

文章编号:1000-582X(2007)07-0113-08

滞绿突变体的研究现状及应用前景

严波^a, 陈国平^a, 胡宗利^a, 罗敏^{a,b}, 陈绪清^a

(重庆大学 a. 生物工程学院; b. 期刊社英文编辑部, 重庆 400030)

摘要:许多物种的滞绿突变体具有相似的表型特征,即衰老被延缓,叶绿素不降解或降解缓慢。但由于遗传背景不同,它们滞绿的分子机理相差很大。文中综述了滞绿突变体在生理生化(叶绿素的酶代谢途径)、遗传特征及分子生物学上的研究进展,介绍了滞绿突变体在植物叶绿素代谢、叶片衰老机制以及光合作用等生理过程基础研究中的重要性,并全面介绍了在农业生产的各个方面的应用前景及潜力,其中以能显著提高农作物抗逆性及产量的类型 A 和 B 的功能型滞绿突变最为重要,同时对滞绿的分子机理的研究使从根本上解决农作物早衰的问题成为可能。

关键词:滞绿突变;非黄化;衰老;叶绿素代谢;遗传变异;SGR

中图分类号:Q943.2

文献标志码:A

高等植物的叶片衰老最早发生在叶绿体向有色体转化,在转化过程中叶绿素降解,其它有色色素(如叶黄素等)积累。绝大多数绿色植物衰老时最直观的表现就是绿色消失叶片发黄。然而在大豆(*Glycine max*)^[1]、辣椒(*Capsicum annuum*)^[2]、番茄(*Lycopersicon esculentum*)^[3]、草地羊茅(*Festuca pratensis*)^[4]、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)^[5]、烟草(*Nicotiana tabacum*)^[6]、高粱(*Sorghum vulgare*)^[7]、水稻(*Oryza sativa*)^[8]和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[9]等植物中相继发现了衰老叶片依然保持绿色的滞绿突变体(stay-green mutation)。在这些滞绿突变体的衰老叶片里,叶绿素含量明显高于同时期野生型的。如番茄 *gf*(green flesh) 突变体早期的生长与形态同野生型的一样,到了叶片衰老期却产生了很大差异,突变体植株最下节点的叶片不发黄,衰亡的叶片最终凋谢,但仍然保持着绿色。*gf* 果实成熟过程中仍然保留相当数量的叶绿素因而呈现铁锈色。离体处于成熟期的叶片用乙烯处理或者在黑暗条件下时,突变体叶片仍然保持绿色,叶绿素只损失了 5%,而野生型的叶片几乎全部发黄^[10]。

在植物叶片衰老过程中植物的细胞结构和代谢、基因表达等生理活动发生了一系列的变化导致叶绿素降解,进而光合作用能力下降,光合产物的形成量也随

之降低,生物量增加变得缓慢直至完全停止。但是,在衰老期功能型滞绿突变体的叶片内叶绿素基本不降解或降解很慢,而且仍然保持着较强的光合作用。这些衰老叶片仍然具有光合能力的滞绿突变体的生物产量要显著高于野生型,且其茎秆在抗逆能力,如抗病性、抗干旱、抗倒伏等方面具有很强的优势^[11-12]。

滞绿突变体的这一明显外在表型以及在提高农作物产量上所展现的巨大潜能,吸引了众多科学家的研究兴趣和热潮。文中综述了滞绿突变体的研究现状并对其在农业上的应用前景作了展望。

1 滞绿的定义

滞绿(stay green)是指植物在衰老过程中叶绿素不降解或降解不明显的现象。其最明显的特征是植株生育末期叶片保持绿色的时间较长,甚至完全不黄化。但是也有叶片和种子上同时出现滞绿性状的,如豌豆^[13]、菜豆^[14]等。在番茄 *gf* 突变体的叶片和果实中都同样有着绿色滞留的现象^[15]。1998年 Bekavac 在对滞绿型玉米品种作相关生理指标的测定、研究后,提出“滞绿度”这一概念^[16],使人们对滞绿型与非滞绿型品种的区别有了一个定量的标准。他认为,绿色组织面积占整株面积(即滞绿度)超过该种群的平均水

收稿日期:2007-03-21

基金项目:重庆市科委自然科学基金资助项目(CSTC,2006BB1194)。

作者简介:严波(1979-),男,重庆大学硕士研究生,主要从事植物分子生物学研究。陈国平(联系人),男,教授,博士生导师,
(E-mail) chenguopmg@cqu.edu.cn。

平,且子粒含水量低于或等于该种群平均水平的植株就可以认为是滞绿的品种。如果某一品种的滞绿度和子粒含水量均高于种群的平均水平,则该品种就不是滞绿型品种,而是具有较长生育期(或贪青晚熟)的品种,如玉米 Lo87602,虽表现出衰老延缓的特征,其成熟时叶片含水量和叶绿素含量均较高^[17]。

2 滞绿突变体的4个类型

生长发育各阶段始终保持绿色的突变体在许多物种中相继被发现,对它们的生理研究表明,不同突变体又有各自的特点。Thomas 等(2000年)^[18]根据突变体叶片发育过程中叶绿素含量和光合速率的变化,将植物滞绿方式分为5个类型(见图1)。A型,叶片衰老延迟,当叶片开始衰老后,其叶绿素含量和光合速率下降的速度与野生型一样,如玉米突变体 fs854^[19];B型,叶绿素含量与光合作用速率下降的起始时间与野生型相同,但较野生型下降缓慢,如高粱的滞绿突变体 R16^[20];这些滞绿型植物能进行较长时间的光合作用,

