

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2013.02123

## 水稻叶色白化转绿及多分蘖矮秆突变体 *hfa-1* 的基因表达谱分析

郭涛\*\* 黄永相\*\* 罗文龙 黄宣 王慧 陈志强\* 刘永柱\*

华南农业大学 / 国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东广州 510642

**摘要:** *hfa-1* 的白化转绿、多分蘖矮秆表型受单隐性核基因 *hw-1(t)* 控制。该基因编码含线粒体交替氧化酶 AOX 结构的叶绿体蛋白, 通过参与叶绿体呼吸电子传递链, 对类胡萝卜素生物合成途径及其次生代谢途径进行调控。本研究对 *hfa-1* 突变体叶色白化转绿过程中的类胡萝卜素生物合成途径、与该途径有关的植物激素代谢途径的相关基因进行表达分析, 并分析了 *hfa-1* 突变体在白化、转绿 2 个时期的基因表达谱。结果表明, 类胡萝卜素、植物激素(GA、ABA 和 SL)生物合成相关基因在 *hfa-1* 突变体白化期叶片中表达量减低, 暗示 *hw-1(t)* 基因的突变抑制了苗期类胡萝卜素合成, 同时还对涉及该过程相关多个次生代谢途径产生影响。通过基因表达谱芯片和功能分类分析, 发现 *hfa-1* 叶色白化转绿过程中上调和下调表达基因涉及的生理过程主要在光合作用、应对内源刺激物和胁迫响应等方面; 其中电子传递体 Cytb6/f 复合蛋白合成相关基因上调表达明显, 推测 Cytb6/f 蛋白复合体在电子传递和质醌库还原氧化上对 *hw-1(t)* 起一定的补偿功能。

**关键词:** 水稻; 白化转绿; 突变体 *hfa-1*; 基因表达分析

## Gene Differential Expression of a Green-Revertible Albino and High-Tillering Dwarf Mutant *hfa-1* by Using Rice Microarray

GUO Tao \*\*, HUANG Yong-Xiang \*\*, LUO Wen-Long, HUANG Xuan, WANG Hui, CHEN Zhi-Qiang \*, and LIU Yong-Zhu \*

South China Agricultural University, National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** Phenotype of the *hfa-1* mutant characterized by green-revertible albino and high-tillering dwarf is controlled by a single recessive nuclear gene *hw-1(t)*, which encodes a chloroplast protein containing the mitochondrial alternative oxidase (AOX) structure and involves in the electron transport chain of chloroplast respiratory regulating biosynthesis of carotenoid and carotenoid-related secondary metabolic pathways. In this study, expression analysis of genes involved in carotenoid biosynthesis and carotenoid-related plant hormones biosynthesis and gene-expression profiling were conducted before and after the turning-green of *hfa-1* mutant. The results displayed that expression levels of genes involved in carotenoid biosynthesis and carotenoid-related plant hormones (GA, ABA, and SL) biosynthesis were decreased in the albino leaves of *hfa-1*, suggesting that mutation of *hw-1(t)* inhibits the biosynthesis of carotenoid and has an impact on carotenoid-related secondary metabolic pathways. Gene expression profiling and functional classification showed that genes related to physiological processes in response to photoynthesis, endogenous stimulus and stress were differently expressed in *hfa-1* before and after its turning-green. Expression of genes encoding proteins related to the electron transport complex Cytb6/f were up-regulated significantly, indicating that Cytb6/f would provide some compensation in electron transport and redox of plastoquinone in the *hfa-1* mutant.

**Keywords:** Rice (*Oryza sativa* L.); Green-revertible albino; *hfa-1* mutant; Gene expression analysis

叶色突变是一种常见的表型变异, 突变基因通过直接或间接影响光合色素的合成和降解, 最终影响植物的光合作用。已克隆的水稻叶色突变基因多

数与叶绿素合成、降解和叶绿体发育相关。例如 *OsYGL1* 编码的叶绿素合成酶催化叶绿素 a 的羧化反应, 该基因的突变导致突变体内四吡咯中间产物

本研究由国家自然科学基金项目(31200250), 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2012AA101201)和广东省自然科学基金项目(S2011010001892)资助。

\* 通讯作者(Corresponding authors): 刘永柱, E-mail: lively@scau.edu.cn; 陈志强, E-mail: chenlin@scau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: guo.tao@vip.163.com, Tel: 020-38604903 \*\*同等贡献(Contributed equally to this work)

Received(收稿日期): 2013-03-26; Accepted(接受日期): 2013-06-20; Published online(网络出版日期): 2013-09-29.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20130929.1536.005.html>

含量骤增、叶绿体发育迟滞<sup>[1]</sup>。此外,也有少数水稻叶色突变基因是通过影响类胡萝卜素合成而间接影响叶绿素的合成和降解的。如类胡萝卜素合成相关酶基因 *PDS*、*ZDS*、*CRTISO* 和  $\beta$ -*LCY* 突变会导致类胡萝卜素含量降低,破坏光合系统,降低叶绿素含量,导致幼苗白化<sup>[2]</sup>。

本课题组通过空间诱变获得突变体 *hfa-1*, 该突变体在三叶期之前完全白化,随后逐渐转绿,并且伴随多分蘖矮秆表型。前期研究表明<sup>[3-4]</sup>, *hfa-1* 的白化转绿、多分蘖矮秆表型受单隐性核基因 *hw-1(t)* 控制,通过图位克隆筛选出候选基因 LOC\_Os04g57320, 该基因与拟南芥叶色花斑基因 *im* 同源<sup>[5-6]</sup>。*IM* 基因编码含线粒体交替氧化酶 AOX 结构的叶绿体蛋白,通过参与叶绿体呼吸电子传递链,在类胡萝卜素生物合成途径中调控八氢番茄红素脱氢酶 PDS 活性。类胡萝卜素生物合成是类异戊二烯合成途径中的重要分支,其不同反应中间产物与众多次生代谢途径有关<sup>[7]</sup>。与 *IM* 基因不同, *hw-1(t)* 不但影响叶色,还对株高、分蘖等其他表型性状产生重要影响,暗示在单子叶植物中存在不同的调控机制。近年来越来越多证据表明多分蘖矮秆表型与新发现的植物激素独脚金内酯有关<sup>[8-9]</sup>。*hw-1(t)* 作为调控独脚金内酯合成前体类胡萝卜素的基因,或许通过直接影响类胡萝卜素含量而间接影响水稻独脚金内酯合成,从而调控植株形态构成。

本文对 *hfa-1* 突变体叶色白化转绿过程中的类胡萝卜素生物合成途径及与该途径有关的植物激素代谢途径的相关基因进行表达分析。在此基础上,通过基因芯片技术分析 *hfa-1* 突变体在白化、转绿 2 个时期的基因表达谱,从整体水平上研究其代谢机

制和差异基因的功能,为深入阐述 *hw-1(t)* 调控矮秆多蘖、白化转绿特异表型的机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 水稻材料

2003年利用返回式卫星搭载美国光身稻品种 Francis 干种子于太空飞行 18 d (卫星倾斜角度 63°, 近地距离和高地距离分别为 175 km 和 320 km, 辐射剂量为 2.656 mGy)。将空间诱变种子与对照一起萌发,移植 M<sub>1</sub> 代单株,成熟时收获单株主穗,混合主穗种子得到 M<sub>2</sub> 代种子。移植 M<sub>2</sub> 代单株,常规田间管理,在 M<sub>2</sub> 群体中发现一株白化转绿、多分蘖矮秆突变体。经过连续 4 代的自交繁殖获得稳定突变株系,命名为 *hfa-1*。Francis 为野生型 (WT, wild-type)。

将 *hfa-1* 与野生型盆栽于人工气候箱中 (光暗 12 h / 12 h、温度 25°C、湿度 80%), 分别于二叶期、四叶期取样,每品种每次混取 5 株叶片 (约 200 mg), 3 次重复。然后迅速放入液氮冷冻,置 -70°C 冰箱保存备用。

