

杨海峰, 惠林冲, 潘美红, 等. 洋葱黄色条纹突变体的特征特性[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(1): 157-165.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.01.023

洋葱黄色条纹突变体的特征特性

杨海峰, 惠林冲, 潘美红, 陈 微, 何林玉, 王江英, 缪美华, 陈振泰
(连云港市农业科学院, 江苏 连云港 222000)

摘要: 对母系遗传洋葱叶片黄色条纹突变体材料进行田间表型特征观察, 叶绿素含量测定和显微结构观察, 并利用 *jnurf13* 分子标记鉴定保持株。结果表明, 洋葱突变体为亮绿黄色条纹。黄皮、白皮和紫皮洋葱中均发现黄色条纹突变株, 黄化程度越高植株长势越弱; 整个生育期黄色条纹一直存在于管状叶、花薹、花苞、伞状花序中花梗、花瓣、雌蕊、雄蕊等部位, 直至植株枯萎也不返绿。单株自交或开放式自然授粉 F_1 中出现全黄株、黄绿条纹株和绿株 3 种类型, 无固定分离比, 全黄株苗期死亡。洋葱黄色条纹突变体黄色组织的总叶绿素、叶绿素 a 和叶绿素 b 含量显著低于绿色组织; 石蜡切片观察结果显示黄色和绿色组织的形态结构无差异, 但绿色组织的叶绿体总数高于黄色组织; 通过超显微结构观察发现, 黄色条纹突变体绿色组织中叶绿体结构与正常株无差异, 而黄色组织中类囊体、基粒等结构降解, 嗜饿颗粒数量多且集中, 影响光合作用。另外, 利用 *jnurf13* 分子标记从 12 株可育突变体中筛选出 5 株保持株, 可作为形态学标记用于洋葱细胞质雄性杂交制种。

关键词: 洋葱; 黄色条纹; 突变体

中图分类号: S633.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2019)01-0157-09

The characteristics of yellow stripe mutant in onion (*Allium cepa* L.)

YANG Hai-feng, HUI Lin-chong, PAN Mei-hong, CHEN Wei, HE Lin-yu, WANG Jiang-ying,
MIAO Mei-hua, CHEN Zhen-tai

(Lianyungang Academy of Agricultural Sciences, Lianyungang 222000, China)

Abstract: In this study, field phenotypic characteristics of maternally inherited onion leaf stripe mutants, chlorophyll content and microstructure were observed. In addition, *jnurf13* molecular markers were used to identify the maintained strains. The results showed that the onion mutants were bright green-yellow stripes and were found in yellow, white and purple onions. The higher the degree of yellowing, the weaker the growth of the plants. Yellow stripes have been accompanied by tubular leaves, calyx, peduncles, petals, pistils, stamens, until withered and not green. Single-plant self-cross or open natural pollination F_1 appeared in all three types of whole yellow, yellow stripes and green strains, no fixed separation ratio and the whole yellow plant died at seedling stage. The contents of total chlorophyll, chlorophyll a and chlorophyll b in yellow tissue of onion yellow stripe mutant were significantly lower than those in green tissue. The results of paraffin sections observation showed that there was no difference in morphological structure between green and yellow tissues, but the total number of chloroplasts in green tissues was higher than that in yellow tissues. Ultrastructural observation revealed that there was no difference in chloro-

plast structure between the green mutant tissue and the normal strain, whereas thylakoid and grana in yellow tissue were degraded, and the number of hungry particles was numerous and concentrated, affecting photosynthesis. In addition, five conserved strains were screened out from 12 fertile mutants using the *jnurf13* molecular marker and used as a morphological marker for onion cytoplasmic male hybrid production.

收稿日期: 2018-05-16

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(17)2020]; 连云港市财政专项(QNJ1706); 连云港市“521”项目[连人办(2017)4号]

作者简介: 杨海峰(1978-), 男, 贵州黄平人, 本科, 副研究员, 从事洋葱育种、栽培及分子生物学研究。(E-mail) 13775492959@163.com

通讯作者: 陈振泰, (E-mail) 13812349618@163.com

Key words: onion (*Allium cepa* L.); yellow stripe; mutant

条纹叶片是高等植物常见的叶色突变之一,主要有白、黄 2 种颜色条纹,可通过自然突变、物理辐射、化学诱变和组织培养等途径产生^[1]。目前,在水稻^[2]、小麦^[3]、玉米^[4]、文心兰 (*Oncidium* spp.)^[5]、绿槽龟甲竹 [*Phyllostachys edulis* (Carr.)]^[6]等植物中发现条纹突变。不同植物或同一植物条纹突变的遗传规律存在差异,例如水稻^[7]、大麦^[3]、狼尾草^[8]突变是核基因突变,小麦叶绿素缺失突变体(Mt135)是一个由核质基因共同作用的突变材料^[9],玉米(NCS6)^[10]和狼尾草(*vi/vi*)^[11]均是母系遗传突变类型。条纹突变体后代出现全黄(白)色、绿色和黄(白)绿色条纹 3 种颜色叶片类型。黄(白)色条纹突变体主要是缺乏叶绿素,影响植物的光合作用及其生长,其叶绿体被膜、基质和类囊体基本结构也可能发生变化。条纹突变体是研究植物光合作用机理和叶绿素生物合成与降解途径,挖掘相关光合基因的重要材料。

Tatebe^[12]首先在大葱中发现黄色条纹叶突变材料,通过遗传规律分析发现黄色条纹属于母系遗传,之后又在洋葱中发现黄色条纹突变材料,正反杂交遗传分析结果表明此突变亦属于母系遗传^[13]。洋葱突变材料自交一代在苗期表现绿色和全黄,全黄苗由于缺乏叶绿素,光合能力弱,营养消耗完后枯死,而绿色苗在生长后期,叶片表现全绿色和黄色条纹 2 种类型。以黄色条纹叶洋葱为父本与正常叶片洋葱为母本进行杂交后, F_1 及其自交 F_2 均表现为全

