

# 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

田韦韦, 王彩霞\*, 田 敏, 欧阳彤, 张 莹

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江省林木育种技术研究重点实验室, 杭州 311400)

**摘 要:** 以文心兰浅绿条纹突变体为材料, 分析叶片光合色素含量和组成、叶绿素合成前体物质含量以及叶绿素荧光参数的变化, 观察突变体叶绿体超微结构的改变, 以探寻其叶色变异的生理基础。结果表明: (1) 突变体叶绿素 a (Chl a)、叶绿素 b (Chl b)、类胡萝卜素 (Car) 和总叶绿素 (Chl) 含量分别比叶色正常植株显著降低了 37.1%、34.0%、30.8% 和 36.3%。(2) 突变体叶绿素生物合成受阻于胆色素原 (PBG) 到尿卟啉原 III (Urogen III) 的反应步骤。(3) 突变体叶绿体发育存在明显的缺陷, 基粒数目及基粒片层的垛叠层数明显减少, 嗜锇颗粒及囊泡较多。(4) 突变体初始荧光 ( $F_0$ ) 比正常植株高 39%, 最大荧光 ( $F_m$ )、最大光化学效率 ( $F_v/F_m$ )、PS II 有效光化学效率 ( $F_v'/F_m'$ ) 和 PS II 实际光化学效率 ( $\Phi_{PSII}$ ) 均显著低于正常植株, 但光化学淬灭系数 ( $qP$ ) 和非光化学淬灭系数 ( $NPQ$ ) 与正常植株无显著差异。研究结果说明, 文心兰叶绿素生物合成受阻和叶绿体结构发育不良, 导致叶绿素的含量下降, 致使突变体叶片呈现浅绿条纹, 光能利用率降低。

**关键词:** 文心兰; 浅绿条纹突变体; 光合色素; 叶绿素合成前体物质; 超微结构; 叶绿素荧光

中图分类号: Q945.3

文献标志码: A

## Physiological, Biochemical and Chlorophyll Fluorescence Characters of Light Green Stripe Mutant in *Oncidium*

TIAN Weiwei, WANG Caixia\*, TIAN Min, OUYANG Tong, ZHANG Ying

(Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding of Zhejiang Province, Hangzhou, 311400, China)

**Abstract:** In order to understand the physiological basis of a light green stripe mutant of *Oncidium* 'Milliongolds', we investigated the changes of the photosynthetic pigments and chlorophyll synthesis precursors contents, ultra-structure of chloroplasts and chlorophyll fluorescence parameters. The results showed that: (1) the contents of chlorophyll a (Chl a), chlorophyll b (Chl b), carotenoids (Car) and total chlorophyll (Chl) in mutant leaves revealed a remarkably decreased tendency, to decreased by 37.1%, 34.0%, 30.8% and 36.3% respectively ( $P < 0.05$ ). (2) The biosynthesis of chlorophyll in mutant was blocked at the reaction from prophobilinogen (PBG) to uroporphyrinogen (Urogen III). (3) In mutant leaves, the number of chloroplast reduced and there were some abnormal chloroplasts with less grana lamellas, as well as more osmiophilic granules and vesicles. (4) The minimal fluorescence ( $F_0$ ) of mutant was 39% higher than that of normal plant. Compared with normal plant, the maximal fluorescence ( $F_m$ ), maximum quantum yield of PS II ( $F_v/F_m$ ), photochemical efficiency of PS II in the light ( $F_v'/F_m'$ ) and actual photochemical efficiency of PS II ( $\Phi_{PSII}$ ) reduced significantly in mutant, while the photochemical quenching ( $qP$ ) and non photochemical quenching coefficient ( $NPQ$ ) of mutant were not significantly different from that of normal

收稿日期: 2015-05-04; 修改稿收到日期: 2015-07-24

基金项目: 国家自然科学基金(31301801); 中央级公益性科研院所基本科研业务费(CAFYBB2014QB012)

作者简介: 田韦韦(1991—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事观赏植物组织培养及分子生物学研究。E-mail: 18658143806@163.com

\* 通信作者: 王彩霞, 博士, 助理研究员, 主要从事观赏园艺学研究。E-mail: cxwanghn@163.com

plant. It was concluded that the blockage of chlorophyll biosynthesis and aberrant chloroplast lead to the decrease of chlorophyll contents, light green stripe of leaves and light-harvesting capacity in mutant.