往往表现出高产特性。C型,叶绿素的降解被抑制,当叶绿素含量达到最大值后,直至叶片衰老晚期,其含量基本保持不变,但其光合速率下降的起始时间和速度与野生型一样,如草地羊茅突变体 bf993^[21]和番茄 *gf* 突变体。D型,还未衰老黄化的叶片,由于遭受突发病虫害、低温冷冻、煮沸或干燥等自然和非自然的因素影响,叶片组织快速地死亡,叶绿素永远地滞留在叶片中,但此刻它的光合作用随着组织的破坏而急剧下降直至停止。如冷冻的菠菜叶片、干燥的标本集,在遭受青枯病的农作物上也可以看见类似的滞绿现象。E型,相对于野生型而言,突变体的叶绿素含量在其成熟期更高,在植株生理生长的衰亡末期叶绿素需要更长的时间才能被降解。在以上5种滞绿的方式中,除D型是由于外界环境造成的滞绿现象外,其它A、B、C和E型被认为是植物自身基因的变异而引起的滞绿表型,根据这4种滞绿的方式又将滞绿突变体分为相应的4种类型^[22]。

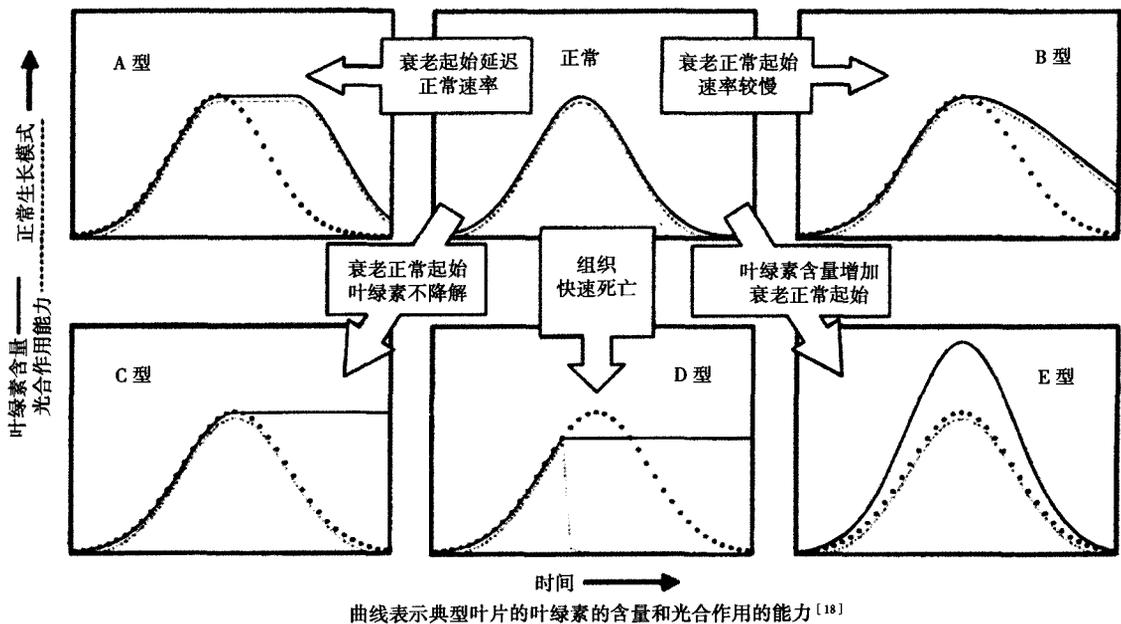


图1 滞绿的5种方式

3 突变体滞绿的成因

相对于野生型植株,各种滞绿突变体有着相似的表型特征,即叶片衰老延迟、与衰老相关的蛋白质破坏速度降低以及叶绿素的不降解或降解缓慢。叶片的衰老是一系列生物化学反应的结果,其中许多反应与叶绿素降解有关。迄今为止所报道的对滞绿突变体的分子机理、生理生化特性的研究中,大部分集中于探索其叶绿素降解有关的部分过程是否被抑制或阻断。尽管

很多因素,如热、酸、碱、光、自由基离子等都能破坏叶绿素的结构而使其降解,但是在高等植物中叶绿素的大量代谢主要是由酶催化的生化代谢的 PAO 途径(如图2)完成的^[23-25]。

3.1 叶绿素代谢的 PAO 途径与滞绿突变

叶绿素的降解由叶绿素酶(Chlase)、去螯合镁酶(MDCase)、脱镁叶绿酸 a 加氧酶(PAO)和 RCC 还原酶等一系列酶催化。其中来自叶绿体内膜的 PAO 酶催化氧化脱镁叶绿酸 a,打开卟啉环,生成红色叶绿素

