又可在苗期(间苗或移栽时)及时剔除亲本自交后代,从而大大简化杂交种生产。

Wu等(2002)已培育出携带转绿型黄叶标记的水稻光敏雄性不育系‘Xinguang S’,这种将叶色突变与雄性不育相结合的方法,为保证杂交种纯度提供了有效途径。我们实验室收集的数种水稻叶色突变体中,有一种黄叶突变体——‘249黄’,其黄叶性状受单隐性核基因控制;幼苗为黄绿色,易与正常幼苗区分,且不受环境影响;生长量和单穗重较低,但分蘖能力增强,成穗率增高,熟期适中,因而仍然具有6759 kg·hm⁻²的较高产量(龚红兵等2001),在生产实践中可能有较高利用价值。我们实验室拟将该性状导入三系不育系作为标记性状,再根据秧苗的叶色差异,在移栽前去杂,以解决不育系自交结实可能带来的问题,从而保证大田杂交稻的纯度。

5.2 作为优良种质资源 近年来,叶色突变体在育种中的利用逐渐受到重视,除了作为杂交育种中的标记性状外,也可在植物的遗传改良中作为育种材料。

5.2.1 利用常绿性状提高作物产量 生育后期,功能型(functional)常绿突变体的叶片延缓衰老,叶绿素含量和光合能力保持不变(Sung等1997)。如果将常绿突变转入植物,可能会提高其生产能力。Gan和Amasino(1995)曾用转基因技术诱发了1个烟草常绿突变体,此种突变体的生物量和种子产量分别增加了40%和52%。

5.2.2 叶绿素缺失叶色突变体用于改良作物品质 通常情况下,叶绿素含量下降会对作物品质

产生负面影响, 但茶、烟草等作物却因缺失叶绿素而具有特殊的优良品质。因此在育种过程中, 必须对作物的主要经济性状有深刻的认识, 以便根据育种目标灵活利用叶色突变体材料。

安吉白茶是阶段性返白突变体, 其叶片白化过程伴随着叶绿素含量降低, 蛋白水解酶活性升高, 可溶性蛋白含量降低, 游离氨基酸含量升高, 返白期间氨基酸总量高值可达5%。以白化叶为原料的玉凤茶氨基酸含量为一般茶叶的1倍以上, 滋味鲜爽、风味独特, 有很高的营养价值和经济价值。目前, 安吉白茶已列为珍稀茶树种质资源(成浩等1999)。叶绿素缺失对烟草有特殊利用价值。白肋型、灰黄型、黄绿型是烟草叶绿素缺失变异型, 其中白肋突变体源自马里兰深色晒烟, 茎和叶脉呈乳白色, 叶绿素含量为正常绿色品种的三分之一, 现已发展成烟草新类型, 是混合型卷烟的重要原料(盖均镒1997)。

5.2.3 用叶色突变体培育观赏植物 由于叶色易于通过突变而改变, 生产中观赏植物常用无性繁殖方式进行扩繁, 其突变材料在 M_1 代即可以鉴定、筛选和保存, 所以叶色突变体常为观赏植物育种者广泛应用。例如, 菊花不黄化(non-yellowing)品种‘Boaldi’, 在黑暗中处理12 d后的叶片仍为绿色, 不出现任何早衰、黄化症状, 其观赏价值不因长时间黑暗储藏和运输而降低(Reyes-Arribas等2001)。彩叶植物色彩绚丽, 枝叶繁茂, 易于形成大面积群体景观, 保留和固定叶色突变, 是培育彩叶植物的常用方法之一(王勤华等2004)。

5.3 叶色突变体在植物生理学研究中的应用 引起叶色变异的基因突变常常对植物生长发育产生影响, 因而可通过叶色突变体探索植物各项生命活动的规律。

5.3.1 光合作用和光形态建成 叶是植物进行光合作用的主要器官, 光合作用的速率与叶绿素含量高低、叶绿体结构和功能是否完整有着复杂的关系。例如, 在向日葵黄叶突变体 *xan1* 中, 光合机构遭到破坏, 光合速率显著下降(Fambrini等2004); 而在水稻‘249黄’突变体中, 叶绿素含量减少, 光合机构对强光的耐受性升高, 突变