绿叶片;黄色条纹材料为母本与正常洋葱杂交 F_1 表现出 3 种类型:全黄植株(苗期)、黄色条纹和全绿植株,其自交 F_2 均与母株特征一致。

洋葱条纹突变体属母系遗传,可作为洋葱种质资源材料的可视化形态学标记,在洋葱杂交育种中具有重要意义,尤其是洋葱保持系的鉴定。Kim^[14]报道在洋葱育性 *Ms* 位点紧密连锁处,发现含有 12 bp 的插入序列,并开发了一种简单 PCR,用于鉴定基因型 *MsMs*、*Msms*、*msms*,该鉴定方法能够在含有 *Ms* 的位点中扩增出 241 bp 条带,在含有 *ms* 的位点中扩增出 229 bp 条带,而在含有 *Msms* 的位点中扩增出 2 条带,从洋葱突变体可育株中通过分子标记鉴定保持株,将形态学标记与分子标记结合用于洋葱杂交育种。本研究自 2013 年开始从田间收集洋葱黄色条纹突变材料,拟对洋葱突变体形态特征、超显微结构及其保持株筛选进行初步研究,为研究洋葱光合作用机制、叶绿素生物合成途径、叶绿体的结构功能和遗传发育及调控机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

洋葱试验材料的生态类型为中日照,全部来自连云港市农业科学院蔬菜研究室。2014–2017 年在洋葱资源圃中通过田间观察筛选出 12 份突变株材料,名称和特点见表 1。

表 1 供试洋葱突变材料编号、株系名称、来源及特点

Table 1 The code, name, sources and characteristics of mutant onion materials

编号	材料代码	名称	颜色	球形	熟性	材料来源	引种时间
1	d9	秀玉丸玉葱	黄皮	圆	早熟	日本协和种苗株式会社	2003
2	a1	DSD-001	黄皮	圆	早熟	北京圣华德丰种子有限公司	2005
3	3W	浜育	白皮	圆	早熟	广东良种引进服务公司	2000
4	747	黄金大玉葱	黄皮	圆	中熟	丰县小林洋葱协会	2011
5	749	全美二号	黄皮	圆	早中熟	上海瑞丰农业科技有限公司	2011
6	838	喜伯	黄皮	圆	早熟	丰县小林洋葱协会	2011
7	911	红宝 001	紫皮	高扁圆	中熟	丰县小林洋葱协会	2006
8	931	爱知赤玉葱	紫皮	圆	中熟	日本爱知县	2012
9	932	高球赤玉葱	紫皮	圆	中熟	日本爱知县	2012
10	942	极早熟赤玉	紫皮	扁	早中熟	北京市农业科学院	2014
11	953	红玛瑙	紫皮	扁圆	中熟	丰县外贸公司	2016
12	963	紫圆帅	紫皮	圆	晚熟	山东睿优农业科技开发有限公司	2017

1.2 突变体表型特征鉴定

用 RHS 比色卡(第6版,2015)对5~8号洋葱突变材料的花薹和叶片颜色进行鉴定,在洋葱突变体膨大初期、抽薹期、开花期及种子后熟期拍照观察。对5~9号突变材料进行单株自交或开放式自然授粉,统计 F_1 分离情况。

1.3 叶绿素含量的测定

参照李合生^[15]的方法,在洋葱球膨大期,分别称取1~4号材料同一叶片上黄色与绿色组织0.05 g。绿色和黄色组织4个样品分别混合,在液氮下研磨,放入50 ml 试管中,加25 ml 的95%乙醇混匀,置于黑暗中,2 h 后,取上清液于652 nm 波长下测定OD值,3次重复。计算叶绿素含量,叶绿素含量= $CD_{652} \times V / (34.5 \times W)$,式中, V 为提取液总体积(ml), W 为叶片鲜质量(mg)。

1.4 叶片解剖结构观察

取洋葱突变株全黄叶、条纹叶和正常株绿叶,将叶片横切2 cm,用FAA溶液(45%乙醇、5%冰醋酸、5%甲醛)固定,然后用Leica TP1020全自动组织脱水机脱水和浸蜡,Leica EG 1160包埋机包埋,Leica RM 2235切片机切片(厚度6 μ m),Leica HI 1220展片机展片(42 $^{\circ}$ C,24 h)。切片经脱蜡、番红(1%)和固绿(0.5%)染色、乙醇系列脱水后,中性树胶封片^[16],在XD-202倒置显微镜(佳能EOS6D)下观察和拍照。

1.5 叶片超显微结构观察

取洋葱突变株黄叶、绿叶和正常株绿叶进行超显微结构观察。将叶片横切成面积2 mm \times 2 mm大小,然后用2%的戊二醛溶液进行前固定,4 $^{\circ}$ C过夜处理,然后用2%戊二醛固定液漂洗,再用1%四氧化锇固定,再次进行漂洗,用浓度逐级递减的乙醇和丙酮脱水。按照Epon812的配方配制包埋剂,先进行样品渗透,然后再进行包埋和聚合,用超薄切片机切片,经醋酸双氧铀和柠檬酸铅液双染后^[17],在JEM-1200EX透射电镜下观察和拍照,每个样品观察10张切片。

1.6 洋葱突变材料保持株分子鉴定

取洋葱可育突变材料1~12号新鲜叶片,液氮研磨,采用北京天根DNA试剂盒(型号:DP350-03)提取洋葱基因组DNA。采用jnurf13分子标记鉴定保持株,正向引物序列为5'-TGCAAGCTTGGAACTTACGC-3',反向引物序列为5'-TTGCCAAAGGTTGCAATACA-3',引物由苏州金唯智生物有限公司合成。PCR扩增试剂购自TAKARA公司。反应体系为25 μ l,包括