降解物(RCC),叶绿素的绿色从此消失。在紧接着的链式反应中,RCC 被 RCC 还原酶还原成初生荧光叶绿素降解物(pFCC)^[26-28]。代谢途径中任一酶活性异常都有可能影响叶绿素的代谢,导致其降解缓慢甚至基本不降解。在 *Phaseolus vulgaris* 非黄化(滞绿)突变体的叶片里叶绿素酶的活性没有改变,且在野生型和突变体的衰老叶片里都检测不到脱镁叶绿酸 a^[29]。但是在突变体中有脱植基叶绿素 a 和 b 的积累,而野生型却没有,说明在突变体衰老过程中脱植基叶绿素没有正常发生去螯合镁反应,由此推测在突变体中可能没有去螯合镁酶的活性。PAO 酶的活性仅在植物的衰老叶片和成熟的果实中发现^[10,30-31],并且 PAO 酶的活性与叶绿素丢失的速率成正相关,它对底物脱镁叶绿酸 a 具有绝对的专一性^[30]。在对一种滞绿型的

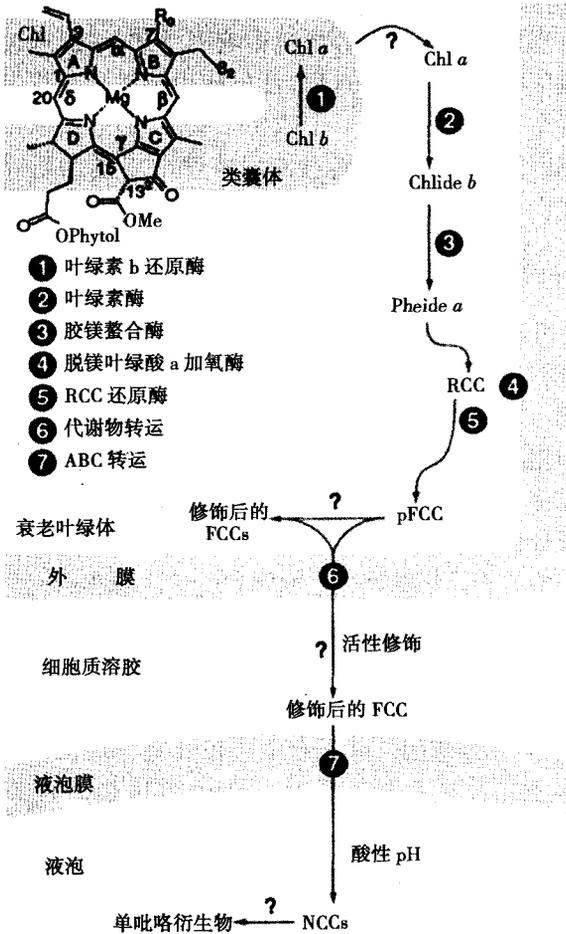
草地羊茅(*Festuca pratensis*)的研究中发现,叶绿素酶和去镁螯合酶表现出正常的水平,而 PAO 酶的活性比野生型低很多。PAO 酶活性的减弱被认为是豌豆、菜豆和草地羊茅(*Festuca pratensis*)等绝大多数 C 型滞绿的原因^[4,13,18,31-32]。

Ayumi Tanaka 在总结叶绿素代谢途径时认为叶绿素 b 还原酶,羟甲基叶绿素 a 还原酶以及开卟啉环的 PAO 酶这 3 个酶的活性的降低或者缺失都有可能使叶绿素的降解被阻断,导致植物出现滞绿^[33]。尽管如此,2005 年 Efrati 通过基因作图和遗传定位的方法对辣椒 *cl* (chlorophyll retainer) 和番茄 *gf* (green flesh) 两个滞绿突变体进行研究并发现,*cl* 和 *gf* 的滞绿表型是由两个同源基因突变引起的,但是 *cl* 和 PAO (编码 PAO 酶) 基因及番茄的 3 个 CHL (编码叶绿素酶) 基因定位在不同的染色体上^[34],这意味着在辣椒的 *cl* 突变体中,导致其滞绿的并不是直接参与叶绿素代谢的酶,可能是调控这个代谢途径的其它基因变异造成。

3.2 基因突变引起的滞绿

不同的滞绿突变体虽然具有相似的滞绿特性,但在对植物激素处理的响应、光合作用的能力相关酶或蛋白质变化、性状表达的组织特异性以及遗传机理等方面却存在着诸多差异^[11,18]。产生这些差异的根本原因是它们的遗传背景不同,也就是它们突变的基因不同^[22]。

早在 20 世纪 50 年代,Kerr 就研究了番茄滞绿突变体 *gf* (green flesh) 及其遗传连锁关系,发现 *gf* 的滞绿是由单一核基因隐性遗传突变引起的,并将突变基因定位在番茄第 8 号染色体上^[3,35]。Efrati 对辣椒的突变体 *cl* (chlorophyll retainer) 进行了遗传定位和分子作图的研究^[34],通过辣椒的 CL 和番茄的 GF 在对应染色体上的分子定位图谱,得出 *cl* 和 *gf* 的滞绿是由同源基因突变造成,并且 CL 基因与标记序列 CT28 和 TG510 紧密连锁,位于第 1 号染色体上。1969 年,英国威尔士植物育种站 (Welsh Plant Breeding Station) 在草地羊茅 (*Festuca pratensis*) 品种 S. 215 中发现一株滞绿突变体^[4]。在通过一系列的杂交、自交、重复回交等遗传学方法试验之后,Thomas (1987) 确定了草地羊茅滞绿突变体 bf993 被单个隐性等位核基因 *sid* (senescence-induced degradation) 诱导调控着^[4],经过鉴定 *sid* 位于两个连锁的 AFLP 标记之间^[36]。在对大豆滞绿突变的研究中,已经找到了 3 个滞绿的基因型,分别为呈显性的核基因 (*G*, *d₁d₂*) 和细胞质基因 (*cytG*) 以及 2 个隐性等位基因 *d₁d₁d₂d₂* 和 *G₋d₁d₁d₂d₂*,它们调控着叶、豆荚、种皮和胚芽的绿色^[37]。*cytG* 突变体