### 1.2 类胡萝卜素、植物激素生物合成相关基因的 RT-PCR 和 QRT-PCR

用半定量 RT-PCR 方法,分析已知水稻类胡萝卜素、GA、ABA 和 SL 生物合成途径部分相关基因在 *hfa-1* 和野生型之间的表达差异。各组织总 RNA 提取方法见文献 [4]。以突变体和野生型叶片的第一链 cDNA 为模板,应用引物组合进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检测 (引物信息见表 1)。PCR 程序为: 94°C 2 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 共 30 个循环; 最后 72°C 延伸 7 min, 同时设定 *actin* 为内部参照。通过调整模板浓度,使各时期材料中 *actin* 的 PCR 扩增产物量一致。

表 1 用于分析类胡萝卜素、植物激素生物合成相关基因的 RT-PCR 引物  
Table 1 RT-PCR Primers for analysis of genes related to carotenoid and hormones biosynthesis in rice

基因 Gene	正向引物序列 Forward primer (5'-3')	反向引物序列 Reverse primer (5'-3')	扩增产物大小 Amplicon size(bp)
<i>OsPSY1</i>	GGAGTATGCCAAGACCTTTTA	AACACTCATTAGCCCCACAG	367
<i>OsPSY2</i>	TCTGGGCAATCTATGTATGG	TCGCCTACGTCTCTGAGAAT	419
<i>OsPDS</i>	CAGGTTGTTGCCAGGACTT	GTTCTGTATGTTGGGATAAGC	308
<i>OsZDS</i>	TCGGGTGTTACAGCAATCTTT	CCAATCGCTGAAACTTACATC	310
<i>OsLCY</i>	AGGGAGTTCCTCTGCTTCGG	CTTGCTGCTGCTAATGGTGT	395
<i>OsCRTISO</i>	TGCTGAGTGCTTTATTGTGAG	CAGGCAAACTGAGGCTTTG/	412
<i>OsCPS1</i>	CTTGTTCTCCCCTTCAGCTA	CTTGAACACACTTGGTGATAC	335
<i>OsKSI</i>	CGACTCTGTATTTCTGTAGGAC	TCAGTCCGAGAGTAGAACATC	348
<i>OsZEP</i>	GTTGGTGATGATGCTATACTG	AGATCAACGACGTTATCGCA	412
<i>OsNCED1</i>	ATAGTAGTTAGCCTCGGTCTT	GAGCAAGAATCCCAAACCTCTC	320
<i>OsCCD7</i>	GATGGTGGCTATGTTCTTCT	GTAGTTATTTGGTTCCTTGA	316
<i>OsD3</i>	AGGATAAGTGGGTTTCAGAC	CGGGCTCCATTTGCTTACTT	373
<i>Actin</i>	TCCTCTCTGTATGCCAGT	CGGAAACGCTCAGCACCAAT	351

同时用定量 QRT-PCR 分析上述基因在 *hfa-1* 突变体和野生型之间的表达差异。采用 2×SYBRGreen master mix 荧光染料, 25 μL PCR 体系, 设 3 次重复, 荧光 PCR 反应在 CORBETT6200 定量 PCR 仪上进

行。程序为 95°C 30 s 预变性, 之后 95°C 5 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 共 40 个循环, *actin* 为内参, 应用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [10] 的方法计算基因表达量的相对变化(引物信息见表 2)。

表 2 用于分析类胡萝卜素、植物激素生物合成相关基因的 QRT-PCR 引物  
Table 2 QRT-PCR Primers for analysis of genes related to carotenoid and hormones biosynthesis in rice

基因 Gene	正向引物序列 Forward primer (5'-3')	反向引物序列 Reverse primer (5'-3')	扩增产物大小 Amplicon size(bp)
<i>OsPSY1</i>	GATACCATCTCCAAGTTTCC	AACACTCATTAGCCCCACAG	152
<i>OsPSY2</i>	TCTGGGCAATCTATGTATGG	CTACTGGAAACTTTGACTACTG	179
<i>OsPDS</i>	CAGGTTGTTTGCCAGGACTT	TGCCAGATATTTTGCCGTTGA	170
<i>OsZDS</i>	TCGGGTGTTACAGCAATCTTT	GTTGGTTAGTTCGTAGGAATG	179
<i>OsLCY</i>	CAGAGATAGGTGAGGTGAGG	CTTGCTGCTGCTAATGGTGT	145
<i>OsCRTISO</i>	TGCTGAGTGCTTATTGTGAG	CCCATCTGCCAAGGACATAG	144
<i>OsCPS</i>	ACGAGAGATTGAACAGAACA1	CTTGAACACACTTGGTGATAC	159
<i>OsKSI</i>	CGACTCTGTATTTCGTAGGAC	GAACCACCACTGTGATGAACA	181
<i>OsZEP</i>	GTTGGTGATGATGCTATACTG	AGTTGCTTCTGATTGCCCGA	171
<i>OsNCED1</i>	ATAGTAGTTAGCCTCGGTCTT	CCTCTTGGTTGCTCACTGGA	164
<i>OsCCD7</i>	GATGGTGGCTATGTTCTTCT	GATGCTTGCTCTATGCTCATT	187
<i>OsD3</i>	GCTTTGTCTCCAGGTGTAT	CGGGCTCCATTTGCTTACTT	182
<i>Actin</i>	TCCTCTCTGTATGCCAGT	TGAATGAGTAACCACGCTCC	185

### 1.3 基因芯片杂交

使用 Affymetrix 公司水稻基因组芯片 (GeneChip Rice Genome Array), 覆盖约 51 279 个转录本, 代表 2 种水稻品系, 其中大约 48 564 个粳稻转录本和 1260 个籼稻转录本, 芯片内 2 次重复。序列信息来源于 NCBI UniGene Build #52 (May 7, 2004)、GenBank 和 TIGROs1 v2 data set (ftp.tigr.org, FASTA, 89.3 MB)。芯片杂交工作由博奥生物芯片有限公司——生物芯片北京国家工程研究中心完成。杂交工作基本流程详见 GeneChip Expression Analysis Technical Manual。使用 Affymetrix GeneChip Scanner 3000 扫描芯片, 及 Affymetrix GeneChip Operating Software Version 1.4 (GCOS 1.4) 分析软件分析芯片图像, 把图像信号转化为数字信号, 并用 dChip 软件做校正和归一化处理。

### 1.4 基因芯片数据分析

选取 2 次重复表达差异两倍基因 (即  $\log_2$  Ratio 1 或  $\log_2$  Ratio -1) 为显著差异的探针。通过 Cluster 3.0 对 *hfa-1* 与野生型在 2 个时期的差异表达探针及各样品中有效的检测信号值进行聚类分析, 采用 Hierarchical、Average linkage、K-means 算法进行聚类, 分析芯片的重复性, 并在整体上分析全部基因的表达模式。对于筛选出的基因, 利用分子功能注

释系统 MAS3.0 的基因组数据库 (<http://www.capitalbio.com/zh-hans/support/MAS>), 根据每个基因的 TIGR 登录号寻找对应的功能注释。对于未知功能或未被注释为基因的序列, 使用 TIGR Plant Transcript Assemblies 工具 (<http://plantta.tigr.org/>) 查找最长序列, 然后用 NCBI blastX 工具进行序列比对, 找出同源性最高的大麦、水稻、玉米以及拟南芥基因, 从而推测其功能, 并依此分类。

## 2 结果与分析

### 2.1 类胡萝卜素生物合成相关基因的表达分析

由于 *hw-1(t)* 同源基因 (拟南芥 *IM* 和番茄 *PTOX*) 的分子功能都涉及到类胡萝卜素生物合成途径, 利用 RT-PCR 和 QRT-PCR 检测了 *hfa-1* 6 个类胡萝卜素生物合成基因在不同时期 (二叶期和四叶期) 的表达差异 (WT 为对照)。6 个基因分别是八氢番茄红素脱氢酶基因 *OsPDS*、 $\zeta$ -胡萝卜素脱氢酶基因 *OsZDS*、类胡萝卜素异构酶基因 *OsCRTISO*、番茄红素环化酶基因 *OsLCY*、八氢番茄红素合成酶基因 *OsPSY1* 和 *OsPSY2*。