2.00 μ l DNA(0.1 μ g)、2.50 μ l 10 \times PCR buffer、1.25 μ l(10 μ mol/L)正向引物、1.25 μ l(10 μ mol/L)反向引物、2.00 μ l dNTPs(10 mmol/L)、0.25 μ l Taq 酶和15.80 ml ddH₂O。*jnurf13*标记PCR扩增条件^[14]:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s,65 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,10个循环;95 $^{\circ}$ C变性30 s,57 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR产物用9%聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳检测,电压100 V,电泳3 h,硝酸银染色,用佳能EOS6D相机在胶片灯上拍照记录。

2 结果与分析

2.1 洋葱黄色条纹突变形态特征及主要农艺性状

田间观察,洋葱黄色条纹突变体叶片和花薹呈纵向黄色条纹,黄绿色相间,黄绿交替面区分明显(图1-A);通过RHS比色卡对突变株花薹和叶片颜色进行比对分析,结果显示4株材料花薹和叶片黄色部位颜色均与GREEN-YELLOW GROUP 1中的Brilliant Greenish Yellow A最为接近,为亮绿黄色(GY, GREEN-YELLOW)(图1-B)。

对5~9号共5个材料的单株进行授粉,其中5、6、7和9号2根花薹进行开放式自然授粉,5、8和9号2根花薹进行套袋自交。结果表明 F_1 均出现全黄株、黄色条纹株和全绿株3种类型,全绿株总数高于突变株数量,无一定的分离比例(表2)。



图1 洋葱突变株条纹颜色鉴定

Fig.1 Identification of stripe color in onion mutant

由图2可以看出,洋葱突变材料叶片中黄色条纹类型有:单一细黄条纹(图2-A);单独一边部分叶片有黄绿相间条纹(图2-B、C);两边对称出现黄条纹(图2-D~图2-H);叶片黄化程度非常高,占叶片面积的80%以上(图2-I)。黄色条纹面积越大,洋葱长势越弱(图2-I~图2-J)。在黄皮、白皮和紫皮

洋葱中均有黄色条纹突变,图 2-A、图 2-B、图 2-E 为紫皮洋葱,图 2-F 为白皮洋葱,其他为黄皮洋葱。

黄色条纹突变材料花薹和花苞均有黄色条纹,一直到花苞顶部(图 3)。随着植株的生长,黄色条纹一直存在,并不随外界环境变化而转绿。花苞开裂后,花序中与花薹黄色条纹对应顶端也出现相应的黄色条纹,花瓣、花柄以及雌蕊均黄化。花粉活力正常,在自然授粉后能够正常结籽。种子成熟过程中,果壳也呈黄化现象,但成熟的种子均为黑色。在种子成熟后,花薹自然干枯,绿色部位转为枯黄,黄色条纹部位转为白色。洋葱突变材料各器官形成后并不受环境影响,能够正常完成后代繁衍。

表 2 不同洋葱黄色条纹突变体单株 F_1 代分离情况

Table 2 Separation of F_1 generation from different onion yellow stripe mutants

编号	授粉方式	总数	全黄株	黄色条纹株	全绿株
5	开放自然授粉	48	1	4	43
5	套袋单株自交	37	1	1	35
6	开放自然授粉	29	1	3	25
7	开放自然授粉	95	21	10	73
8	套袋单株自交	59	1	3	55
9	开放自然授粉	78	12	18	48
9	套袋单株自交	31	10	2	19

突变体编号见表 1。

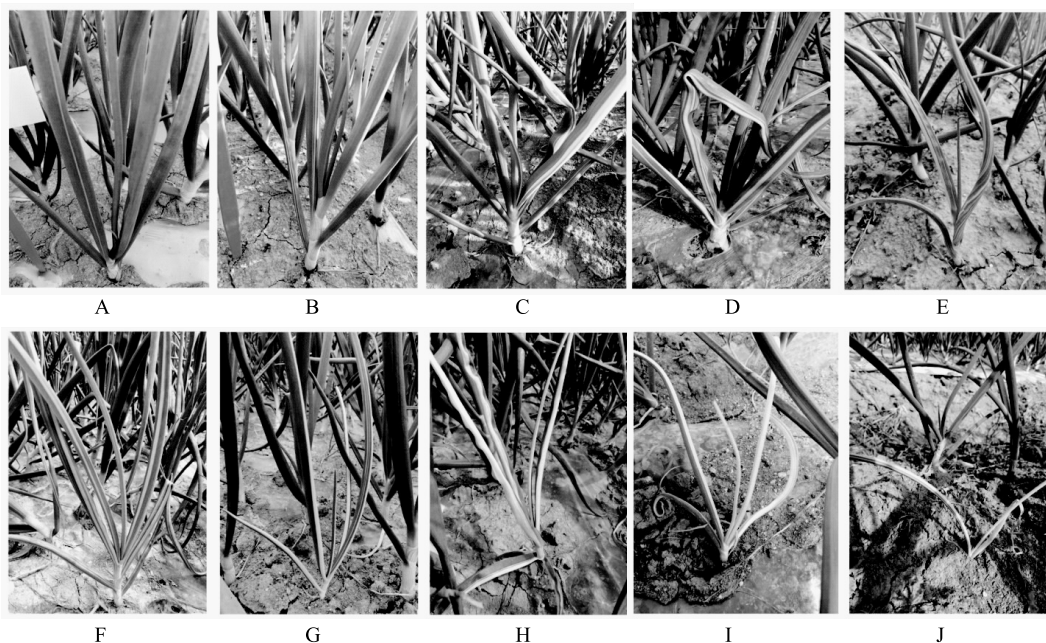
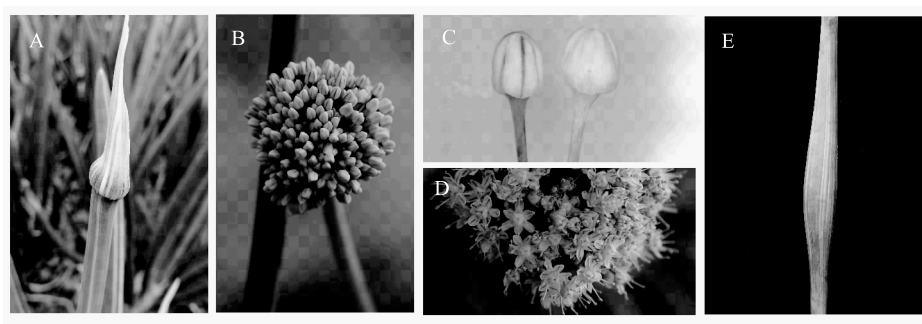