**Key words:** *Oncidium*; light green stripe mutant; photosynthetic pigments; chlorophyll synthesis precursors; ultra-structure; chlorophyll fluorescence

文心兰(*Oncidium* spp.), 又名舞女兰, 为兰科(Orchidaceae)文心兰属(*Oncidium*)多年生草本植物, 原产于中美洲和南美洲的热带和亚热带地区<sup>[1]</sup>。文心兰的花枝长, 花小而繁多, 花形奇特, 颜色艳丽, 是一种观赏价值较高的洋兰, 被广泛用作切花材料和盆栽观赏。文心兰同其它兰科植物一样, 采用传统的分株繁殖方法繁殖系数较低, 难以满足市场需求, 利用组织培养技术可以加快繁殖速度, 实现种苗工厂化生产。在文心兰组织培养过程中, 再生植株易出现不同程度的叶色突变, 而且这些突变性状能快速地通过组织培养进行无性繁殖应用。

叶色突变通常是由于叶绿素的代谢过程受到影响, 导致叶绿素的含量和比例发生改变引起的。叶色突变体作为一种特殊的材料, 是研究高等植物光合机制、叶绿素代谢途径和叶绿体遗传发育等方面的理想材料。迄今, 国内外已从烟草(*Nicotiana tabacum* L.)<sup>[2]</sup>、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[3]</sup>、大麦(*Hordeum vulgare*)<sup>[4]</sup>、水稻(*Oryza sativa*)<sup>[5]</sup>、黄瓜(*Cucumis sativus* L.)<sup>[6]</sup>等众多植物中发现、获得并鉴定出大量叶色突变体。然而, 有关花卉叶色突变体的报道则较为匮乏, 花烛(*Anthurium andraeanum*)中有花叶、黄化叶、天鹅绒绿叶突变体<sup>[7]</sup>, 大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)中有白色条纹和黄色条纹叶色突变体<sup>[8]</sup>, 菊花(*Chrysanthemum morifolium*)中有黄绿叶突变体<sup>[9]</sup>, 文心兰(*Oncidium* spp.)中有黄化突变体<sup>[10]</sup>, 目前尚未见有关文心兰浅绿条纹突变体的研究报道。作者所在

研究组自 2005 年以拟原球茎诱导途径进行文心兰的组织培养<sup>[11]</sup>, 在组织培养后代中发现了浅绿条纹突变体, 此突变体具有较高的观赏价值。本研究以文心兰组培后代中获得的浅绿条纹突变体为试验材料, 分析叶片光合色素及叶绿素合成前体物质含量, 观察叶绿体的超微结构, 测定叶绿素荧光参数, 以初步了解其叶色变异的生理基础, 为进一步从分子水平揭示其机理奠定基础, 并为文心兰叶艺新品种培育提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为本研究组自 2005 年开始以拟原球茎诱导途径进行组织培养获得的浅绿条纹突变体, 该突变体叶片呈现绿色与浅绿色相间的纵条纹, 且其突变性状在离体增殖培养过程中保持稳定(图 1)。分别选取 5 株处于同一生长期, 长势相对一致, 具 5~6 叶的突变体和正常植株用于试验。

### 1.2 测定指标及方法

**1.2.1 光合色素含量** 光合色素含量的测定参照李合生<sup>[12]</sup>的方法。选取突变体和正常植株最上部第 2 片叶片, 剪成宽度小于 1 mm 细丝, 混匀后称取 0.05 g 放入试管, 加入 5 mL 丙酮与无水乙醇混合液(1:1, V/V)避光浸提至叶片完全变白(24 h), 测定溶液吸光度  $A_{470}$ 、 $A_{645}$  和  $A_{663}$ , 共 3 次重复。