RT-PCR 分析结果 (图 1-A) 表明, *hfa-1* 在二叶期 (白苗期) 和四叶期 (转绿后) 的基因表达具有较大差异, 二叶期 *OsPSY1* 和 *OsLCY* 的表达水平低于野生

型; 转绿后 6 个基因的表达和野生型无明显差异。QRT-RCR 表明, *hfa-1* 二叶期类胡萝卜素合成相关基因的 mRNA 转录水平仅为野生型的一半左右(图 1-B); 植株转绿后, *hfa-1* 各相关基因的表达量上调

并基本恢复至野生型水平, 其中 *OsPSY2*、*OsPDS*、*OsZDS* 和 *OsCRTISO* 的 mRNA 转录水平甚至高于 WT (图 1-C)。上述结果表明 *hw-1(t)* 基因抑制了二叶期 *hfa-1* 类胡萝卜素的生物合成。

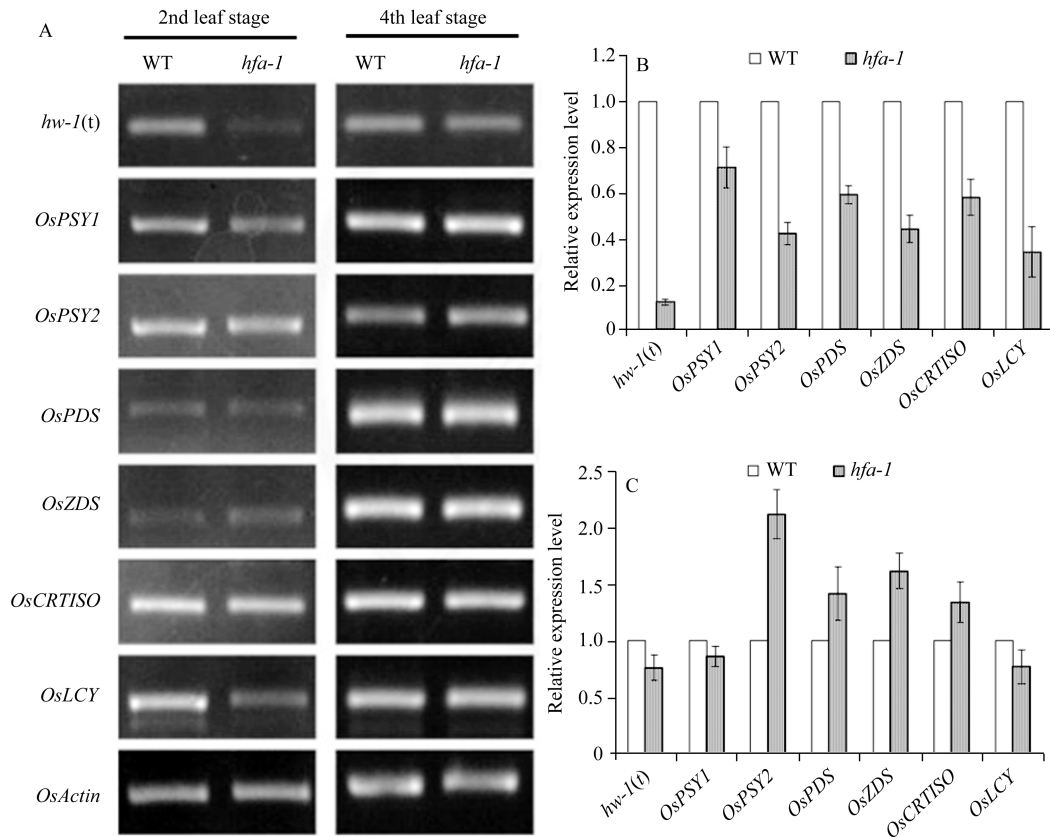


图 1 类胡萝卜素生物合成相关基因在 *hfa-1* 和野生型内的表达分析

Fig. 1 Expression analysis of genes related to carotenoid biosynthesis in the *hfa-1* and WT

A: 半定量 RT-PCR 表达分析结果; B, C: 白化和转绿后的定量 RT-PCR 表达分析结果, 3 次重复; *actin* 为内参基因。

A: semi-quantitative expression analysis of *hw-1(t)* and genes involving in carotene biosynthesis; B and C: quantitative RT-PCR analysis of *hw-1(t)* and genes involving in carotene biosynthesis, and PCR was repeated three times. *OsActin* was used for normalization as a control.

## 2.2 植物激素代谢途径相关基因的表达分析

类胡萝卜素的生物合成涉及多种植物生长发育激素, 如赤霉素(GA)、脱落酸(ABA)和独脚金内酯(SL)等。在二叶期(白化)和四叶期(转绿) 2 个时期, 对参与 GA 生物合成基因 *OsCPSI*(柯巴焦磷酸合成酶)和 *OsKSI*(内根-贝壳杉烯合成酶)、ABA 生物合成基因 *OsZEP1*(玉米黄质环氧化酶)和 *OsNCED1*(9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶)、SL 生物合成基因 *OsCCD7*(胡萝卜素裂解双加氧酶)和 SL 信号传导基因 *OsD3*(含 LRR 与 F-box 结构域蛋白酶)进行表达分析(图 2)。RT-PCR 结果表明, 与 WT 相比, *hfa-1* 中参与 GA 代谢途径基因 *OsKSI*, ABA 代谢途径基因 *OsZEP1*、*OsNCED1* 和 SL 代谢途径基因 *OsCCD7*、*OsD3* 在白化时期的表达均明显下调。转绿后, *hfa-1*

多个基因表达上调, 除 *OsNCED1* 和 *OsD3* 外, 其余基因的表达量与野生型接近。QRT-PCR 结果也表现了同样趋势, *hfa-1* 各基因的表达水平在白化时期仅为野生型的 5%~88%, 其中 *OsZEP*、*OsCCD7* 和 *OsD3* 的表达量分别比野生型下降 40%、95%和 40%; 转绿后, 除 *OsD3* 基因表达量仍为 WT 的 40%, 其余基因的表达量均接近野生型。上述结果说明 *hw-1(t)* 基因对 GA、ABA 和 SL 代谢途径产生影响, 特别是对 *OsD3* 基因表达具有长期的抑制作用。

## 2.3 基因芯片质量检测及基因表达比较

在二叶期(白化)、四叶期(转绿后)分别提取 *hfa-1* 和野生型 RNA 进行水稻叶片组织的基因表达谱变化分析, 样品的 RNA 和芯片质量检测结果见表 3。提取的总 RNA 完好, 28S : 18S rRNA 条带亮度大