图 2 洋葱黄色条纹突变材料叶片黄色条纹类型

Fig.2 Different yellow stripe types of onion mutant leaves



A: 花薹和膜质鞘花序; B: 花序; C 和 D: 花朵; E: 干枯花薹。

图 3 洋葱突变体花薹表型特征

Fig.3 The phenotype characteristics of mutant onion scape

分别测定洋葱突变材料绿叶组织和黄叶组织叶绿素含量,发现绿叶组织叶绿素含量是黄叶组织的3倍,绿叶组织叶绿素a和叶绿素b含量也是黄叶组织的3倍,黄叶与绿叶组织的叶绿素a、b及总叶绿素含量均存在显著差异,说明洋葱黄绿叶组织的叶色差异可能是由于叶片组织中叶绿素含量不同所致。但是叶绿素a/b值差异不显著(表3)。

2.2 洋葱黄色条纹突变体叶片显微及超显微解剖结构

正常洋葱绿色叶片、黄色条纹突变体黄色条纹叶片和全黄叶片的表皮、栅栏组织、海绵组织和维管束等基本结构没有显著差异(图4)。局部放大观察,洋葱绿叶组织部分染色较深,尤其是在栅栏组织中可见明显的浓绿色条带,说明绿叶组织中含有较

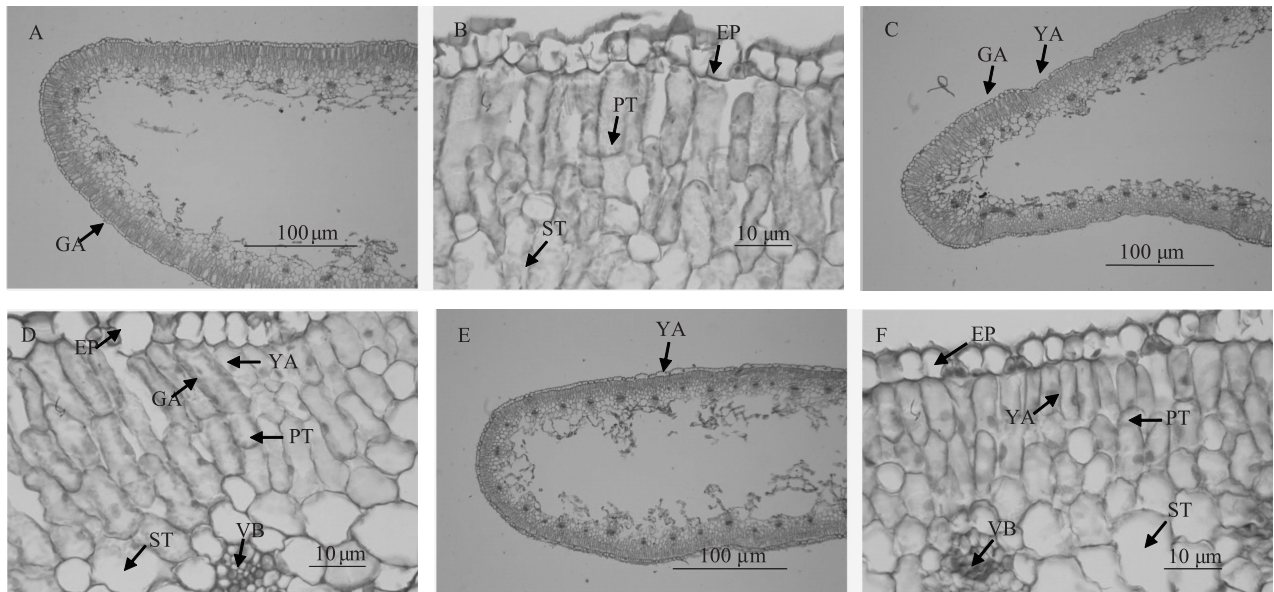
多的叶绿体及色素(图4-B),而黄叶组织部分染色较浅,栅栏组织中叶绿体与色素含量较少(图4-F)。黄色条纹叶片组织具有明显的分界线(图4-D),绿色区域叶绿体含量明显比黄色区域多。所以,黄色条纹突变体黄绿叶片叶色差异可能是由叶片组织中叶绿体数量及色素含量不同所致。

表3 洋葱黄色条纹突变体中2种类型叶片组织中的色素含量

Table 3 Pigment contents in the green and yellow leaf tissue of the yellow stripe mutant in onion

叶片类型	色素含量 (mg/g)			
	总叶绿素	叶绿素a	叶绿素b	叶绿素a/b值
绿叶组织	3.70±1.15A	3.01±0.95A	0.690.20A	4.32±0.17A
黄叶组织	1.24±0.27B	1.00±0.23B	0.24±0.05B	4.07±0.27A