**1.2.2 叶绿素合成前体物质含量** 选取突变体和正常植株最上部第 2 片叶片进行叶绿素合成前体物

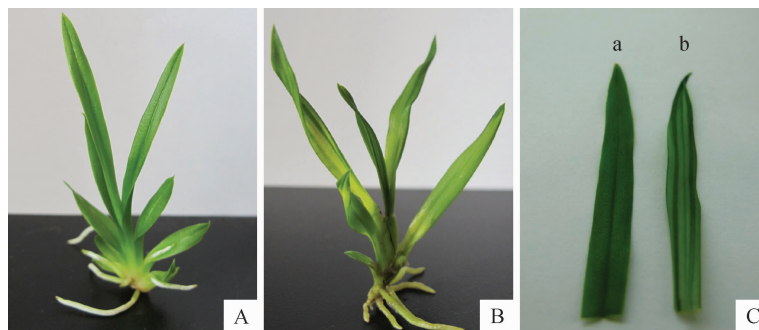


图 1 文心兰浅绿条纹突变体的表现

A. 正常植株; B. 浅绿条纹突变体; C. 正常植株(a)和浅绿条纹突变体(b)的叶片

Fig. 1 Phenotypes of light green stripe mutant of *Oncidium*

A. Normal plant; B. Light green stripe mutant; C. Leaves of normal plant (a) and light green stripe mutant (b)

质含量测定。 $\delta$ -氨基酮戊酸(ALA)含量按照王凌健等<sup>[13]</sup>方法测定;胆色素原(PBG)、尿卟啉原(Urogen III)和粪卟啉原(Coprogen III)含量参照 Bogorod<sup>[14]</sup>的方法测定;原卟啉 IX(Proto IX)、镁原卟啉 IX(Mg-proto IX)和原叶绿素(Pchl)含量的测定采用 Hodgins 等<sup>[15]</sup>的方法。将正常植株 7 种叶绿素合成前体物质含量均设为 100%,突变体叶绿素合成前体物质含量以相对于正常植株的百分比表示。

**1.2.3 叶肉细胞和叶绿体超微结构** 选取突变体和正常植株最上部第 2 片叶片,切成 1 mm×3 mm 小块,置于 2.5%戊二醛中 4℃固定过夜,0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗 3 次,1%饿酸固定 2 h,再用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗 3 次,乙醇梯度脱水,再将样品依次浸入体积比 1:1 和 1:3 的 spurr 包埋剂和丙酮的混合液渗透 1 h 和 3 h,纯 spurr 包埋过夜,70℃聚合过夜,Reichert 超薄切片机切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,在 JEM-1230 透射电镜下观察并拍照。

**1.2.4 叶绿素荧光参数** 采用 M 系列调制叶绿素荧光成像系统 Imaging-PAM,测定突变体和正常植株最上部第 2 片叶片叶绿素荧光参数。测定前,将叶片暗处理 20 min 以上,打开测量光(小于 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )测定初始荧光( $F_0$ ),再由饱和脉冲光(2 800  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )测得暗适应的最大荧光( $F_m$ ),随后开启光化光(21  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ),当时实荧光达到稳态后关闭光化光,同时打开远红光(持续 3~5 s),测得光适应条件下最小荧光( $F_0'$ )和最大荧光( $F_m'$ )<sup>[16-18]</sup>。PS II 最大光化学效率( $F_v/F_m$ )、PS II 的实际利用量子产额( $\Phi_{\text{PSII}}$ )、光化学淬灭系数( $qP$ )和非光化学淬灭系数( $NPQ$ )等荧光参数值由系统自动计算生成。

1.3 数据处理

数据采用 DPS 3.01 软件进行方差分析及显著性检验(LSD 法),利用 Microsoft Excel 2003 绘图。

2 结果与分析

2.1 文心兰突变体与正常植株叶片光合色素含量比较

文心兰浅绿条纹突变体叶片的 3 种光合色素(叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素)的含量及其比值均显著低于正常植株(表 1)。其中,突变体叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量比正常植株分别显著减少了 37.1%、34.0%和 30.8%,Chl a/Chl b 和 Chl/Car 分别减少了 5.4%和 10.0%。表明文心兰突变体叶片呈现浅绿条纹与叶绿素含量下降有关。