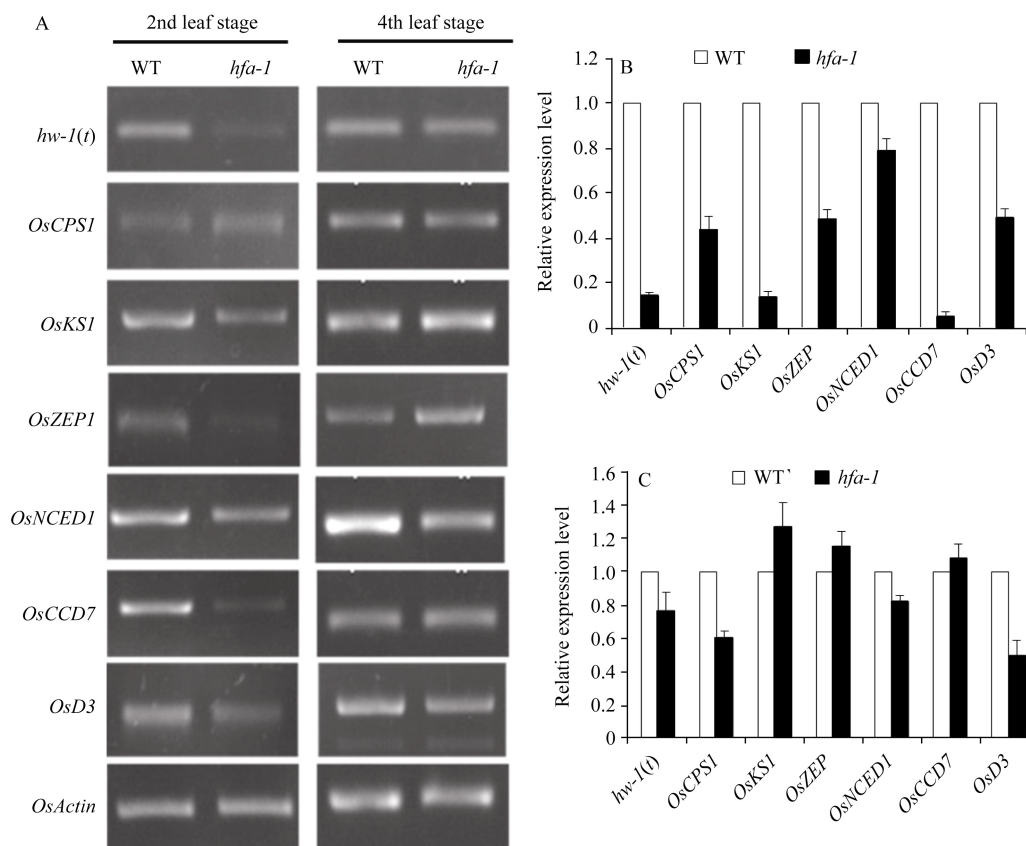


图 2 GA、ABA 和 SL 代谢途径相关基因在 *hfa-1* 突变体和野生型的表达分析

Fig. 2 Expression analysis of genes in plant hormone metabolic pathway and *hw-1(t)* of the *hfa-1* mutant and the wild-type at the 2nd-leaf stage (albino) and the 4th-leaf stage (green)

A: 半定量 RT-PCR 表达分析结果; B, C: 白化和转绿后的定量 RT-PCR 表达分析结果。

A: semi-quantitative expression of *hw-1(t)* and genes involving in plant hormone biosynthesis; B and C: quantitative RT-PCR analysis of *hw-1(t)* and genes involving in plant hormone biosynthesis.

表 3 样品的 RNA 和芯片质量检测结果

Table 3 Quality test of total RNA and chip signal

芯片序号 No. of chips	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	浓度 Content ( $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ )	总量 Total amount ( $\mu\text{g}$ )	检出率 Percent present (%)	效率得分 Scale factors
F1	2.05	1.30	1.44	280.6	44.92	2.85
F2	1.99	1.54	1.08	156.1	41.19	3.69
H1	2.06	1.49	1.37	265.7	45.67	3.02
H2	1.99	1.55	0.96	186.5	45.50	3.15

于或接近 2 : 1,  $A_{260}/A_{280}$  比值和 RNA 总量均分别大于 1.8  $\mu\text{g}$  和 15.0  $\mu\text{g}$ 。芯片杂交的 Oligo B2、Poly-A 等阳性对照信号及 3'/5' 比值正常, 基因检出率处正常范围, 这些检测结果显示芯片结果可用于后续分析。F1、F2 代表野生型二叶期和四叶期; H1、H2 代表 *hfa-1* 二叶期(白化)和四叶期(转绿后)。

图 3 显示了 57195 个表达探针的芯片信号强度在 *hfa-1* 突变体和野生型不同时期(二叶期、四叶期)的差异变化。可见, 在野生型(F2/F1)或突变体(H2/H1)中, 绝大部分基因表达水平差异均不明显(黑色部分)。以二叶期(白化)为参比, *hfa-1* 突变体转

绿后上调表达的探针数目较多(红色区域较大), 而下调表达的探针数目较少(绿色区域较小), 这与野生型情况恰好相反。

### 2.4 差异表达基因的筛选

根据荧光强度比值, 分别筛选同一品种在不同时期期间的差异基因。选择表达差异两倍基因(即  $\log_2$  Ratio 1 或  $\log_2$  Ratio -1)为显著差异的探针, 共涉及 4 361 个探针。通过 Cluster 3.0 对 *hfa-1* 与野生型在 2 个时期的差异表达探针进行聚类分析, 结果见图 4-A。由于 *hfa-1* 在白化与转绿 2 个时期期间差异表达的基因源于两方面, 即由 *hw-1(t)* 突变引起的在 2

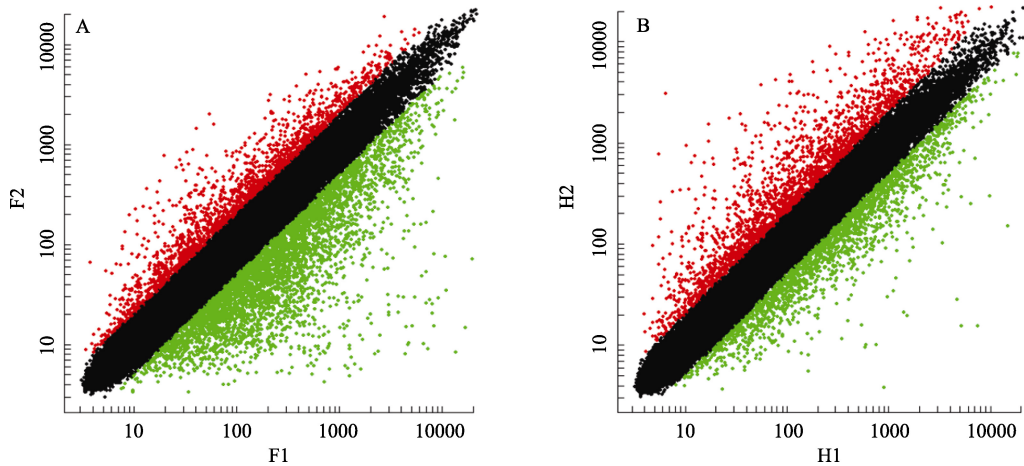


图 3 *hfa-1* 突变体和野生型在不同时期的探针信号差异变化

Fig. 3 Scatter plots of signal intensities for all expressed probes on the Affymetrix microarray

F1、H1: 分别代表野生型和 *hfa-1* 突变体在二叶期(白化); F2、H2: 分别代表野生型和 *hfa-1* 突变体在四叶期(转绿后); 绿点代表基因表达下调, 红点代表基因表达上调。

F1 and H1 indicate the wild-type and the *hfa-1* mutant at 2nd-leaf stage (albino), respectively; F2 and H2 indicate the wild-type and the *hfa-1* mutant at 4th-leaf stage (green), respectively. Green or red dots indicate the down or up regulation of gene expression, respectively.

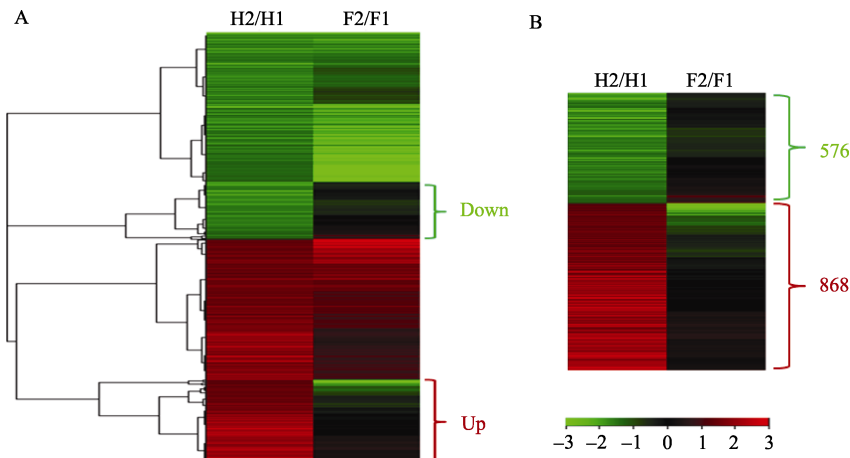


图 4 差异探针的 Cluster 聚类分析结果

Fig. 4 Clustering analysis of significant probes

绿色代表基因表达下调, 红色代表基因表达上调。

Green and red indicate the down-and up-regulation of gene expression, respectively.