体的最大光合速率显著上升(龚红兵等2001)。利用叶色突变体, 可以有针对性的研究光照(龚红兵等2001)、二氧化碳浓度(Coschigano等1998)和温度(Havaux和Tardy 1997)等环境因素对光合速率的影响。Coschigano等(1998)从拟南芥叶色突变体 *g1s* 中分离出 *GLU1* 基因, 证实 *GLU1* 的编码产物与光呼吸有密切关系。这一发现为抑制 C_3 作物的光呼吸, 以增加光合效率, 进而提高作物产量提供了新思路。

缺失光敏色素生色团叶色突变体是研究植物光形态建成的理想材料。植物光形态建成的光受体——光敏色素是由生色团和蛋白质组成的, 并且光敏色素受体家族的所有成员均使用同一生色团。缺失光敏色素生色团叶色突变体对光不敏感(Terry和Kendrick 1999), 可用于研究光感受和信号转导。生色团含量降低导致所有光敏色素活性下降(Terry 1997), 因而可通过缺失生色团的突变体研究光敏色素在光形态建成中的作用。在缺失光敏色素生色团叶色突变体中, 最具代表性的是拟南芥 *hy1*、*hy2* 突变体(Parks和Quail 1991)。

5.3.2 植物激素生理 激素含量与叶色间有较为密切的联系。叶色突变体的突变基因可直接或间接影响激素的合成, 改变突变体内源激素含量。以脱落酸(ABA)为例, ABA生物合成途径中的基因突变, 可直接抑制ABA的合成, 导致ABA含量下降, 从而影响突变体的生长发育, 造成叶色突变(Agrawal等2001); 而叶绿体发育异常则可影响ABA合成途径中关键酶的活性(ABA生物合成的起始反应在叶绿体中完成), 间接抑制ABA合成, 降低叶色突变体中ABA含量(Fambrini等2004)。

叶色突变体在植物激素研究中的应用主要分为激素的生物合成、激素的生理作用和植物对外源激素的反应三个方面。第一, 研究激素的生物合成。由于叶色突变体的突变基因影响激素的合成, 改变突变体内源激素含量。所以鉴定缺失激素的叶色突变体, 不但可增强对激素合成途径的了解(Schwartz等2003), 而且可以克隆出参与激素生物合成的基因。水稻 *Osaba1* 突变体缺失ABA, 叶片介于灰绿和绿色之间, Agrawal等(2001)通过正向遗传学的方法从中分离出了1个参

与ABA生物合成的基因。第二, 研究激素的生理作用。植物激素影响叶片的颜色, 也影响植物的生长、成熟和衰老。内源激素含量发生变化的叶色突变体, 往往表现一些异常的生理现象。细胞分裂素含量升高的叶色突变体株高下降(Gan和Amasino 1995), 叶片形态异常(Robson等2004)。缺乏ABA的叶色突变体则通常表现出下列性状: 过早萌发、易于萎蔫、气孔导度上升以及可在高渗培养基上萌发和生长(Schwartz等2003)。分析和鉴定此类突变体, 可在前人研究的基础上进一步了解植物激素的功能。第三, 植物对外源激素的反应。某些叶色突变体对外源激素敏感性有变化。如菊花不黄化(non-yellowing)品种‘Boaldi’对乙烯不敏感, 乙烯不能诱使其叶片衰老、黄化(Reyes-Arribas等2001)。此类叶色突变体可用来阐明植物对外源激素的应答机制。

5.3.3 植物病理 某些病原菌的生长、发育与寄主叶片的光合活性有密切关系。叶色突变体的黄化叶、白化叶和花斑叶失绿部分的光合能力减弱或丧失, 可将之作为实验工具研究影响这些病原菌的发育的因素。Singh等(2000)研究白粉菌(powdery mildews)时发现, 某种未知的化学物质对白粉菌的正常发育起决定性作用, 这种物质只存在于具有光合活性的组织中, 并且在自然条件下不可溶解。

5.4 叶色突变体在功能基因组学中的应用 功能基因组学主要研究生物有机体内各基因的生物功能, 进而了解所有基因如何协调发挥作用完成一系列的生长发育过程。以叶色突变性状为标记性状筛选突变体, 进而对突变体进行分析鉴定, 可较为直接而有效的研究基因功能, 了解细胞内核-质间基因互作。