图中“?”表示未知的反应,吡咯环(A-D), Chl: 叶绿素; R₀ = CH₃, phytol = 叶绿醇 Chl a = 叶绿素 a; R₀ = CHO, Chl b = 叶绿素 b; Chlide a = 叶绿素 a 酸酯; Pheide a = 脱镁叶绿酸 a; RCC = 红色叶绿素降解物; pFCC = 初生荧光叶绿素降解物; FCCs = 荧光叶绿素降解物; NCCs = 非荧光叶绿素降解物

图 2 高等植物的叶绿素生化代谢途径 (PAO 途径) 模型图

导致开始衰老大豆叶片的叶绿素 b 比叶绿素 a 更稳定^[38], 在 d_1d_2 的纯合突变体中衰老时可溶性蛋白的降解被显著的延缓了^[39]。

滞绿突变体在生理学、细胞学、生物化学和遗传特征上都有详尽研究和描述^[4,40-42]。随着分子生物学的发展,人们把目光集中到研究滞绿的分子机理上来。一个偶然的发现, K. - W. Cha 等(2002年)用诱变剂 N-甲基-N-亚硝基脲(N-methyl-N-nitrosourea)人工诱变日本产糯米稻,在后代中发生了突变的后代中发现一株近似滞绿突变类型 C 的突变株^[43]。通过遗传群体的杂交试验及分子遗传标记,把这个控制滞绿表型的单个隐性核基因 SGR (senescence-inducible chloroplast stay-green protein) 定位于 9 号染色体的长臂,在 RFLP 标记的 RG662 和 C985 之间,并克隆出 SGR 基因的全长 cDNA (GenBank 登陆号为 AY850134)。2007 年 Armstead 的研究小组在拟南芥中通过 RNAi 的技术使 SGR 基因沉默,发现 SGR 基因沉默的拟南芥都表现出不同程度的滞绿现象^[44]。SGR 基因在其它高等绿色植物中也相继被克隆出来并登陆在 GenBank 上^[45], 拟南芥 (AY850161); 高粱 (AY850140); 日本结缕草 (AY850154); 玉米 (AY850138); 大麦 (AY850135); 稻 (AY850134); 大豆 (AY850141); 番茄 (DQ100158, 由本实验室克隆)。这些新发现的 SGR 基因由核基因编码并受衰老特异诱导表达,由它们的碱基序列推导的蛋白质产物有 261-269 个氨基酸,并且包涵了一个到叶绿体的信号肽,但是它们是如何发挥功能调控叶绿素的降解,目前还不清楚。尽管如此,无论是前人对各种滞绿突变体在遗传特征上研究结果以及滞绿基因座在染色体上的定位研究,还是后来 SGR 基因的发现和被成功的克隆,这些都为在分子水平上研究滞绿突变体,从而最终揭示其滞绿的分子机理奠定了坚实的基础。

3.3 基因工程(抑制成熟、衰老)引起的迟衰、滞绿

Robson 等^[46](2004年)通过转基因的方法将玉米衰老增强启动子和 IPT 基因(IPT 基因编码细胞分裂素合成的一个限速酶)融合转入玉米后,转基因植株在衰老期仍然合成大量细胞分裂素而表现出常绿性状。将来源于拟南芥的衰老特异启动子 SAG_{12} 和 IPT 基因连接,并转化到烟草中,在烟草转化体上也能观察到滞绿现象^[47]。通过降低促进成熟和衰老的激素水平,在一定程度上也可以使植物呈现滞绿的表型。如在番茄中通过转基因技术反义抑制 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)氧化酶基因的表达,从而抑制内源乙烯的生物合成,使叶片的衰老明显地被延缓了^[48]。类似的现象在

拟南芥的乙烯不敏感突变体中也很明显^[49]。

3.4 外界环境因子引起的滞绿

除了植物自身基因的变异引起滞绿的外在表型外,特殊的外部环境也会使植物出现类似滞绿的特性。如农作物可通过去花、去除果实、热胁迫、遮荫、提高细胞分裂素 CTK 水平、抑制蛋白质的合成等方法人为干涉衰老,产生滞绿表型。去掉衰老叶片上的嫩芽通常能抑制其黄化,甚至使其恢复绿色。氮肥使用量的不同也可以影响玉米叶片的滞绿特性。在玉米中,剪顶(detopping)被证明可负调控衰老增强基因^[50]。一系列生长调控物质、代谢抑制物和某些未知作用的化学物质可以制止黄化。如铁螯合剂对保留绿色很有效,这很可能是因为它们作用于叶绿素降解中的铁依赖步骤^[30]。外界干预产生的滞绿表型是不能遗传的,但是这些现象说明来自外部环境因子的干扰,通过扰乱特殊的生化或生理过程,使植株出现滞绿。找出调控各个过程的特定的一个或多个基因,通过操纵相应的基因即能得到可遗传的滞绿特性^[18]。这为研究滞绿突变体提供了新的线索和方向。