个时期表达量不同的基因, 和水稻品种自身发育而差异表达的基因。因此, 需要从 *hfa-1* 和野生型两组所有差异表达探针中, 筛选出变化趋势相异的探针, 即图中 Down 和 Up 所示部分(图 4-A)。与白化时期相比, *hfa-1* 在叶色白化转绿过程中表达上调的探针数为 868 组, 下调探针数为 576 组, 共 1444 组(图 4-B)。

### 2.5 差异表达基因的功能分类

对筛选的差异表达基因进行功能注释和分类。利用分子功能注释系统 MAS3.0 的基因组数据库 (<http://www.capitalbio.com/zh-hans/support/MAS>), 根据每个基因的 TIGR 登录号寻找对应的功能注释。功能注释结果显示, 大约 60%的基因可通过系统进

行功能分类。这些差异表达基因广泛参与了水稻生理、发育、细胞、代谢、催化、蛋白结合以及外源应激等生理生化过程。进一步分析可知, 在 *hfa-1* 叶色白化转绿过程中, 差异表达上调基因与下调基因在功能模式上差异较大(图 5)。其中, 表达下调基因主要与转录因子、谷胱甘肽转移酶(抗氧化)和核苷酸活性等分子功能有关, 涉及生理过程主要有内源刺激物和抗逆胁迫响应等方面。

### 2.6 光合作用差异表达基因的 Pathway 构建

通过 KEGG 数据库对 *hfa-1* 叶色白化转绿过程中差异表达基因进行 Pathways 分析(表 4), 结果显示 *hfa-1* 在 2 个时期差异表达基因涉及光合作用、碳固

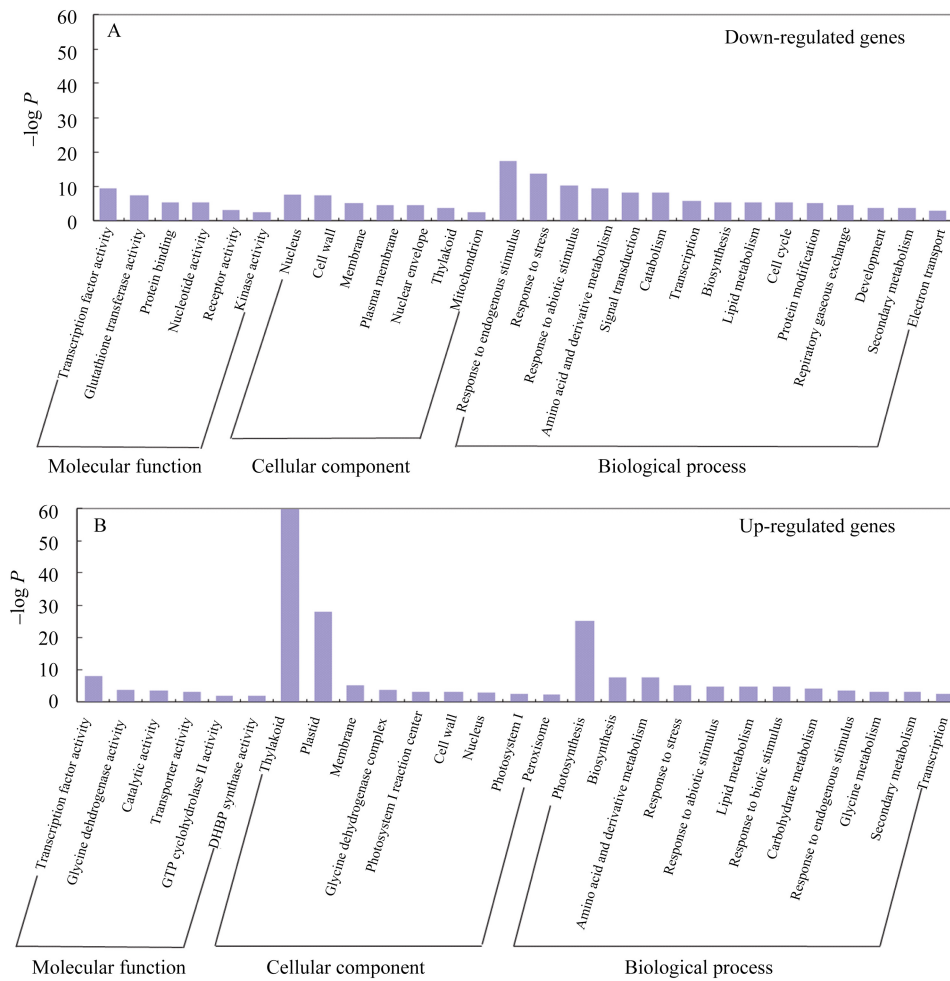


图 5 转绿过程中 *hfa-1* 突变体差异表达基因的功能分类 ( $P < 0.01$ )

Fig. 5 Functional classification of differentially expressed genes during the revertible green of the *hfa-1* mutant ( $P < 0.01$ )

表 4 KEGG 代谢 Pathways 分析 ( $P < 0.01$ )

Table 4 Metabolic Pathways identified by KEGG ( $P < 0.01$ )

通路 Pathway	基因数 Count	P 值 P-value	通路 Pathway	基因数 Count	P 值 P-value
Photosynthesis	17	3.13E-29	Porphyrin and chlorophyll metabolism	3	5.73E-05
Carbon fixation	13	1.67E-22	Gamma-hexachlorocyclohexane degradation	3	1.51E-04
Nitrogen metabolism	6	4.71E-11	Glutamate metabolism	3	1.84E-04
Pentose phosphate pathway	5	2.43E-08	Ascorbate and aldarate metabolism	3	2.42E-04
Glycine, serine and threonine metabolism	5	2.43E-08	Proteasome	3	2.63E-04
Glycolysis; Gluconeogenesis	6	3.33E-08	Lysine biosynthesis	2	4.58E-04
Oxidative phosphorylation	6	2.41E-07	One carbon pool by folate	2	6.88E-04
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	4	3.09E-07	Protein export	2	2.75E-03
Fructose and mannose metabolism	4	1.38E-06	Fluorene degradation	2	3.00E-03
Biosynthesis of steroids	4	2.27E-06	Alanine and aspartate metabolism	2	3.26E-03
Flavonoid biosynthesis	3	6.81E-06	Limonene and pinene degradation	2	5.05E-03
Starch and sucrose metabolism	4	2.96E-05			

定和氮代谢等多个反应通路, 所涉及基因数为 2~17 个。在各反应途径中, 以光合作用通路最为显著, 有多个基因的表达发生很大变化, 这些基因与该通路

中的光反应中心、聚光色素复合体、细胞色素和辅助因子等蛋白复合体组分合成代谢有关(表 5)。此外, 在该通路中除 V-ATPase 基因外, 其余基因表达均上

调。V-ATPase 是液泡化型  $H^+$ -ATP 合成酶, 其主要作用是利用 ATP 水解产生的能量, 将质子从真核细胞类囊体内跨膜转移到体外, 形成膜间质子梯度<sup>[11]</sup>。

V-ATPase 基因表达下调, 可使  $H^+$ 转运到细胞质的数量减少, 降低 ATP 能量消耗, 从而尽量满足类囊体内光合作用增强所需。

表 5 在芯片中表达差异显著的光合作用相关基因  
Table 5 Differentially expressed genes associated with photosynthesis