同一列内不同大写字母表示差异达到0.01显著水平。



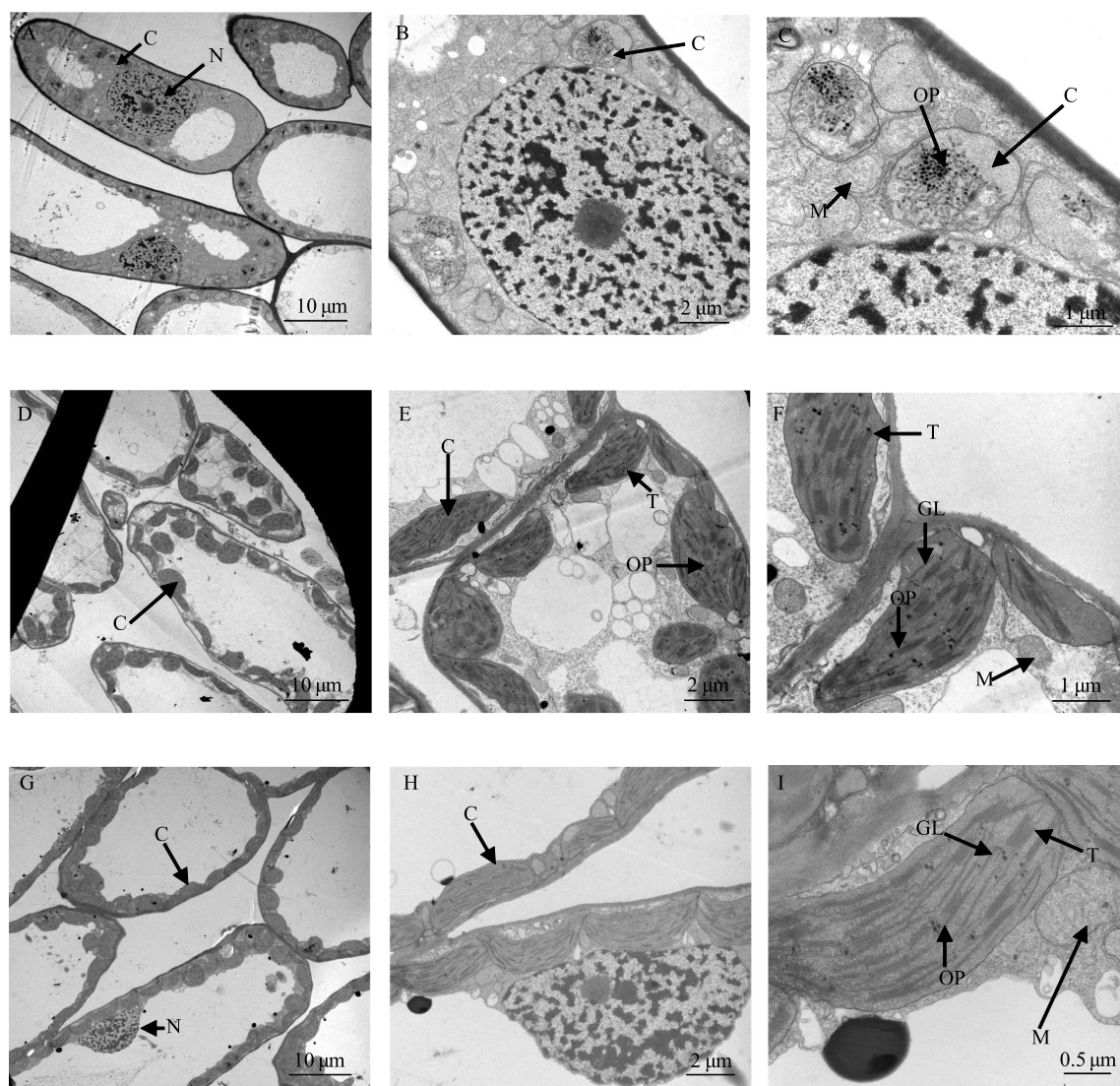
A和B:正常洋葱叶片;C和D:黄色条纹突变体黄绿叶片;E和F:黄色条纹突变体全黄叶片。EP:表皮;PT:栅栏组织;ST:海绵组织;VB:维管束。

图4 洋葱黄色条纹突变体叶片的显微结构

Fig.4 The microstructure of onion yellow stripe mutant leaves

用透射电镜对洋葱黄色条纹突变体黄色区域、绿色区域及正常植株叶片的叶绿体超微结构进行比较观察,结果表明黄色条纹突变体中绿色叶片组织的叶绿体结构与正常植株相似,但黄色叶片组织的叶绿体结构与正常植株存在显著差异。正常植株叶绿体呈纺锤形,紧贴细胞壁(图5-G),基粒片层排列有序且结构清晰,嗜饿颗粒分散且数量较少(图5-H、I)。黄色条纹突变体绿色叶片组织内叶绿体呈椭圆形或纺锤形,大小不一,排

列松散(图5-D、E),类囊体和基粒片层分布均匀,嗜饿颗粒分散,但数量较多(图5-F);黄色条纹突变体黄色叶片组织大部分叶绿体为近椭圆形(图5-A),基粒片层数目和基粒片层垛叠层数明显减少,排列疏松,看不到基粒结构和类囊体,相对于正常植株叶片组织而言,其叶绿体内膜系统嗜饿颗粒较多且相对集中(图5-B、C),说明洋葱黄色条纹突变体中黄色叶片组织中叶绿体结构发育不完整,存在明显的缺陷。



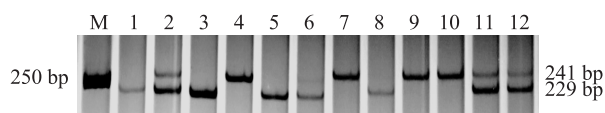
A、B、C:黄色条纹突变体黄色区域叶绿体超微结构;D、E、F:黄色条纹突变体绿色区域叶绿体超微结构;G、H、I:正常植株叶绿体超微结构。
C:叶绿体;M:线粒体;N:细胞核;OP:嗜饿颗粒;T:类囊体;GL:基粒片层。