2.2 文心兰突变体与正常植株叶片叶绿素合成前体物质相对含量比较

如图 2 所示,文心兰浅绿条纹突变体叶片 ALA、PBG、Urogen III 和 Coprogen III 含量均高于正常植株,分别为野生型的 113%、135%、120%和 139%;而其 Proto IX、Mg-proto IX 和 Pchlde 含量却不同程度地比正常植株降低,降低幅度分别为 38%、28%和 36%。说明文心兰突变体叶绿素生物合成途径受阻,受阻位点位于叶绿素合成前体物质含量变化的拐点处,即从 Coprogen III 到 Proto IX 的转化步骤。

2.3 文心兰突变体与正常植株的叶肉细胞和叶绿体超微结构比较

利用透射电镜对文心兰浅绿条纹突变体和正常植株叶片的叶肉细胞、叶绿体超微结构进行比较观察,结果表明突变体与正常植株叶绿体结构存在较大的差异。其中,正常植株叶绿体呈纺锤形(图 3, A),基粒数目多且排列整齐,构成基粒的垛叠层数较多(图 3, B);嗜锇颗粒及囊泡较少。突变体的绿色叶片组织内叶肉细胞和叶绿体的超微结构与正常植株相似。突变体浅绿叶片组织的部分叶绿体形状与正常植株相似,呈纺锤形,但多数叶绿体发育异常,为近椭圆形(图 3, C),基粒数目较少且排列疏

表 1 文心兰浅绿条纹突变体与正常植株叶片的光合色素含量及比值

Table 1 Content and partial ratio of photosynthetic pigments in leaves of light green stripe mutant and normal plant of *Oncidium*

| 材料<br>Material | 叶绿素 a<br>Chl a<br>/(mg · g <sup>-1</sup> ) | 叶绿素 b<br>Chl b<br>/(mg · g <sup>-1</sup> ) | 类胡萝卜素<br>Car<br>/(mg · g <sup>-1</sup> ) | 总叶绿素<br>Chl<br>/(mg · g <sup>-1</sup> ) | 叶绿素 a/b<br>Chl a/Chl b | 总叶绿素/<br>类胡萝卜素<br>Chl/Car |
|----------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------|---------------------------|
| WT             | 0.143±0.009a                               | 0.047±0.002a                               | 0.039±0.003a                             | 0.190±0.010a                            | 3.036±0.208a           | 4.951±0.105a              |
| MT             | 0.090±0.018b                               | 0.031±0.006b                               | 0.027±0.004b                             | 0.121±0.024b                            | 2.873±0.178b           | 4.445±0.476b              |

注: WT. 正常植株; MT. 突变体; 表中同列数据后不同小写字母表示材料间在 0.05 水平差异显著; 表 2 同。

Note: WT. Normal plant; MT. Mutant; Different letters in the same column are significantly different between WT and MT at the 0.05 level. The same as in Table 2.

松,基粒片层的垛叠层数明显减少(图 3,D);嗜钺颗粒较多且相对集中(图 3,E),囊泡丰富(图 3,F),说明突变体叶绿体结构发育存在明显的缺陷。

2.4 文心兰突变体与正常植株叶绿素荧光参数的比较

$F_o$  和  $F_m$  分别是 PS II 反应中心处于完全开放和完全关闭时的荧光产量, $F_v/F_m$  反映 PS II 反应中心潜在的最大光化学效率, $F_v'/F_m'$  反映开放的 PS II 反应中心原初光能捕获效率。如表 2 所示,文

心兰突变体的  $F_o$  比正常植株高 39%,但未达到显著水平,而其  $F_m$ 、 $F_v/F_m$ 、 $F_v'/F_m'$  均显著低于正常植株,降低幅度分别为 48.1%、40.0% 和 48.5%。同时, $\Phi_{PSII}$  反映 PS II 反应中心部分关闭情况下的实际光能捕获效率,文心兰突变体的光能捕获效率显著低于正常植株,比正常植株显著降低了 53.5%。 $qP$  反映 PS II 天线色素吸收的光能用于光化学传递的份额, $NPQ$  代表 PS II 天线色素吸收的光能不能用于光合电子传递而以热的形式耗散掉的部分,文