5.4.1 基因的功能 通过叶色突变体研究基因功能, 可采用正向遗传学和反向遗传学两种方法。前者是通过图位克隆法或以插入序列为标签, 从叶色突变体中分离出突变基因, 而后确定发生突变的基因的功能。当突变基因未知时, 通常采用此方法。现已从缺失色素叶色突变体中分离鉴定出多个控制叶绿素合成和叶绿体发育的基因。如叶绿素酸酯a氧化酶基因(Oster等2000)、叶绿体

核糖体小亚基17基因(Schultes等2000)。后者是根据目的基因序列设计引物, 通过PCR等技术从插入突变体库中筛选出目的基因发生插入突变的叶色突变体; 或诱导目的基因沉默, 获得目的基因发生沉默突变的叶色突变体, 然后通过突变体的鉴定研究目的基因。采取此方法可较为的全面分析特定基因的功能。Jung等(2003)通过基因捕捉(gene trap)系统, 从T-DNA插入突变体库中筛选出了一个水稻镁-螯合酶H亚基基因插入突变体, 这是首例通过T-DNA插入诱变分析水稻基因功能的报道。Kumar和Sol1(2000)将HEMA基因的反义RNA转入拟南芥, 得到一系列谷氨酰-tRNA还原酶突变体, 对这些突变体的研究表明, 谷氨酰-tRNA还原酶是催化ALA形成的关键酶。

5.4.2 细胞内核质间基因互作 叶色突变体可用于研究单个基因的功能, 也可用于研究基因间的互作。分析鉴定叶色突变体可得出如下结论:

细胞内存在复杂的基因互作, 线粒体、叶绿体、细胞核基因通过信号分子协同表达, 调控植物生长发育。Lopez-Juez等(1998)对拟南芥cue突变体的研究证明了这个观点。

编码质体蛋白的核基因可控制叶发育和叶绿体的发生, 叶绿体发育状态反过来也影响核基因和线粒体基因表达。如大麦*albostrians*突变体受一个隐性核基因控制, 白化叶中的叶绿体功能完全丧失, 细胞核和线粒体基因活性也随之发生改变(Yaronskaya等2003)。

叶绿体基因功能丧失可促进或抑制核基因表达。如烟草DPI花叶突变体为叶绿体遗传。在突变体花斑叶白色部分, 数种编码叶绿体蛋白的核基因的转录水平下降(Barak等2000)。

与光合作用无直接关系的核基因发生突变可通过某些信号分子间接调控光合系统基因的功能, 从而导致叶绿体中色素含量发生变化。这方面的最直接证据是玉米转IPT基因突变体(Robson等2004)。