基因名称 Gene name	功能描述 Description of function	基因名称 Gene name	功能描述 Description of function
<b>Up-regulated genes</b>		<b>Down-regulated genes</b>	
Os04g0235600	ATP synthase b chain	Os08g0560900	Photosystem I reaction center subunit II (PsaD)
Os12g0207500	ATP synthase beta chain	Os07g0435300	Photosystem I reaction center subunit IV (PsaE)
Os10g0355800	ATP synthase beta chain	Os09g0481200	Photosystem I reaction center subunit V (PsaV)
Os07g0513000	ATP synthase gamma chain, chloroplast	Os07g0148900	Photosystem I reaction center subunit psaK (PsaK)
Os10g0527100	Chloroplast ATP synthase a chain precursor.	Os05g0560000	Photosystem I reaction center subunit VI (PsaH)
Os02g0750200	Similar to chloroplast ATP synthase delta chain precursor	Os12g0189400	Photosystem I reaction centre subunit N (PsaN)
Os03g0278900	F-type $H^+$ -transporting ATPase subunit b	Os03g0333400	Photosystem II Psb27 protein (A)
Os02g0750100	F-type $H^+$ -transporting ATPase subunit delta	Os01g0881600	Photosystem II reaction center J protein (PsbJ)
Os08g0104600	Ferredoxin I, chloroplast precursor (PetF)	Os01g0773700	Photosystem II reaction center W protein (PsbW)
Os06g0107700	Ferredoxin--NADP reductase2, leaf isozyme (FNR2)(PetH)	Os02g0578400	Photosystem II oxygen evolving complex protein PsbQ family
Os02g0103800	Ferredoxin--NADP reductase1, leaf isozyme (FNR1)(PetH)	Os01g0869800	Photosystem II subunit PsbS
LOC_Os10g21290	Apocytochrome f precursor (PetA)	Os08g0119800	Photosystem II core complex proteins psbY (psbY-A1)
LOC_Os03g55720	Cytochrome b6f complex subunit (PetB)	Os01g0938100	Photosystem II protein PsbW, class I family protein
LOC_Os07g37030	Cytochrome b6 f complex iron sulfur subunit (PetC)	Os04g0690800	22 kD protein of photosystem II (OsPsbS2)
LOC_Os01g57945	Cytochrome b6-f complex subunit 4 (PetD)	Os07g0141400	23 kD polypeptide of photosystem II (PsbP1)
Os01g0501800	Oxygen-evolving enhancer protein 1(OEE1) (PSbO)		
Os01g0792400	Photosystem I assembly protein ycf4		

对差异表达基因进一步进行光合作用 Pathway 构建, 由图 6 可知, 该通路中的两个光反应中心 PSI 和 PSII、细胞色素 Cytb6/f、ATP 合成酶以及辅助因子等蛋白复合体组分合成基因多为上调表达。Cytb6/f 复合体是一种存在于类囊体膜间的蛋白质, 主要催化  $PQH_2$  氧化和 PC 还原, 并把质子从类囊体膜间质中跨膜运输到膜内腔中。通过查询水稻基因芯片探针数据库 (<http://www.ricechip.org/>), 获得与 Cytb6/f 复合体组分有关的水稻基因芯片探针 7 个, 其功能注释仅涉及 PetA、PetB、PetC 和 PetD。进一步对这些探针在 *hfa-1* 与野生型中的表达进行分析(表6), 与野生型相比, *hfa-1* 在白化转绿过程中参与 Cytb6/f 复合体组分合成的相关基因表达均明显上调, 其差异表达倍数比野生型高出 0.29~4.90 倍。此结果暗示, 在 *hfa-1* 叶色白化转绿过程中, 很有

可能存在通过提高 Cytb6/f 蛋白复合体活性替代 *hw-1(t)* 基因功能以调节电子传递和质醌库还原氧化的机制。

## 2.7 芯片结果与定量 RT-PCR 结果相关性分析

为了验证基因芯片的结果, 以定量 RT-PCR 分析 *hfa-1* 和野生型在二叶期(白化)、四叶期(转绿后)的类胡萝卜素及植物激素生物合成相关基因, 与基因芯片结果进行相关性分析(图 7)。结果显示, 定量 RT-PCR 结果与基因芯片两样本间相关系数为 0.409, 达显著水平, 表明两者趋势基本一致。在进行定量 RT-PCR 的 26 个基因差异表达结果中有 20 个结果与芯片实验结果相近, 仅其余 6 个结果差异较大, 这可能是因为 RT-PCR 方法为定量, 而基因芯片方法是定性, 两者在信号强度和基因转录丰度上线性关系拟合度不高。

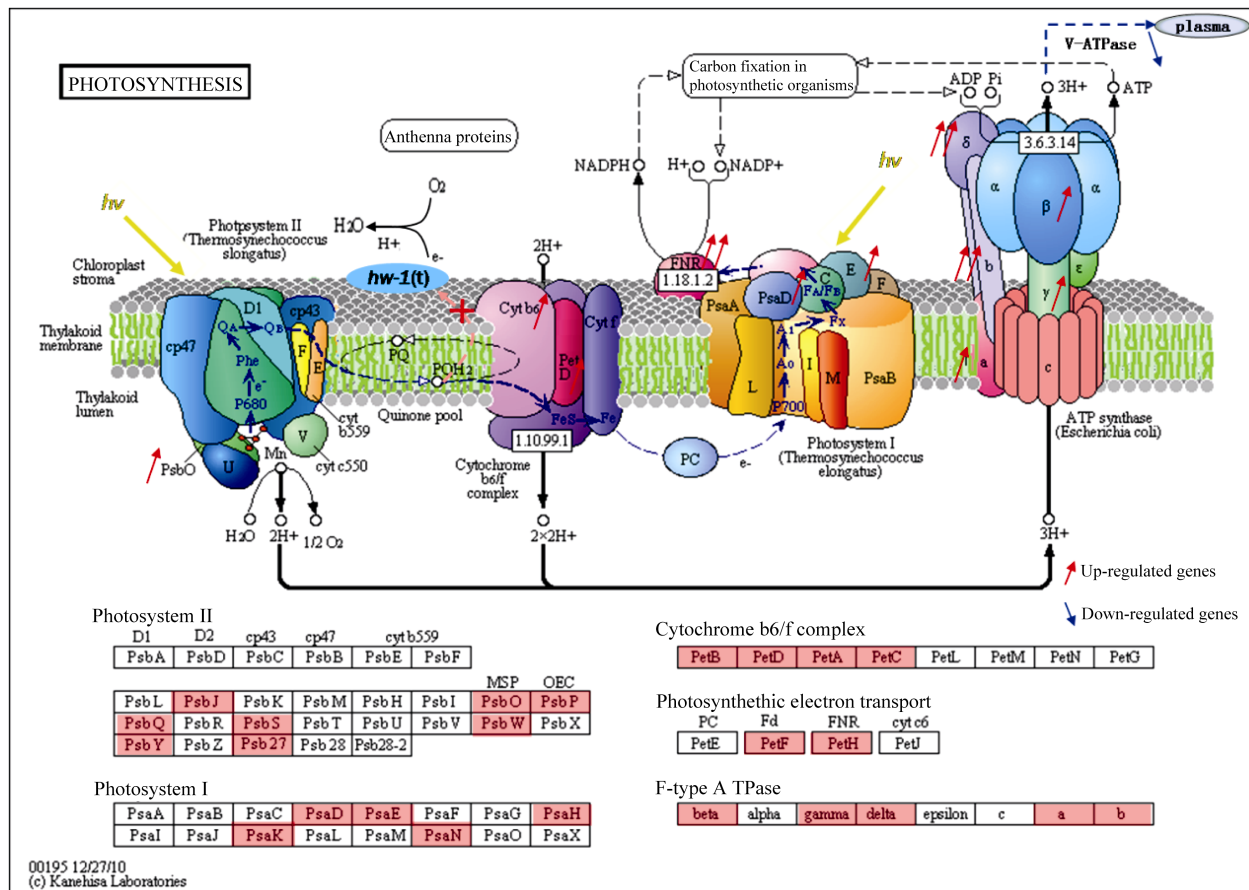


图 6 光合作用差异表达基因的 Pathway 图

Fig. 6 Differentially expressed genes related to photosynthesis Pathways

表 6 转绿过程中 *hfa-1* 突变体与 WT 的 Cytb6/f 复合体组分合成基因的差异表达分析

Table 6 Analysis of differentially expressed genes of cytochrome b6/f complex during the revertible green of the *hfa-1* mutant