4 滞绿突变体的应用

叶绿素捕捉的太阳能,通过光合作用转化为生物能,同时产生的氧气和有机物是其他生物赖以生存的基础。叶绿体的光合反应中心、叶绿体内各种酶的相互作用、叶绿素代谢等之间有着怎样错综复杂的关系,叶绿体自身基因和核基因如何有序的表达与调控着,以及如何更加有效利用太阳能资源为人类服务都是科学家们一直思索的问题。滞绿突变的发现和为解决这些问题提供了新的研究思路和研究方向。

4.1 理论研究

在基础理论研究中,滞绿突变体是研究植物叶绿素代谢、光合作用及其光合电子传递链、激素响应、以及早衰、抗逆境等一系列生理代谢过程的理想材料^[20,21,51-55]。对 4 种类型滞绿突变体的深入研究,不仅有助于发现参与叶绿素代谢的新酶或新途径,揭示叶绿素的代谢过程中相关酶的催化特性,而且还可以验证前人对叶绿素代谢的各种假说,甚至为新假说的提出提供依据,促进相关基础理论的发展和完善。对滞绿突变体的深入研究还有助于阐明叶绿素含量与光合功能之间的关系、植物衰老过程的特征,探索衰老现象的实质。自然或基因工程得到滞绿突变体在分析叶片衰老以及激素刺激,生物、非生物胁迫环境下与衰老、抗病、抗逆相关基因的特异表达变得越来越重要。同时它也是探索衰老和区别类囊体的不同成分降解的

有力工具^[38]。已发现的各种滞绿植物虽有着同样的滞绿表型,但由于存在着不同的遗传基础,因而各个突变体的滞绿机制是不尽相同的。同一滞绿性状可能受不同基因控制;同一基因功能缺损的程度不同也可能造成不一样的滞绿类型。研究不同类型滞绿突变有可能发现并克隆与叶绿素代谢紧密相关的新基因,如新发现的SGR基因,受衰老诱导而特异表达,它的突变使水稻产生类似于类型C的滞绿表型^[43]。

20世纪70年代后,以叶绿素为光敏剂来开发利用太阳能的研究成了科学家的热门课题。Takahashi等发现,通过模仿天然植物的叶绿素的光合成反应中心,可获得较好的光电能量转换^[56]。由于离体的叶绿素很快便失去了活性,所以天然叶绿素的不稳定、易降解是开发廉价高效太阳能电池的一大瓶颈。然而滞绿突变体有着叶绿素不降解的优良性状,这有可能为研究低成本高效率的太阳能新型电池,提高太阳能利用率开辟新的研究思路和方向。从这个层面上讲,滞绿突变体的基础研究不仅有可能缓解全球性能源危机,而且可以加速各学科(植物学、光化学、微电子学、纳米材料学等)之间的交叉和渗透,也为新学科新技术的产生奠定基础。

4.2 提高农作物的生物量(产量)和抗性

由于在生育后期功能型滞绿突变体A型的叶片延缓衰老,功能型滞绿突变体B型的叶绿素含量和光合能力下降缓慢,这种滞绿突变体的生物学产量要比非滞绿的同物种高很多。Ma(1998)研究表明,玉米滞绿型品种(cv. pioneer 3902)在子粒灌浆期比早衰品种(cv. pride 5)多生产24%的干物质,同时多吸收30%的氮素^[57]。Gan和Amasino(1995)曾用转基因技术诱发了1个烟草滞绿突变体,此种突变体的生物量和种子产量分别增加了40%和52%^[47]。滞绿型禾本科作物的叶绿素含量明显增加,如果将滞绿基因转移到水稻品种中,滞绿型水稻在增加稻谷产量的同时又提高了稻草的饲用价值,对促进农区畜牧业的发展有着重要的意义。功能型滞绿基因的作用减缓或阻止了茎、叶中叶绿素的降解,致使滞绿型品种在成熟后茎、叶中的叶绿素含量始终保持原水平而不减少,同时也保持了光合作用。从另一个角度讲,滞绿基因是与衰老有关的基因,对它的深入研究可能是解决农作物早衰的新途径。

在植物的生理成熟时期及其后期,有滞绿性状的植株很容易辨识。这一非常直观的外在表型可以作为良种繁育和杂交育种的筛选标记。此外,与野生型相比,滞绿突变体的茎秆抗逆能力(抗病、抗干旱、抗倒

伏等)^[11-12]方面具有很强的优势,在育种的生产实践中,这些有滞绿性状的作物作为遗传改良的育种材料一直受到育种家的关注和青睐。如澳大利亚昆士兰利用滞绿特性提高高粱对水的利用效率,培育很多抗干旱的改良品种供干旱地区种植^[58]。