参考文献

- 成浩, 李素芳, 陈明, 虞富恋, 晏静, 刘益民, 陈龙安(1999). 安吉白茶特异性状的生理生化本质. 茶叶科学, 19(2): 87~92

- 陈文峻, 蒯本科(2001). 植物叶绿素的降解. 植物生理学通讯, 37 (4): 336~339
- 盖均镒主编(1997). 作物育种学各论. 北京: 中国农业出版社, 440~443
- 龚红兵, 陈亮明, 刁立平, 盛生兰, 林添资, 杨图南, 张荣铨, 曹树青, 翟虎渠, 戴新宾等(2001). 水稻叶绿素b减少突变体的遗传分析及其相关特性. 中国农业科学, 34 (6): 686~689
- 马国荣, 刘佑斌, 盖钧镒(1994). 大豆细胞质遗传芽黄突变体的发现. 作物学报, 20 (3): 334~338
- 马志虎, 颜素芳, 罗秀龙, 郝华忠(2001). 辣椒黄绿苗突变体对良种繁育及纯度鉴定作用. 北方园艺, 138: 13~14
- 潘瑞炽, 董愚得编(1995). 植物生理学. 北京: 高等教育出版社, 67~97
- 王保莉, 郭嵩光, 汪沛洪(1996). 小麦突变体返白系返白阶段叶绿素代谢的变化. 植物学报, 38 (7): 557~562
- 王勤华, 曹春英, 孙曰波, 李寿兵, 李云(2004). 红叶椿的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 40 (1): 73
- 肖松华, 张天真, 潘家驹(1995). 陆地棉芽黄突变体的遗传及在杂种优势上的利用. 南京农业大学学报, 18 (3): 28~33
- Agrawal GK, Yamazaki M, Kobayashi M, Hirochika R, Miyao A, Hirochika H (2001). 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, 125: 1248~1257
- Babiychuk E, Müller F, Eubel H, Braun HP, Frentzen M, Kushnir S (2003). *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function. Plant J, 33 (5): 899~909
- Barak S, Heimer Y, Nejidat A, Volkita M (2000). The peroxisomal glycolate oxidase gene is differentially expressed in yellow and white sectors of the DPl variegated tobacco mutant. Physiol Plant, 110 (1): 120~126
- Beale SI (2005). Green genes gleaned. Trend Plant Sci, 10 (7): 301~312
- Chen G, Bi YR, Li N (2005). *EGY1* encodes a membrane-associated and ATP-independent metalloprotease that is required for chloroplast development. Plant J, 41 (3): 364~375
- Coschigano KT, Melo-Oliveira R, Lim J, Coruzzi GM (1998). *Arabidopsis g1s* mutants and distinct Fd-GOGAT genes: implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. Plant Cell, 10: 741~752
- Fambrini M, Castagna A, Vecchia FD (2004). 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, 167: 79~89
- Fankhauser C, Chory J (1997). Light control of plant development. Annu Rev Cell Dev Biol, 13: 203~229
- Frick G, Su QX, Apel K, Armstrong GA (2003). An *Arabidopsis porB porC* double mutant lacking light-dependent NADPH: protochlorophyllide oxidoreductases B and C is highly chlorophyll-deficient and developmentally arrested. Plant J, 35 (2): 141~153
- Gan S, Amasino RM (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. Science, 270: 1986~1988
- Gaubier P, Wu HJ, Laudié M, Delseny M, Grellet F (1995). A chlorophyll synthetase gene from *Arabidopsis thaliana*. Mol Gen Genet, 249: 58~64
- Hansson A, Kannangara CG, von Wettstein D, Hansson M (1999). Molecular basis for semidominance of missense mutations in the XANTHA-H (42-kDa) subunit of magnesium chelatase. Proc Natl Acad Sci USA, 96 (4): 1744~1749
- Havaux M, Tardy F (1997). Thermostability and photostability of photosystem II in leaves of the *chlorina-f2* barley mutant deficient in light-harvesting chlorophyll a/b protein complex. Plant Physiol, 113: 913~923
- Jung KH, Hur J, Ryu CH, Choi W, Chung YY, Miyao A, Hirochika H, An G (2003). Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the T-DNA gene-trap system. Plant Cell Physiol, 44 (5): 463~472
- Kaeppeler SM, Phillips RL, Olhagt P (1998). Molecular basis of heritable tissue culture-induced variation in plants. In: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia K (eds). Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. Dordrecht: Kluwer Acad Pub, 467~486
- Kannangara CG, Gough SP, Bruyant P, Hoobwer JK, Kahn A, von Wettstein D (1988). tRNA^{glu} as a cofactor in δ -aminolevulinic acid biosynthesis. Trends Biochem Sci, 13: 139~143
- Kumar AM, Soll D (2000). Antisense *HEMA1* RNA expression inhibits heme and chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol, 122: 49~55
- Kushnir S, Babiychuk E, Storozhenko S, Davey MW, Papenbrock J, Rycke RD, Engler G, Stephan UW, Lange H, Kispal G et al (2001). A mutation of the mitochondrial ABC transporter *Stal* leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *starik*. Plant Cell, 13: 89~100
- Lopez-Juez E, Jarvis RP, Takeuchi A, Page AM, Chory J (1998). New *Arabidopsis cue* mutants suggest a close connection between plastid and phytochrome regulation of nuclear gene expression. Plant Physiol, 118: 803~815
- Monde R-A, Zito F, Olive J, Wollman F-A, Stem DB (2000). Post-transcriptional defects in tobacco chloroplast mutants lacking the cytochrome *b₆/f* complex. Plant J, 21 (1): 61~72