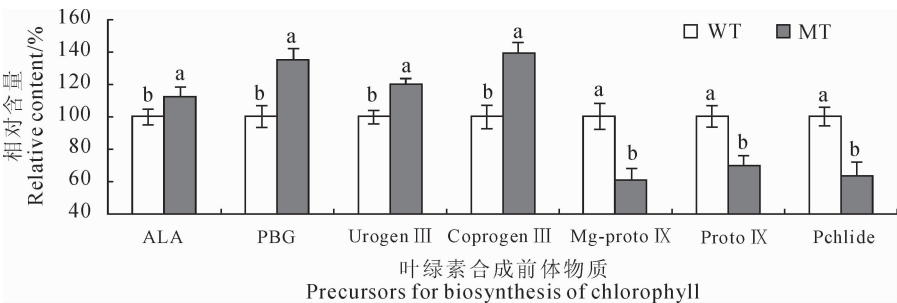


图 2 文心兰浅绿条纹突变体(MT)与正常植株(WT)叶片的叶绿素合成前体物质相对含量  
Fig. 2 Relative contents of precursors for biosynthesis of chlorophyll in leaves of light green stripe mutant (MT) and normal plant (WT) of *Oncidium*

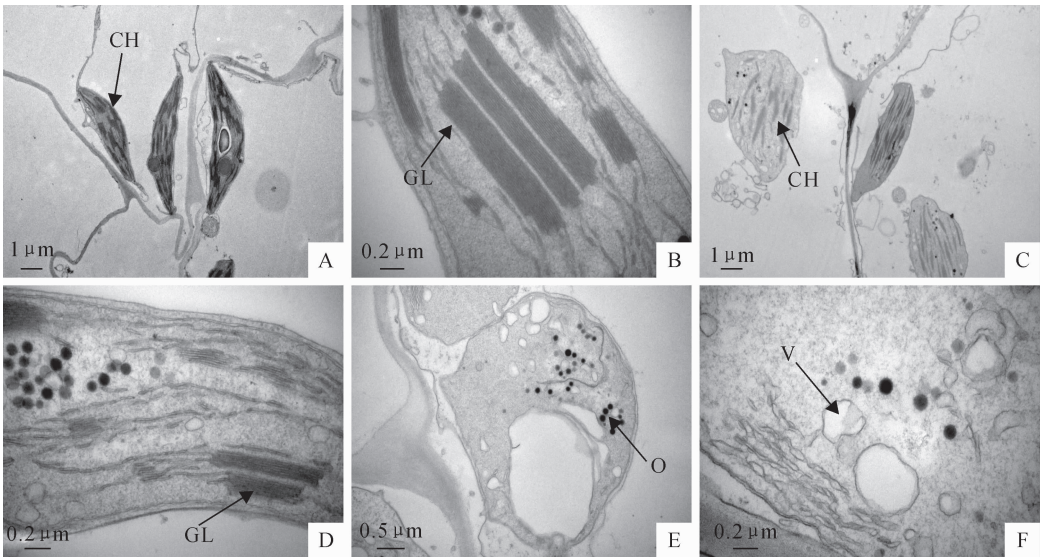


图 3 文心兰浅绿条纹突变体与正常植株的叶绿体超微结构  
A、B. 正常植株叶绿体超微结构;C~F. 突变体叶绿体超微结构;CH. 叶绿体;GL. 基粒片层;O. 嗜钺颗粒;V. 囊泡  
Fig. 3 The ultra-structure of chloroplast from light green stripe mutant and normal plant of *Oncidium*  
A、B. Chloroplast of normal plant;C~F. Chloroplast of light green stripe mutant;CH. Chloroplast;  
GL. Grana lamellae;O. Osmioplilic granule;V. Vesica