4.3 农产品贮藏、运输和保鲜

滞绿突变体在观赏类的植物选育和栽培中,也有很大的潜力。菊花不黄化(non-yellowing)品种“Boaldi”,在黑暗中处理12d后的叶片仍为绿色,其观赏价值不因长时间黑暗储藏和运输而降低^[59]。绿色蔬菜在贮存、运输或加工过程中,叶绿素容易降解,叶片发黄变质,难以适应长途运输和较长时间的贮藏,使其食用品质和商品品质下降。那么,延缓绿色蔬菜叶片衰老、变质,延长保鲜期,提高其经济价值,就成为一个迫切需要解决的难题。在实际生产上,虽然保持蔬菜绿色的方法有很多,但有的方法成本太高,有的方法在加工过程中由于重金属的残留而受到食品卫生法的限制,并且保绿效果不十分理想。滞绿突变体具有在衰老后叶绿素降解不明显和叶片依然保持绿色的先天优势,因而在绿叶蔬菜的育种和栽培上有巨大的应用前景和经济价值。

5 结 语

A型和B型的滞绿突变可以大幅提高生物量,对这2种滞绿突变的深入研究,可以有效地解决人类今后的粮食问题,这有着极其重大的意义和价值。目前,在对滞绿突变的分子机理的探索中,已经明确的是水稻中SGR基因的变异使水稻出现近似于类型C的滞绿性状,而对于能增加生物量的A、B两种类型的滞绿突变在基因水平上的研究仍未见任何报道。A、B型与C型滞绿突变在分子机理上有什么联系?它们是否由同一基因的损伤程度不同造成,还是分别涉及不同的滞绿相关的基因(包括未知的新基因和其它未知功能的已知基因)?这些滞绿相关的基因的表达是被衰老诱导,还是其表达引发了植株的衰老?它们的上游调控基因的变异是否也会引发滞绿(抑或是不同类型的滞绿)?这些基因如何引发植物的抗病、抗旱、抗逆境反应等,这些都是未来研究的热点和重点。随着研究的深入,各种类型滞绿的分子机理将会被一一破解,同时滞绿也将会更加有效地应用到人们的生产和生活中,造福于人类。

参考文献:

- [1] WOODWORTH CM. Inheritance of cotyledon seed-coat hi-

- lum and pubescence colors in soybeans[J]. *Genetics*, 1921 (6):487-553.
- [2] SMITH PG. Inheritance of brown and green mature fruit color in peppers [J]. *Hered*, 1950(41):138-140.
- [3] KERR EA. *Green flesh*, *gf*[J]. *Tomato Genetics Cooperative Reports*, 1956,6;17.
- [4] THOMAS H. Sid: a Mendelian locus controlling thylakoid membrane disassembly in senescing leaves of *Festuca pratensis* [J]. *Theor Appl Genet*, 1987(73):551-555.
- [5] HARDWICK RC. Leaf abscission in varieties of *Phaseolus vulgaris* L. and *Glycine max* (L.) Merrill—a correlation with propensity to produce adventitious roots [J]. *Jour Ex PBot*, 1979(30):795-804.
- [6] CRAFTS-BRANDNER SJ, LEGGETT JE, SUTTON TG, et al. Effect of root system genotype and nitrogen fertility on physiological differences between burley and flue-cured tobacco I single leaf measurements [J]. *Cro PSci*, 1987(27):535-539.
- [7] VIETOR DM, CRALLE HT, MILLER FR. Partitioning of 14C - photosynthate and biomass in relation to senescence characteristics of sorghum [J]. *Cro PSci*, 1989(29):1049-1053.
- [8] MONDAL WA, CHOUDHURI MA. Comparison of phosphorus mobilization during monocarpic senescence in rice cultivars with sequential and non - sequential leaf senescence [J]. *Physiol Plant*, 1985(65):221-227.
- [9] ZACARIAS L, REID MS. Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves [J]. *Physiol Plant*, 1990(80):549-554.
- [10] AKHTAR MS, GOLDSCHMIDT EE, JOHN I, et al. Altered patterns of senescence and ripening in *gf*, a stay - green mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1999(50):1115-1122.
- [11] 何萍,金继运. 保绿型玉米的营养生理研究进展[J]. *玉米科学*, 2000,8(4):41-44.
- [12] MILLER FR, TOLER RW. Registration of RTx2858MDMV-aresistant germplasm[J]. *Cro PScience*, 1990, 30(3):764.
- [13] THOMAS H, SCHELLENBERG M, VICENTINI F, et al. Gregor mendel's green and yellow pea seeds [J]. *Bot Acta*, 1996(109):3-4.
- [14] RONNING CM, BOUWKAM PJC, SOLOMOS T. Observations on the senescence of a mutant non - yellowing genotype of *Phaseolus vulgaris* L [J]. *Jour Ex PBot*, 1991(42):235-241.
- [15] GRIERSON D, PERTON ME, KNA PPJE, et al. Tomato ripening mutants [A]. In: Thomas H, Grierson D (eds). *Developmental Mutants in Higher Plants*[C]//Cambridge: Cambridge University Press, 1987:73-94.
- [16] BEKAVAC G. Path analysis of stay - green trait in maize [J]. *Cereal Research Communications*, 1998, 26(2):161-167.
- [17] TOLLENAAR M, DAYNARD TB. Leaf senescence in short - season maize hybrids [J]. *Can J Plant Sci*, 1978(58):869-874.
- [18] THOMAS H, HOWARTH CJ. Five ways to stay green [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000(51):329-337.
- [19] CRAFTS-BRANDNER SJ, BELOW FE, WITTENBACH VA, et al. Differential senescence of maize hybrids following ear removal II selected leaf [J]. *Plant Physiol*, 1984,74(2):368-373.
- [20] AMBLER JR, MORGAN PW, JORDAN WR. Genetic regulation of senescence in a tropical grass. In: Thomson WW, et al. ed. *Plant Senescence: Its biochemistry and physiology* [C]. Rockville, MD: Amer Soc Plant Physiol, 1987:43-53.
- [21] HILDITCH P, THOMAS H, ROGERS L. Leaf senescence in a non - yellowing mutant of *festuca pratensis*: Photosynthesis and photosynthetic electron transport [J]. *Planta*, 1986(167):146-151.
- [22] 陈文峻, 蒯本科. 植物的滞绿突变 [J]. *植物生理学通讯*, 1998,35(4):321-324.
- [23] HORTENSTEINER S. Chlorophyll degradation during senescence [J]. *Annual Reviews Plant Biol*, 2006(57):55-77.
- [24] TAKAMIYA KI, TSUCHIYA T, OHTA H. Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? [J]. *Trends Plant Sci*, 2000,5(10):426-431.
- [25] THOMAS H, OUGHAM H, HORTENSTEINER S. Recent advances in the cell biology of chlorophyll catabolism [J]. *Advances in Botanical Research*, 2001(35):1-52.
- [26] MATILE P, HORTENSTEINER S, THOMAS H. Chlorophyll degradation [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999(50):67-95.
- [27] ECKHARDT U, GRIMM B, HORTENSTEINER S. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants [J]. *Plant Mol Biol*, 2004(56):1-14.
- [28] RODONI S, MUHLECKER W, ANDERL M, et al. Chlorophyll breakdown in senescent chloroplasts (cleavage of pheophorbide a in two enzymic steps) [J]. *Plant Physiol*, 1997(115):669-676.
- [29] FANG Z, BOUWKAM PJC, SOLOMOS T. Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in the non-yellowing mutant and wild-type of *Phaseolus vulgaris* L [J]. *J Ex PBot*, 1998(49):503-510.
- [30] HORTENSTEINER S, VICENTINI F, MATILE P. Chloro-