- Motohashi R, Ito T, Kobayashi M, Taji T, Nagata N, Asami T, Yoshida S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003). Functional analysis of the 37 kDa inner envelope membrane polypeptide in chloroplast biogenesis using a *Ds*-tagged *Arabidopsis* pale-green mutant. *Plant J*, 34 (5): 719~731
- Oster U, Tanaka R, Tanaka A, Rüdier W (2000). Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll b biosynthesis (CA0) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 21 (3): 305~310
- Parks BM, Quail PH (1991). Phytochrome-deficient *hyl* and *hy2* long hypocotyls mutants of *Arabidopsis* are defective in phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant Cell*, 3: 1177~1186
- Petersen BL, Moller MG, Jensen PE, Henningsen KW (1999). Identification of the Xan-g gene and expression of the Mg-chelatase encoding genes Xan-f, -g and -h in mutant and wild type barley (*Hordeum vulgare* L.). *Hereditas*, 131: 165~170
- Phillips RL, Kaepler SM, Olhoft P (1994). Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 5222~5226
- Reinbothe S, Pollmann S, Springer A, James RJ, Tichtinsky G, Reinbothe C (2005). A role of Toc33 in the protochlorophyllide-dependent plastid import pathway of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR) A. *Plant J*, 42 (1): 1~12
- Reyes-Arribas T, Barrett JE, Huber DJ, Nell TA, Clark DG (2001). Leaf senescence in a non-yellowing cultivar of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Physiol Plant*, 111 (4): 540~544
- Robson PRH, Donnison IS, Wang K, Frame B, Pegg SE, Thomas A, Thomas H (2004). Leaf senescence is delayed in maize expressing the *Agrobacterium IPT* gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter. *Plant Biotechnol J*, 2: 101~112
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Tabata S (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res*, 6: 283~290
- Schultes NP, Sawers RJH, Brutnell TP, Krueger RW (2000). Maize high chlorophyll fluorescent 60 mutation is caused by an Ac disruption of the gene encoding the chloroplast ribosomal small subunit protein 17. *Plant J*, 21 (4): 317~327
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD (2003). Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes and enzymes. *Plant Physiol*, 131: 1591~1601
- Singh UP, Prithiviraj B, Sarma BK (2000). Development of *Erysiphe pisi* (powdery mildew) on normal and albino mutants of pea (*Pisum sativum* L.). *J Phytopathol*, 148 (11~12): 591~595
- Sung AO, Joo-Hyun P, Gyu IL, Kyung HP, Soon KP, Hong GN (1997). Identification of three loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 12: 527~535
- Terry MJ (1997). Phytochrome chromophore-deficient mutants. *Plant Cell Environ*, 20: 740~745
- Terry MJ, Kendrick RE (1999). Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient *aurea* and *yellow-green-2* mutants of tomato. *Plant Physiol*, 119: 143~152
- Terry MJ, Wahleithner JA, Lagarias JC (1993). Biosynthesis of the plant photoreceptor phytochrome. *Arch Biochem Biophys*, 306: 1~15
- Vincentini F, Hortensteiner S, Schellenberg M, Thomas H, Matile P (1995). Chlorophyll breakdown in senescent leaves; identification of biochemical lesion in a stay-green genotype of *Festuca pratensis* Huds. *New Phytol*, 129: 247~252
- Wu DX, Shu QY, Xia YW (2002). *In vitro* mutagenesis induced novel thermo/photoperiod-sensitive genic male sterile indica rice with green-reversible xanthan leaf color marker. *Euphytica*, 123: 195~202
- Yaronskaya E, Ziemann V, Walter G, Averina N, Börner T, Grimm B (2003). Metabolic control of the tetrapyrrole biosynthetic pathway for porphyrin distribution in the barley mutant *albostrians*. *Plant J*, 35 (4): 512~522
- Zhao Y, Wang ML, Zhang YZ, Du LF, Pan T (2000). A chlorophyll-reduced seedling mutant in oilseed rape, *Brassica napus*, for utilization in F₁ hybrid production. *Plant Breed*, 119 (2): 131~135