表 2 文心兰浅绿条纹突变体与正常植株叶片的叶绿素荧光动力学参数

| 材料<br>Material | $F_o$              | $F_m$              | $F_v/F_m$          | $F_v'/F_m'$        | $\Phi_{PSII}$      | $qP$               | $NPQ$              |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| WT             | $0.142 \pm 0.010a$ | $0.730 \pm 0.043a$ | $0.806 \pm 0.003a$ | $0.656 \pm 0.020a$ | $0.505 \pm 0.045a$ | $0.770 \pm 0.050a$ | $0.189 \pm 0.038a$ |
| MT             | $0.198 \pm 0.076a$ | $0.379 \pm 0.131b$ | $0.484 \pm 0.030b$ | $0.338 \pm 0.034b$ | $0.235 \pm 0.027b$ | $0.696 \pm 0.055a$ | $0.175 \pm 0.024a$ |

心兰突变体的  $qP$ 、 $NPQ$  与正常植株相比有所降低但差异不显著,分别为正常植株的 90.4%和 92.6%。可见,文心兰突变体的叶绿体结构可能受到破坏,导致捕光色素蛋白复合物减少,PSII 活性大大降低,PSII 的光能捕获率降低,不利于光能的利用,但其光化学淬灭和非光化学淬灭没有受到显著影响。

### 3 讨 论

叶色变异是一种常见的突变性状,突变植株叶片主要呈现白化、黄化、浅绿、白绿、黄绿、绿黄、条纹、斑点等表型<sup>[19]</sup>。本研究发现,文心兰条纹突变体中叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素和总叶绿素含量均显著低于正常植株,分别比正常植株降低 37.1%、34.0%、30.8%和 36.3%,引起叶色变异的直接原因是光合色素含量的减少。高等植物体内的叶绿素处于不断合成和降解的动态变化之中,其中任何一个环节受阻,都可能导致植物体叶绿素含量的变化,从而引起叶色变异。邵勤等<sup>[20]</sup>对甜瓜叶色黄化突变体叶绿素生物合成前体物质进行测定,结果表明受阻于 PBG 与 Urogen III 之间。吕明等<sup>[21]</sup>研究表明芥菜型油菜黄化突变体叶绿素合成代谢受阻于 Coproten III 至 Proto IX 的步骤。本研究中叶绿素合成前体物质含量的测定结果显示,突变体叶绿素合成途径受阻于 Coproten III 到 Proto IX 的过程,导致 ALA、PBG、Urogen III 和 Coproten III 明显积累,而后续合成的 Proto IX、Mg-proto IX 和 Pchlide 含量则显著降低。综上所述,引起文心兰突变体叶色变异的主要是由于叶绿素生物合成受阻,导致叶绿素含量降低和比例发生改变,引起叶色变化。

据报道,大多叶色突变体叶绿体结构都发生了不同程度的改变<sup>[22-23]</sup>。曹莉等<sup>[24]</sup>对小麦黄化突变体叶绿体超微结构观察发现,金黄和绿黄突变体的叶绿体发育存在明显缺陷,金黄植株的叶绿体内无基粒、基质片层清晰可见,有淀粉粒,嗜银颗粒较多,而绿黄植株的叶绿体内有基粒,但明显少于突变亲本,且基粒片层较少,基粒类囊体较发达。中华金叶榆子代黄叶苗叶绿体内膜系统发育缺陷,基粒片层

垛叠失败,进而多种色素含量大幅下降,光合系统发育不完全,致使其叶片呈现黄色、光合性能下降、植株生长缓慢<sup>[25]</sup>。本研究的文心兰突变体叶绿体发育不完整,基粒数目及类囊体垛叠层数均减少,嗜银颗粒较多,囊泡丰富,代谢能力弱。由此可以推断突变体叶色变异的原因可能是由于叶绿体发育受阻,使叶绿素失去了依托的物质基础,叶绿素合成陷于停滞状态,叶绿素含量降低,从而导致叶色改变。