- phyll breakdown in senescent cotyledons of rape, *brassica napus* L.: Enzymatic cleavage of phaeophorbide a in vitro [J]. *New Phytologist*, 1995(129): 237-246.
- [31] VINCENTINI F, HORTENSTEINER S, SCHELLENBERG M, et al. Chlorophyll breakdown in senescent leaves; identification of biochemical lesion in a stay-green genotype of *Festuca pratensis* huds [J]. *New Phytol*, 1995(129): 247-252.
- [32] BACHMANN A, FERNANDEZ LJ, GINSBURG S, et al. Stay green genotypes of *Phaseolus vulgaris* L.: chloroplast proteins and chlorophyll catabolites during foliar senescence [J]. *New Phytol*, 1994, 126(4): 593-600.
- [33] TANAKA A, TANAKA R. Chlorophyll metabolism [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006(9): 1-8.
- [34] EFRATI A, EYAL Y, PARAN I. Molecular mapping of the chlorophyll retainer (cl) mutation in pepper (*Capsicum* spp.) and screening for candidate genes using tomato ESTs homologous to structural genes of the chlorophyll catabolism pathway [J]. *Genome*, 2005(48): 347-351.
- [35] KERR EA. Linkage relations of *gf* [J]. *Tomato Genetics Cooperative Reports*, 1957(8): 21.
- [36] THOMAS H. Introgression, tagging and expression of a leaf senescence gene in *Festulolium* [J]. *New Phytol*, 1997(137): 29-34.
- [37] GUIAMET JJ, TEERI JA, NOODEN LD. Effects of nuclear and cytoplasmic genes altering chlorophyll loss on gas exchange during monocarpic senescence in soybean [J]. *Plant Cell Physiol*, 1990(31): 1123-1130.
- [38] GUIAMET JJ, SCHWARTZ E, PICHERSKY E, et al. Characterization of cytoplasmic and nuclear mutations affecting chlorophyll and the chlorophyll-binding protein during senescence in soybean [J]. *Plant Physiol*, 1991(96): 227-231.
- [39] GUIAMET JJ, GIANNIBELLI MC. Nuclear and cytoplasmic "stay green" mutations of soybean alter the loss of leaf soluble proteins during senescence [J]. *Physiol Plant*, 1996(96): 655-661.
- [40] THOMAS H. Ultrastructure, polypeptide composition and photochemical activity of chloroplasts during foliar senescence of a non-yellowing mutant genotype of *Festuca pratensis* [J]. *Planta*, 1977(137): 53-60.
- [41] THOMAS H. Leaf senescence in a non-yellowing mutant of *Festuca pratensis*. I. Chloroplast Membrane Polypeptides [J]. *Planta*, 1982(154): 212-218.
- [42] THOMAS H, MATILE P. Photobleaching and chloroplast pigments in leaves of non-yellowing mutant genotype of *Festuca pratensis* [J]. *Phytochemistry*, 1988(27): 345-348.
- [43] CHA KW, LEE YJ, KOH HJ, et al. Isolation, characterization, and mapping of the stay green mutant in rice [J]. *Theor Appl Genet*, 2002(104): 526-532.
- [44] ARMSTEAD I, DONNISON I, AUBRY S, et al. Cross-species identification of Mendel's I locus [J]. *Science*, 2007(315): 73.
- [45] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Entrez Nucleotide database [ED/OL]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>. [2006-12-19].
- [46] ROBSON PRH, DONNISON IS, WANG K, et al. Leaf senescence is delayed in maize expressing the agrobacterium IPT gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter [J]. *Plant Biotechnol J*, 2004(2): 101-112.
- [47] GAN S, AMASINO RM. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin [J]. *Science*, 1995(270): 1986-1988.
- [48] JOHN I, DRAKE R, FARRELL A, et al. Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis [J]. *The Plant Journal*, 1995(7): 483-490.
- [49] GRBIC V, BLEECKER AB. Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 1995(8): 95-102.
- [50] GRIFFITHS CM, HOSKEN SE, OLIVER D, et al. Sequencing, expression pattern and RFLP mapping of a senescence-enhanced cDNA from *Zea mays* with high homology to oryzain x and aleurain [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997(34): 815-821.
- [51] HILDITCH P, THOMAS H, THOMAS BJ, et al. Leaf senescence in a non-yellowing mutant of *Festuca pratensis*: proteins of photosystem II [J]. *Planta*, 1989(177): 265-272.
- [52] BORRELL AK, HAMMER GL. Does maintaining green leaf area in sorghum improve yield under drought [J]. *Crop Sci*, 2000(40): 1037-1048.
- [53] BIRCH CJ, HAMMER GL, and Rickert KG. Improved methods for predicting individual leaf area and leaf senescence in maize (*Zea mays*) [J]. *Aust. J. Agric. Res*, 1998, 49(2): 249-262.
- [54] 刘开昌, 王庆成, 张海松, 等. 玉米叶片保绿性生理机理及遗传特性研究进展 [J]. *山东农业科学*, 2003(2): 48-51.
- [55] RAMPINO P, SPANO G, PATALEO S, et al. Molecular analysis of a durum wheat 'stay green' mutant; expression pattern of photosynthesis-related genes [J]. *Journal of Cereal Science*, 2006(43): 160-168.
- [56] 张正华, 李陵岚, 叶楚平, 等. 有机太阳能电池与塑料太阳能电池 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.