图5 洋葱黄色条纹突变体与正常植株的叶绿体超微结构

Fig.5 The ultra-structure of chloroplast from yellow stripe mutant and normal plant of onion

2.3 洋葱黄色条纹突变材料保持株分子鉴定

为鉴定洋葱黄色条纹突变材料中的保持株,采用 *jnurf13* 标记对 12 份可育株进行鉴定。结果显示 1、3、5、6、8 号突变体 PCR 扩增出 1 个 229 bp 条带,说明只含有 *ms* 位点,基因型为 *msms*;4、7、9、10 号扩增出 1 个 241 bp 条带,只含有 *Ms* 位点,基因型为 *MsMs*;2、11、12 号扩增出 2 个条带,基因型为 *Msms* (图 6)。所以,1、3、5、6、8 号材料为保持株,可以作为形态学标记与不育株杂交, F_1 均为正常叶色的不育株,保持系自交后代又能获得黄色条纹材料。



M:Marker;1~12:突变体,见表 1。

图6 洋葱突变体保持系的 PCR 鉴定

Fig.6 Identification of onion mutant maintainer lines by PCR

3 讨论

植物叶色突变类型有斑纹、条纹等,如杜鹃花

(*Rhododendron nakaharai*, *R. arborescens* 和 *R. viscosum*)^[18]、菊花(金陵国紫)^[19]、水稻(*Zebra524*)^[20]等叶色突变体为斑纹状,水稻(*pyl-v*)^[21]、小麦(西农1718)^[22]、玉米(AD-1)^[23]、银杏(*G. biloba*)^[24]、文心兰(百万金币)^[25]等叶色突变体为黄色条纹状,有些水稻(*WSL2*, *wfsl1*)叶色突变体是白色条纹突变^[26-27]。小麦(Mt135)完全白化株叶绿素含量极少甚至完全没有叶绿素,会早衰死亡;而对于条纹株和分离绿株,由于其保留了部分光合能力,因此能够存活并正常结实^[28]。在本研究中,洋葱叶片突变体是黄色条纹状,黄绿色相间排列,条纹宽度无规律。不同颜色洋葱品种中均发现黄色条纹突变体, F₁主要表现为完全黄化株、条纹株和绿株3种类型,其中完全黄化株苗期死亡,而条纹株能够正常开花结实,属于自然突变非致死型母系遗传。与乙基甲基磺酸乙酯(EMS)诱变水稻(*wfsl1*, *st1-2* 和 *st1-3*)^[27,29]、大麦(*Tamalpais*)^[30]或辐射诱变水稻(*wsl3*, *STRIPE2*)^[31-32]获得的叶绿素缺失突变体的表型特征相似,均为条纹状突变。

不同植物条纹突变出现的时期及是否返绿各不相同。大麦(*whs18*)^[3]在拔节期开始出现白条纹,3个月后逐渐形成正常的绿色叶。水稻(*st10*)^[33]突变的叶片在2~3张叶片阶段呈白色条纹,然后随着植株的生长,白色逐渐减弱,叶片颜色恢复正常,叶脉继续呈白色,受温度变化的影响。水稻突变体(*wsl4*)在早期叶片发育过程中形成白条纹,受低温诱导表达^[34]。水稻突变体(*sdl*)幼苗的条纹叶片对温度高度敏感,随着温度的升高叶绿素含量增加^[35]。同样安吉白茶在白叶期叶色为白色,随后叶片转为正常绿色^[36]。玉米(NCS6)^[37]条纹突变体在幼苗阶段呈淡绿色,成熟时从叶鞘到节间呈黄色和白色。水稻 *wp(t)*^[38]突变体在其基部叶片上呈白色条纹,而花序和花梗呈乳白色。本研究中洋葱黄色条纹突变体在苗期和开花期的花薹、花苞、花序、雄蕊、雌蕊均为黄色,直至枯萎也不返绿。

叶色突变体中叶绿素 a 和叶绿素 b 含量减少,但大多数黄化突变体叶绿素 a/b 比值显著升高,即叶绿素 b 降低程度大于叶绿素 a^[39]。本研究中洋葱突变体叶中绿色组织叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均高于黄色组织,而叶绿素 a/b 值两者差异不显著。Sujatha 等^[11]在狼尾草黄色条纹突变体中也发现叶绿素 a/b 比值与对照差异不显著。小麦条纹株叶片呈绿

白相间的条纹,能够正常成穗结实,但其株高、穗长、单株粒数、单株籽粒质量、千粒质量都显著低于原始亲本,生育期比原始亲本延长 5 ~ 7 d,绿株与原始亲本没有显著差异^[9]。Zhao 等^[40]也发现水稻白色条纹株变矮,每穗粒数、粒质量等农艺性状均低于对照。本研究中洋葱黄色条纹程度越高,对光合作用影响越大,植株越矮小,对生长有一定的负面影响。