叶绿素荧光参数是描述植物光合作用机理和光合生理状况的重要指标,光系统对光能的吸收、传递以及耗散等过程都可以通过叶绿素荧光参数的变化反映<sup>[26]</sup>,被广泛用于叶色突变体的光合机理研究。与正常植株相比,文心兰浅绿条纹突变体的  $F_v$  增加了 39%,表明 PSII 反应中心可能受到破坏,类囊体膜结构可能受到损伤<sup>[27-28]</sup>。高等植物  $F_v/F_m$  一般恒定在 0.80~0.85<sup>[29-30]</sup>,当植物受到光抑制、环境胁迫或发生某些基因突变时, $F_v/F_m$  值会出现显著变化。本研究中,突变体的  $F_v/F_m$  比正常植株减少了 40%,然而突变体和正常植株均生长在相同的环境中,没有受到任何的环境胁迫,因此突变体  $F_v/F_m$  的显著降低不可能是外界环境引起的,推测可能是由于叶绿体结构受到破坏发生光抑制或者基因突变所致。 $F_v'/F_m'$  和  $\Phi_{PSII}$  是对光适应状态下 PSII 光化学过程的度量,本研究中文心兰突变体的  $F_v'/F_m'$ 、 $\Phi_{PSII}$  显著低于正常植株,可能是由于叶绿体结构受到破坏,导致捕光色素蛋白复合物减少,PSII 活性大大降低,PSII 的光能捕获率降低,不利于光能的利用;同时,突变体的  $qP$ 、 $NPQ$  与正常植株无显著差异,表明突变体叶绿素在一定范围内降低时,对光化学淬灭和非光化学淬灭无显著影响。

综上所述,文心兰黄绿突变体叶绿素前体物质合成受阻和叶绿体结构发育不良,影响其叶绿素的正常合成,造成叶绿素含量降低,同时 PSII 结构受到破坏,导致叶色改变,光能利用率下降。另外,植物叶色突变的机制较为复杂,是生理和遗传因素共同作用的结果,有关文心兰叶色变异的分子机制有待进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] 陈心启. 中国兰花全书 [M]. 北京:中国林业出版社,1998,200.
- [2] MELIS A, THIELEN A P G M. The relative absorption cross-sections of photosystem I and photosystem II in chloroplasts from three types of *Nicotiana tabacum* [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, **589**(2): 275-286.