探针号 Probe set ID	代表基因功能注释 Annotation	差异表达倍数 Fold		倍数差值 Fold change
		F2/F1	H2/H1	
Os.29056.1.S1_s_at	Apocytochrome f precursor, PETA	1.01	5.91	4.90
OsAffx.32260.1.A1_at	Apocytochrome f precursor, PETA	0.91	1.35	0.44
OsAffx.32260.1.S1_at	Apocytochrome f precursor, PETA	0.94	2.72	1.78
Os.12837.1.S1_at	Cytochrome b6/f complex subunit, PETB	1.19	3.21	2.02
Os.2248.1.S1_at	Cytochrome b6/f complex iron sulfur subunit, PETC	1.60	3.18	1.58
OsAffx.32330.1.A1_at	Cytochrome b6/f complex subunit 4, PETD	1.13	1.42	0.29
OsAffx.32330.1.S1_x_at	Cytochrome b6/f complex subunit 4, PETD	1.68	2.06	0.38

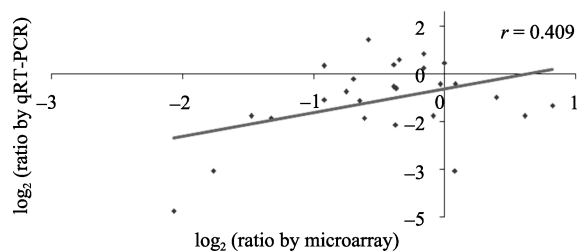


图 7 类胡萝卜素与植物激素生物合成相关基因的基因芯片与定量 RT-PCR 结果的相关分析 ( $r_{0.05, 24} = 0.388$ ;  $r_{0.01, 24} = 0.496$ )

Fig. 7 Correlation analysis of expression ratios measured by quantitative RT-PCR and microarray in the selected 13 genes associated with biological synthesis of carotenoids, GA, ABA, and SL

### 3 讨论

前期研究表明 *hw-1(t)* 与拟南芥叶色花斑基因 *im* 同源。拟南芥 *IMMUTANS(IM)* 基因突变引起的叶片花斑是目前研究最为深入的一类植物叶色突变, 早在孟德尔遗传学时期就发现此类突变<sup>[12]</sup>。拟南芥 *im* 突变体于 1963 年首次被分离鉴定, 研究结果显示 *im* 突变体属隐性核遗传突变体, 具有白绿相间的嵌合叶色表型<sup>[13-15]</sup>。通过图位克隆和转座子标签法, 拟南芥 *IM* 基因被成功克隆<sup>[16-18]</sup>。在番茄中, *IM* 的同源



基因 *PTOX* 突变导致部分叶片白化, 并造成果实缺乏类胡萝卜素<sup>[19-20]</sup>。与拟南芥及番茄相比, *hw-1(t)* 由于碱基突变导致蛋白质翻译提前终止, 形成不具备功能的残缺多肽。推测 *hw-1(t)* 可能对类胡萝卜素及其次生代谢途径造成显著影响。

高等植物类胡萝卜素生物合成的前体是含有 CS 的异戊二烯焦磷酸(IPP)<sup>[21]</sup>。IPP 在 IPP 异构酶(IPPI)、牻牛儿基焦磷酸合成酶(GGPS)、八氢番茄红素合成酶(phytoenesynthase, PSY)的催化下形成八氢番茄红素(Phytoene)<sup>[22]</sup>。八氢番茄红素在八氢番茄红素脱氢酶(PDS)、 $\xi$ -胡萝卜素脱氢酶(ZDS)和类胡萝卜素异构酶(CRTISO)催化下形成番茄红素(Lycopene)<sup>[23]</sup>。番茄红素由番茄红素  $\beta$ -环化酶( $\beta$ -LCY)和番茄红素  $\epsilon$ -环化酶( $\epsilon$ -LCY)共同催化生成  $\alpha$ -胡萝卜素<sup>[24]</sup>, 进一步由酶催化形成含氧类胡萝卜素。类胡萝卜素在类胡萝卜素裂解双氧合酶(Carotenoid cleavage dioxygenase, CCD)作用下生成多种生物活性物质, 如 ABA、SL、植物生长调节因子等<sup>[25]</sup>。八氢番茄红素去饱和环化反应是类胡萝卜素生物合成的关键环节, *hw-1(t)* 基因的突变有可能导致二叶期八氢番茄红素去饱和途径电子传递受阻, 造成类胡萝卜素合成减少, 缺少类胡萝卜素保护的叶绿体被单线态氧破坏, 产生叶片白化表型。本研究中式胡萝卜素相关基因的表达结果证实了上述推测, *hfa-1* 二叶期类胡萝卜素合成相关基因的 mRNA 转录水平仅为野生型的一半左右, 而四叶期各相关基因的表达量上调并基本恢复至野生型水平, 这与 *hfa-1* 二叶期白化、四叶期复绿的表型是相符的。

由于类胡萝卜素是多种激素合成的前体, 推测 *hw-1(t)* 基因可能对赤霉素、脱落酸和独角金内酯代谢途径产生影响。本研究中, *hfa-1* 中参与 GA 代谢途径基因 *OsKSI*, ABA 代谢途径基因 *OsZEP1*、*OsNCED1* 和 SL 代谢途径基因 *OsCCD7*、*OsD3* 在白化时期的表达均明显下调, 此结果与前人对拟南芥 *pds* 突变体的研究报道相似<sup>[26]</sup>。拟南芥 T-DNA 突变体 *pds* 编码八氢番茄红素合成酶的 *PDS* 基因发生变化, 其植株叶片出现白化, 叶绿体发育受阻, 同时植株矮化。对 *pds* 突变体类胡萝卜素及其相关代谢途径分析发现, 涉及类胡萝卜素、叶绿素和赤霉素生物合成基因的表达均受抑制<sup>[27]</sup>。通过两结果比较, 可推测 *hw-1(t)* 基因的作用机制与 *PDS* 基因相类似, 即通过反馈机制对不同次生代谢途径的基因表达产生影响。但 *hw-1(t)* 突变对其他表型的影响与拟

南芥和番茄不尽相同, 最明显的区别在于拟南芥和番茄没有出现多分枝现象。造成这种差异的原因可能是单子叶植物与双子叶植物进化差异; 此外, *hfa-1* 四叶期(转绿后)多个基因表达量与野生型接近, 但 *OsD3* 表达量仍然较低, 这暗示 *hw-1(t)* 基因对 SL 的信号传导具有长期的抑制作用, 而 SL 传导受阻将减少对分蘖芽的抑制, 从而产生多分蘖的表型。综上所述, 除类胡萝卜素生物合成外, *hw-1(t)* 及其同源基因在水稻的发育中具有更广泛的作用。

对 *hfa-1* 叶色白化转绿过程的调控基因进行筛选, 发现大多数在白化时期相对表达量较高的基因均与蛋白翻译、细胞分裂以及抗逆胁迫相关。*hfa-1* 在二叶期由于叶片白化、光合色素含量低而不能进行有效的光合作用, 导致植株体内的代谢物质和能量缺乏, 而这些与蛋白翻译、细胞分裂以及抗逆胁迫有关基因的表达上调, 有利于协调胁迫应激的解除和幼苗快速生长。其中, 参与 Cytb6/f 复合体组分合成的相关基因表达均明显上调, 其差异表达倍数比野生型高出 0.29~4.90 倍。Cytb6/f 复合体作为连接光系统 PSII 和 PSI 的中间电子载体, 能均衡两个光系统间的电子传递。当一个光系统受损时, 能使另一光系统的电子传递仍然进行, 并使多个 PSII 复合体与质醌库联系, 使类囊体膜上的电子传递成网络式<sup>[28-31]</sup>。在 *hfa-1* 叶色白化转绿过程中, 很可能存在通过提高 Cytb6/f 蛋白复合体活性替代 *hw-1(t)* 基因功能以调节电子传递和质醌库还原氧化的机制。