叶片条纹突变对叶片结构有一定影响。贾学静等^[41]研究金心吊兰的叶片解剖结构发现园艺栽培变种金心吊兰的叶片更厚,叶细胞更大,不同于全绿叶片的原变种宽叶吊兰。常青山等^[42]发现菊花黄绿叶突变体绿色组织和黄色组织均含有正常的组织结构,叶色差异可能在于叶片组织中的叶绿体数量及相关色素含量不同。洋葱条纹突变体中绿色组织和黄色组织与正常叶片组织显微结构无差异,均含有表皮、栅栏组织、海绵组织和维管束,黄色组织的叶绿素含量比绿色组织低。Li 等^[24]对银杏黄绿叶突变体的叶绿体超微结构进行观察,发现正常叶色区域叶绿体结构正常,含有类囊体膜和基质层以及少量淀粉颗粒和嗜饿颗粒,而黄色区域中叶绿体形态异常,类囊体膜破裂,基质片层不清晰或缺失,含不规则排列的囊泡,并充满大量嗜饿颗粒,且细胞的平均叶绿体数量和大小显著低于正常叶片,类囊体膜系统明显紊乱。王彩霞等^[25]发现文心兰黄色条纹叶突变体的黄色细胞组织叶绿体发育异常,多为球形,大小不一,基质中含较多嗜饿颗粒和囊泡,基粒片层稀疏,结构松散,少数叶绿体的基粒片层结构缺失。本研究中,洋葱突变体的黄色组织叶绿体减少,近椭圆形,基粒片层结构减少且松散或缺失,基质中含较多嗜饿颗粒但无囊泡,绿色组织与正常植株比较,嗜饿颗粒数量多且分散,其他无差异。说明黄色条纹突变体中黄色组织叶绿体的发育受到了严重影响。

叶色变异作为标记性状用于杂交育种和良种繁育,不但可以测定种子纯度,还可在苗期剔除假杂种。刘国民等^[43]培育的携带叶色标记的黄标 1A、黄标 2A、黄标 3A 水稻不育系同正常叶色不育系 II-32A、G46A 的叶色差异显著,易肉眼识别,在秧苗生长期间便可以根据叶色差异剔除混杂的不育系或保持系,达到去杂保纯的目的。洋葱黄色条纹突变体属于母系遗传,洋葱杂交制种中保持系常规选育周

期长且无法肉眼识别,结合分子标记能够在黄色条纹突变体中找到保持株。本研究通过 *jnurf13* 分子标记从 12 株可育的黄色条纹突变体中,筛选出 5 株保持系,自交后代成苗株有黄色条纹和全绿类型,能够直接肉眼识别,保证纯度,其与不育系杂交的后代全为正常绿色的不育系。有研究者报道君子兰 (*Cmrv*)^[44] 条纹突变体中完全绿色植株也能够再生出黄色、绿色和黄绿条纹 3 种不同类型。Tatebe^[12-13] 以洋葱、大葱条纹突变体为母本,绿色植株为父本的杂交 F_1 有 3 种类型,其中全绿株自交 F_2 均为全绿株,所以洋葱黄色条纹突变体可以作为一种形态学标记在育种中应用。后续研究中会对突变体的叶绿体、线粒体 DNA 基因组及相关转录组进行测序分析,研究突变原因。

参考文献:

- [1] JAIN H K, KHARKWAL M C. Plant breeding-mutation breeding for crop improvement[M]. Dordrecht:Springer, 2004: 601-645.
- [2] ZHANG Z G, CUI X A, WANG Y W, et al. The RNA editing factor WSP1 is essential for chloroplast development in rice[J]. Molecular Plant (Cell Press), 2017, 10(1): 86-98.
- [3] QIN D D, DONG J, XU F C, et al. Characterization and fine mapping of a novel barley stage green-revertible albino gene (*HsSGRA*) by bulked segregant analysis based on SSR assay and specific length amplified fragment sequencing[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 838.
- [4] LIN B Y, YU H J. Inheritance of a striped-leaf mutant is associated with the cytoplasmic genome in maize[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91: 915-920.
- [5] 田韦韦,王彩霞,田敏,等. 文心兰浅绿条纹突变体的生理生化及叶绿素荧光特性研究[J]. 西北植物学报, 2015, 35(10): 2012-2017.
- [6] 陈天国. 毛竹珍稀新栽培变种-绿槽龟甲竹[J]. 世界竹藤通讯, 2014, 12(2): 23-24.
- [7] YE W J, HU S K, WU L W, et al. *White stripe leaf 12 (WSL12)*, encoding a nucleoside diphosphate kinase 2 (*OsNDPK2*), regulates chloroplast development and abiotic stress response in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Molecular Breeding, 2016, 36(5): 57-72.
- [8] REDDY M K, SUBRAHMANYAM N C, APPA RAO S, et al. Ultrastructural and molecular characterization of altered plastids in nuclear gene controlled yellow stripe mutant of *Pennisetum americanum*[J]. Hereditas, 1988, 109(2): 253-260.
- [9] ZHAO H B, GUO H J, ZHAO L S, et al. Agronomic traits and photosynthetic characteristics of chlorophyll-deficient wheat mutant induced by spaceflight environment[J]. Acta Agronomica Sinica, 2011, 37(1): 119-126.
- [10] GU J, MILES D, NEWTON K J. Analysis of leaf sectors in the NCS6 mitochondrial mutant of maize[J]. The Plant Cell, 1993, 5(8): 963-971.
- [11] SUJATHA M, SUBRAHMANYAM N C. Characterisation of nuclear gene controlled yellow stripe mutant of *Pennisetum glaucum* (L.) R.Br. [J]. Plant Science, 1991, 73(1): 55-64.
- [12] TATEBE T. Genetic studies on the leaf variegation of *Allium fistulosum* linnaeus[J]. The Japanese Journal of Genetics, 1961, 36: 151-156.
- [13] TATEBE T. Genetic studies on the leaf variegation of *Allium cepa* L.[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1968, 37(4): 345-348.
- [14] KIM S. A codominant molecular marker in linkage disequilibrium with a restorer-of-fertility gene (*Ms*) and its application in reevaluation of inheritance of fertility restoration in onions [J]. Molecular Breeding, 2014, 34: 769-778.
- [15] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000: 134.
- [16] 何俊平,朱家成,王建平,等. 甘蓝型油菜幼苗显微组织结构与抗寒性的关系[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 19-26.
- [17] 曾爱松,宋立晓,高兵,等. 低温胁迫下甘蓝叶片细胞超微结构及叶肉细胞内 Ca^{2+} 的分布变化[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(5): 1053-1058.
- [18] KOBAYASHI N, MATSUNAGA M, NAKATSUKA A, et al. Chimeric inheritance of organelle DNA in variegated leaf seedlings from inter-subgeneric crossing of azalea[J]. Euphytica, 2013, 191(1): 121-128.
- [19] 常青山,张利霞,陈煜,等. 菊花黄绿叶突变体的光合与类囊体膜光谱[J]. 林业科学, 2013, 49(2): 72-78.
- [20] 李燕群,钟萍,高志艳,等. 水稻斑马叶突变体 *zebra524* 的表型鉴定及候选基因分析[J/OL]. 中国农业科学, 2014, 47(15): 2907-2915.
- [21] KAZUO T, MASAHICO M, KYOKO T, et al. An active DNA transposon *nDart* causing leaf variegation and mutable dwarfism and its related elements in rice[J]. The Plant Journal, 2006, 45(1): 46-57.
- [22] 曹莉. 一个新的小麦黄化突变体研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2007.
- [23] EFRON Y. An *ems*-sensitivity factor in maize conditioning albino leaf stripes [J]. Genetics, 1974, 78(3): 859-867.
- [24] LI W X, YANG S B, LU Z G, et al. Cytological, physiological, and transcriptomic analyses of golden leaf coloration in *Ginkgo biloba* L.[J]. Horticulture Research, 2018, 5(1): 12.
- [25] 王彩霞,田韦韦,田敏,等. 文心兰黄化突变体的初步研究[J]. 核农学报, 2013, 27(12): 1845-1852.
- [26] LYU J, WANG Y H, LIU L L, et al. A putative plastidial adenine nucleotide transporter, BRITTLE1-3, plays an essential role in regulating chloroplast development in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of Plant Biology, 2017, 60(5): 493-505.
- [27] GE C W, WANG L, YE W J, et al. Single-point mutation of an histidine-aspartic domain-containing gene involving in chloroplast