- [57] MA BL, DWYER LM . Nitrogen uptake and use of two contrasting maize hybrids differing in leaf senescence [J]. *Plant and Soil* ,1998(199) :283-291.
- [58] Eminent Australian sorghum breeder Bob Henzell retires [EB/OL]. <http://www.seedquest.com/News/releases/2006/july/16290.htm>. 2006-07-12/2006-11-11.
- [59] REYES-ARRIBAS T, BARRETT JE, HUBER DJ, et al. Leaf senescence in a non - yellowing cultivar of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) [J]. *Physiol Plant* , 2001,111 (4) ;540-544.

Research and Application Perspective of Stay-green Mutants

YAN Bo^a, CHEN Guo-ping^a, HU Zong-li^a, LUO Min^{a,b}, CHEN Xu-qing^a

(a. Bioengineering College; b. Journals Department, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: Stay-green mutants of all botanical species have similar phenotypic features. The senescence is delayed, and chlorophyll degradation is blocked or slowed. Nevertheless, the molecular mechanism of stay-green in these mutants is quite different owing to different genetic basis. The authors summarize the progresses in research on the physiological and biochemical behaviors (mostly concentrated on the enzyme-catalyzed metabolic pathway of chlorophyll), hereditary features and molecular biological aspects in various stay - green mutants. They also describe the importance of stay - green mutation to the research of chlorophyll metabolism, leaf senescence, photosynthesis and other physiological processes in plants, as well as the perspective of exploiting the advantages of these mutants in many aspects of agriculture. Among the many types of stay-green mutants, the most promising and significant can be the functional Type A and Type B which are distinguished for their increased yields and improved resistance against stresses. Furthermore, thorough understanding of changes in the molecular mechanism of stay-green is a potential access to consummately solving the presenility problem of crops.

Key words: stay-green mutation; non-yellowing; senescence; chlorophyll metabolism; hereditary variation; SGR

(编辑 陈移峰)

(上接第103页)

L_2 Controller Design for Nonlinear Systems with Dead-Zone Modification

CHEN Gang, SUN Yue, Su Yu-gang

(College of Automation, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: An adaptive robust L_2 design method with dead - zone modification is proposed for a class of nonlinear systems with external disturbances and uncertain parameters. With priori knowledge of the bounds of the parametric uncertainties, the smooth projection method and the dead zone modification technology are incorporated into the adaptive laws to prevent parameter drifting and reduce the computation burden. The number of parameter estimates is minimal for the adaptive system. The algorithm can guarantee the tracking errors asymptotically converge to the desired dead zone if the external disturbances are zero. The system satisfies L_2 disturbance rejection criterion when the external disturbances are considered. Simulation results demonstrate the effectiveness of the control algorithm.

Key words: nonlinear system; dead zone; adaptive control; disturbance

(编辑 吕建斌)