此外, Miura 等<sup>[31]</sup>对拟南芥 *im* 突变体绿白嵌合叶片的绿斑部分与野生型绿色叶片进行基因表达谱比较, 发现 *im* 突变体叶片绿斑部分的光合基因表达并未发生明显的变化, 而与细胞壁合成相关基因却显著下调, 认为这可能与向白斑部分转运更多的蔗糖或己糖, 以维持白斑部分生长有关。但本研究的差异表达基因 Pathways 分析结果显示, *hfa-1* 叶色白化转绿过程中差异表达基因主要涉及光合作用、碳固定和氮代谢。从能量供应的角度看, 这 3 种代谢途径是能够相互转化和调节的。在 *hfa-1* 叶色白化转绿过程中涉及 3 种代谢途径的大多数基因表达上调, 可促进突变体植株体内对营养物质的摄取和能量的储存。然而, 要探讨这些代谢途径相关基因的表达是否与 *hfa-1* 突变体特异表型相关, 还需进一步的实验验证。

#### 4 结论

类胡萝卜素、植物激素(GA、ABA 和 SL)生物

合成相关基因在 *hfa-1* 突变体白化期叶片中表达量减低, 表明 *hw-1(t)* 基因的突变抑制了苗期类胡萝卜素合成, 同时还对涉及该过程相关多个次生代谢途径产生影响。*hfa-1* 叶色白化转绿过程中上调和下调表达基因涉及的生理过程主要是光合作用、内源刺激物及抗逆胁迫的响应等。差异表达基因显著涉及光合作用通路, 且电子传递体 Cytb6/f 复合蛋白合成相关基因在 *hfa-1* 叶色白化转绿过程中上调表达明显, 推测 Cytb6/f 蛋白复合体在电子传递和质醌库还原氧化上对 *hw-1(t)* 起补偿功能。

## References

- [1] Wu Z, Zhang X, He B, 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. *Plant Physiol*, 2007, 145: 29–40
- [2] Fang J, Chai C, Qian Q, Li C, Tang J, Sun L, Huang Z, Guo X, Sun C, Liu M, Zhang Y, Lu Q, Wang Y, Lu C, Han B, Chen F, Cheng Z, Chu C. Mutations of genes in synthesis of the carotenoid precursors of ABA lead to preharvest sprouting and photooxidation in rice. *Plant J*, 2008, 54: 177–189
- [3] Guo T(郭涛), Huang X(黄宣), Huang Y-X(黄永相), Liu Y-Z(刘永柱), Zhang J-G(张建国), Chen Z-Q(陈志强), Wang H(王慧). Characterizations of a mutant gene *hw-1(t)* for green-revertible albino, high tillering and dwarf in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2012, 38(1): 23–35(in Chinese with English abstract)
- [4] Guo T(郭涛), Huang Y-X(黄永相), Huang X(黄宣), Liu Y-Z(刘永柱), Zhang J-G(张建国), Chen Z-Q(陈志强), Wang H(王慧). Map-based cloning of a green-revertible albino and high-tillering dwarf gene *hw-1(t)* in rice. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2012, 38(8): 1397–1406(in Chinese with English abstract)
- [5] Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G, Kuntz M. Mutations in the Arabidopsis gene *immutans* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell*, 1999, 11: 57–68
- [6] Wu D, Wright D A, Wetzel C, Voytas D F, Rodermerl S. The *IMMUTANS* variegation locus of Arabidopsis defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *Plant Cell*, 1999, 11: 43–55
- [7] Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46: 521–547
- [8] Beveridge C A, Kyojuka J. New genes in the strigolactone-related shoot branching pathway. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13: 34–39
- [9] Domagalska M A, Leyser O. Signal integration in the control of shoot branching. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12: 211–221
- [10] Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K, Yamamura S. Temporal expression of flavonoid biosynthesis-related genes regulates flower pigmentation in gentian plants. *Plant Sci*, 2005, 168: 1309–1318
- [11] Nelson N, Perzov N, Cohen A, Hagai K, Padler V, Nelson H. The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. *J Exp Biol*, 2000, 203: 89–95
- [12] Yu F, Fu A, Aluru M, Park S, Xu Y, Liu H, Liu X, Foudree A, Nambogga M, Rodermerl S. Variegation mutants and mechanisms of chloroplast biogenesis. *Plant Cell Environ*, 2007, 30: 350–365
- [13] Rédei G P. Somatic instability caused by a cysteine-sensitive gene in Arabidopsis. *Science*, 1963, 139: 767–769
- [14] Chung S C, Rédei G P. An anomaly of the genetic regulation of the de novo pyrimidine pathway in the plant Arabidopsis. *Biochem Genet*, 1974, 11: 11441–11453
- [15] Wetzel C M, Jiang C Z, Meehan L J, Voytas D F, Rodermerl S R. Nuclear-organelle interactions: the *immutans* variegation mutant of Arabidopsis is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis. *Plant J*, 1994, 6: 161–175
- [16] Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G, Kuntz M. Mutations in the Arabidopsis gene *immutans* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell*, 1999, 11: 57–68
- [17] Wu D, Wright D A, Wetzel C, Voytas D F, Rodermerl S. The *IMMUTANS* variegation locus of Arabidopsis defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *Plant Cell*, 1999, 11: 43–55
- [18] Lennon A M, Prommeenate P, Nixon P J. Location, expression and orientation of the putative chlororespiratory enzymes, Ndh and *IMMUTANS*, in higher-plant plastids. *Planta*, 2003, 218: 254–260
- [19] Josse E M, Simkin A J, Gaffè J, Labouré A M, Kuntz M, Carol P. A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chloroplast differentiation. *Plant Physiol*, 2000, 123: 1427–1436
- [20] Barr J, White W S, Chen L, Bae H, Rodermerl S. The *GHOST* terminal oxidase regulates developmental programming in tomato fruit. *Plant Cell Environ*, 2004, 27: 840–852
- [21] Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 1401–1426
- [22] Armstrong G A. Eubacteria shows their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J Bacteriol*, 1994, 176: 4795–4802
- [23] Park H, Kreunen S S, Cuttriss A J, DellaPenna D, Pogson B J. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. *Plant Cell*, 2002, 14: 321–332
- [24] Cunningham F X, Gantt E. Identification of multi-gene families encoding isopentenyl diphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in *Escherichia coli*. *Plant Cell*

- Physiol*, 2000, 41: 119–123
- [25] Auldridge M E, Mccarty D R, Klee H J. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9: 315–321
- [26] Qin G, Gu H, Ma L, Peng Y, Deng X W, Chen Z, Qu L. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Res*, 2007, 17: 471–482
- [27] Pyke K A, Leech R M. Chloroplast division and expansion is radically altered by nuclear mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1992, 99: 1005–1008
- [28] Pyke K A, Leech R M. A genetic analysis of chloroplast division and expansion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1994, 104: 201–207
- [29] Joët T, Genty B, Josse E M, Kuntz M, Cournac L, Peltier G. Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the *Arabidopsis thaliana* enzyme in tobacco. *J Biol Chem*, 2002, 277: 31623–31630
- [30] Casano L M, Zapata J M, Martin M, Sabater B. Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. *J Biol Chem*, 2000, 275: 942–948
- [31] Miura E, Kato Y, Sakamoto W. Comparative transcriptome analysis of green/white variegated sectors in *Arabidopsis* yellow variegated 2: responses to oxidative and other stresses in white sectors. *J Exp Bot*, 2010, 61: 2433–2445