- ribosome biogenesis leads to white fine stripe leaf in rice[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 3298.
- [28] 赵洪兵,郭会君,赵林妹,等. 空间环境诱变小麦叶绿素缺失突变体的主要农艺性状和光合特性[J]. 作物学报, 2011, 37(1): 119-126.
- [29] CHEN X Q, ZHU L, XIN L, et al. Rice *stripe1-2* and *stripe1-3* mutants encoding the small subunit of ribonucleotide reductase are temperature sensitive and are required for chlorophyll biosynthesis [J]. PLoS ONE, 2015, 10(6): e0130172.
- [30] 齐新丽,徐智斌,裴洪翠,等. 大麦 EMS 突变群体的创建及功能评价[J]. 麦类作物学报, 2012, 32(5): 846-852.
- [31] ZHAO S L, LONG W H, WANG W H, et al. A rice *White-stripe leaf3 (wsl3)* mutant lacking an HD domain-containing protein affects chlorophyll biosynthesis and chloroplast development [J]. Journal of Plant Biology, 2016, 59(3): 282-292.
- [32] XYA J, DENG Y W, LIA Q, et al. *STRIPE2* Encodes a putative dCMP deaminase that plays an important role in chloroplast development in rice[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2014, 41(10): 539-548.
- [33] HE Y H, ZOU G X, RAO Y C, et al. Genetic analysis and gene mapping of a rice white stripe leaf mutant (*st10*) [J]. Plant Gene and Trait, 2011, 2(4): 23-29.
- [34] WANG Y, REN Y, ZHOU K, et al. *WHITE STRIPE LEAF4* encodes a novel P-Type PPR protein required for chloroplast biogenesis during early leaf development[J]. Frontiers of Plant Science, 2017, 8: 1116.
- [35] QIN R, ZENG D, LIANG R, et al. Rice gene *SDL/RNRS1*, encoding the small subunit of ribonucleotide reductase, is required for chlorophyll synthesis and plant growth development[J]. Gene, 2017, 627: 351-362.
- [36] 成浩,陈明,虞富莲,等. 茶叶片阶段性返白过程中色素蛋白复合体的变化[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(4): 300-304.
- [37] GU J, MILES D, NeEWTON K J. Analysis of leaf sectors in the NCS6 mitochondrial mutant of maize[J]. The Plant Cell, 1993, 5(8): 963-971.
- [38] LI H C, QIAN Q, WANG Y, et al. Characterization and mapping of a white panicle mutant gene in rice[J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(5): 457-459.
- [39] 魏彦林,施勇烽,吴建利. 水稻核基因控制的叶色变异[J]. 核农学报, 2011, 25(6): 1169-1178.
- [40] ZHAO F M, ZHANG Y, WU Y R, et al. Morphological and physiological analysis of narrow and striped leaf 1 (*ns11*) mutant of rice (*Oryza sativa* L.) and the gene mapping [J]. Chinese Science Bulletin, 2014, 59(9): 840-848.
- [41] 贾学静,冉何陈,曾顺华,等. 园艺观赏植物金心吊兰的叶片解剖结构[J]. 四川农业大学学报, 2011, 29(2): 199-202.
- [42] 常青山. 菊花黄绿叶突变体黄叶与绿叶组织形成的生理与分子机制比较研究[D]. 南京:南京农业大学,2011.
- [43] 刘国民,高必军,文绍山. 带有黄绿叶色标记的香型籼稻不育系形态特征及开花习性[J]. 分子植物育种, 2009, 7(5): 916-921.
- [44] WANG Q M, WANG L, ZHOU Y B, et al. Leaf patterning of *Clivia miniata* var. *variegata* is associated with differential DNA methylation [J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(1): 167-184.

(责任编辑:张震林)