- [3] TOMINAGA-WADA R, NUKUMIZU Y, WADA T. Flowering is delayed by mutations in homologous genes *CAPRICE* and *TRYPTIC* in the early flowering *Arabidopsis cpl3* mutant[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, (170): 1 466—1 468.
- [4] CHEN SH W(陈升位), WANG N(王楠), et al. Development of three leaf color mutants of naked barley and the comparative analysis of their mutant traits[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*(云南农业大学学报), 2014, **29**(1): 1—5 (in Chinese).
- [5] KONG X, KASAPIS S, BAO J. Viscoelastic properties of starches and flours from two novel rice mutants induced by gamma irradiation[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, **64**(2): 578—582.
- [6] 苗 晗. 黄瓜叶色突变体 9110Gt 转色机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [7] XU B(徐彬), XIN W J(辛伟杰), WANG G D(王广东), et al. Characteristics of Chimeras of *Anthurium andraeanum* from *in vitro* Mutation[J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 2006, **23**(6): 698—702(in Chinese).
- [8] MA H SH(马华升), YAO Y L(姚艳玲), XIN Y(忻雅), et al. Gain and DNA identification of leaf color mutant derived from tissue culture of *Cymbidium hybridum* [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*(浙江农业学报), 2008, **20**(3): 149—153(in Chinese).
- [9] CHANG Q SH(常青山), CHEN F L(陈发棣), et al. Chlorophyll contents and chloroplast microstructure and ultrastructure of leaves in yellow-green mutant of *Chrysanthemum* [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2008, **28**(9): 1 772—1 777(in Chinese).
- [10] WANG C X(王彩霞), TIAN W W(田韦韦), TIAN M(田敏), et al. The Preliminary study of Xantha mutants in *Oncidium* [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Science*(核农学报), 2013, **27**(12): 1 845—1 852(in Chinese).
- [11] OUYANG T(欧阳彤), CHEN SH(陈胜), WANG F ZH(汪凤珍). Key Technology study on *Oncidium* industrial propagation by tissue culture [J]. *Forest Research*(林业科学研究), 2006, **19**(5): 606—611(in Chinese).
- [12] 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, 2002: 134—137.
- [13] WANG L J(王凌健), NI D A(倪迪安), YE X F(叶叙丰), et al. Determination of  $\delta$ -aminolevulinic acid in plant leaves[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 1997, **35**(6): 439—441(in Chinese).
- [14] BOGOROD L. Porphyrin synthesis [M]. Methods in enzymology. New York: Academic Press, 1962: 885—895.
- [15] HODGINS R, VAN HUUSTEE R B. Rapid simultaneous estimation of protoporphyrin and Mg-protophyrins in higher plants [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1986, **125**(3—4): 311—323.
- [16] SONG H Y(宋红艳), ZHANG ZH W(张振文), et al. Analysis on Chlorophyll Fluorescence Parameters of Photosystem II in Cassava Diploid and its Autotetraploid [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*(热带作物学报), 2014, **35**(12): 2 410—2 413(in Chinese).
- [17] DUAN X Q(段晓琼), TANG Q J(唐秋菊), et al. Research of physiological responses of *Chlamydomonas reinhardtii* to environmental changes utilizing imaging-PAM [J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2010, **46**(3): 263—267(in Chinese).
- [18] LI W, GAOKE Z, SHUBIN L, et al. Longitudinal Photosynthetic Gradient in Crust Lichens' Thalli [J]. *Microb Ecol.*, 2014, **67**(4): 888—896.
- [19] AWAN MA, KONZAK CF, RUTGER J N, et al. Mutagenic effects of sodium azide in rice [J]. *Crop Science*, 1980, **20**(5): 663—668.
- [20] SHAO Q(邵勤), YU Z Y(于泽源), LI X G(李兴国). Studies on internal physiological and biochemical changes of Xantha Mutant in Melon Leaves [J]. *China Vegetables*(中国蔬菜), 2013, (14): 59—65(in Chinese).
- [21] LÜ M(吕明), LIU H H(刘海衡), MAO H D(毛虎德), et al. Changes of chlorophyll synthesis metabolism in chlorophyll-deficient mutant in *Brassica juncea* [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2010, **30**(11): 2 177—2 183(in Chinese).
- [22] SIMPSON D J, VON W D. The structure and function of the thylakoid membrane [J]. *Carlsberg Res Commun*, 1989, **54**(2): 55—65.
- [23] AUSTIN II J, WEBBER A N. Photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants with reduced chloroplast number [J]. *Photosynthesis research*, 2005, **85**(3): 373—384.
- [24] CAO L(曹莉), WANG H(王辉), SUN D J(孙道杰), et al. Chloroplast Ultra-structure of a Xantha wheat mutant [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2006, **26**(11): 2 227—2 230(in Chinese).
- [25] ZHU X J(朱晓静), SHANG A Q(尚爱芹), YANG M S(杨敏生), et al. Photosynthetic characteristics and leaf coloration mechanism of the next generation of golden *Ulmus pumila* [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2014, **34**(5): 950—956(in Chinese).
- [26] BAKER N R, ROSENQVIST E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities [J]. *J. Exp. Bot.*, 2004, **55**: 1 607—1 621.
- [27] HERNANDEZ-TERRONES M G, GUILAR M I, KING-DIAZ B, et al. Inhibition of photosystem II in spinach chloroplasts by trichloro-ban-19-oic acid [J]. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 2003, **14**(5): 695—698.
- [28] JIAO L L(缴丽莉), LU B SH(路丙社), et al. Effects of shading on net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence parameters of leaf in david maple (*Acer davidii* Franch.) [J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 2007, **34**(1): 173—178(in Chinese).
- [29] LI X(李晓), FENG W(冯伟), ZENG X CH(曾晓春), et al. Advances in chlorophyll fluorescence analysis and its uses [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2006, **26**(10): 2 186—2 196(in Chinese).
- [30] XIAO H G(肖华贵), YANG H W(杨焕文), et al. Photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence kinetic parameters analyses of chlorophyll-reduced mutant in *Brassica napus* L. [J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2013, **39**(3): 520—529(in Chinese).

(编辑: 裴阿卫)