

CHLOROPLAST MOLECULAR GENETICS IN HIGHER PLANTS

李继耕 著

高等植物叶绿体 分子遗传学

.821

3

高等植物叶绿体分子遗传学

李继耕 著

中国科学院图书馆藏
李继耕赠
(1991年6月)

北京农业大学出版社

1987

责任编辑：吴肖菊

绘 图：郑川

封面设计：于立彦

高等植物叶绿体分子遗传学

李继耕 著

* * *

北京农业大学出版社出版
(北京市海淀区圆明园西路)

北京市枫叶印刷厂印刷
新华书店首都发行所发行

* * *

1987年7月第1版 1987年7月第1次印刷

开本：805×1168毫米1/32 印张：6.38

字数：162千字 印数：1-5000

ISBN 7-81002-011-0/S·12

统一书号：16446·27

定 价：2.10元

内 容 提 要

本书是作者在中国科学院研究生院的讲义。全书共分九章。书中对叶绿体DNA、RNA、蛋白质基本理论与组分I蛋白质、色素蛋白复合体和膜蛋白、光合突变体、雄性不育性以及遗传工程等应用方面都作了较系统的论述。论述中很多地方引用了作者自己的研究工作，提出了自己的见解，是本书不同于一般教学参考书的最大特点。书中还将叶绿体分子遗传研究方法和对最新的国际研究动态的综述，作为两个附录附在书后。

本书涉及遗传学，细胞学和植物生理学三个基础学科领域，是这三个专业的教师、研究生和大学生的必备参考书。

前 言

叶绿体遗传，是细胞质遗传的一个重要组成部分。它的主要研究对象是与叶绿体有关的遗传现象及其机理。

经典的叶绿体遗传研究对象不是高等植物而是藻类。如衣藻 (*Chlamydomonas reinhardi*)，伞藻属 (*Acetabularia*)，眼虫藻 (*Euglena gracilis*)，小球藻 (*Chlorella fusca*) 等。这些藻类都具备一些有利于叶绿体遗传研究的特点，因而受到理论研究者重视，至今仍在广泛应用。但是，由于它们同人类的经济生活关系较远，因而，近年来逐渐采用高等植物从事叶绿体遗传研究的趋势日益明显，并已取得相当成就。把叶绿体遗传研究建立在农作物的广泛基础上，它的实践意义是显而易见的。

叶绿体分子遗传学发展的历史并不久。如果把1972年第一个高等植物叶绿体DNA分子获得作为起点的话，至今不过十多年的历史。但是，它涉及的范围却非常广泛，除去有关DNA、RNA及蛋白质等基础理论方面以外，还逐渐涉及叶绿体突变，花斑植物、细胞质雄性不育性以及叶绿体遗传工程等应用方面。进步的迅速，成果之广泛，充分说明这个遗传学新领域的充沛生命力与广阔前景。

我们正在从事高等植物叶绿体分子遗传学的研究。我们的工作既有理论研究方面，也有应用研究方面。若干研究成果，将结合本书内容在相应章节中分别加以叙述、讨论。我们所取得的研究成果，在整个叶绿体遗传学的发展长河中，可能只是一滴水，但是，能够在这条长河中添加一滴水，也算尽了我们一份力量。

最后应该说明一点：本书中所引用的有关我们自己的研究成果，是我们这个研究小组全体成员的共同劳动成果。全体成员中先后包括有：李继耕、李玉湘、舒群芳、刘一农、刘祚昌、高文琴、耿玉轩、陈福太、罗会馨、李家洋、吕应堂等十一人。最后

附的实验研究方法，也是我们实验室实际工作中采用的方法，考虑到每个实验室的条件不同，国内有关的实验室同国外的又大不相同。因此，把这些方法介绍出来，对于有志于从事叶绿体遗传研究的初学者，可能是有帮助的。

本书初稿承厦门大学生物系汪德耀教授审阅，作者谨向汪先生致诚挚的谢意。

目 录

第一章 质体的种类、结构和功能	(1)
一、质体的种类	(1)
二、叶绿体的结构和功能	(2)
三、叶绿体的连续性	(8)
参考文献	(12)
第二章 叶绿体DNA	(14)
一、叶绿体DNA 的分子形状与大小	(14)
二、叶绿体DNA 的物理化学特性	(17)
三、叶绿体DNA 的数量与编码能力	(21)
四、叶绿体DNA 的复制	(23)
五、叶绿体DNA 物理图	(25)
参考文献	(29)
第三章 叶绿体RNA	(33)
一、叶绿体核糖体	(33)
二、核糖体RNA (rRNA)	(36)
三、转移RNA (tRNA)	(40)
四、信使RNA (mRNA)	(43)
五、离体叶绿体中RNA的合成	(44)
参考文献	(47)
第四章 叶绿体蛋白质	(52)
一、叶绿体蛋白质的合成	(52)
二、叶绿体蛋白质的运输	(61)
三、叶绿体蛋白质的整合	(62)
四、叶绿体蛋白质合成系统与线粒体及细胞质合成系	

统的关系	(64)
五、体外转录-翻译	(65)
参考文献	(69)
第五章 组分 I 蛋白质	(75)
一、组分 I 蛋白质的结构和功能	(75)
二、组分 I 蛋白质的分离与纯化	(77)
三、烟草属不同种间杂交与组分 I 蛋白质	(80)
四、作为表型标记的组分 I 蛋白质	(82)
五、 C_3 、 C_4 植物与组分 I 蛋白质	(85)
参考文献	(88)
第六章 类囊体膜蛋白质与色素蛋白质复合体	(92)
一、类囊体膜蛋白质的种类和性质	(92)
二、类囊体膜蛋白质基因及其表达	(98)
三、色素蛋白质复合体的种类	(101)
四、色素蛋白质的突变	(104)
参考文献	(111)
第七章 花斑植物与突变体的种类和遗传	(115)
一、核突变形成的花斑	(115)
二、染色体畸变引起的花斑	(117)
三、嵌合体	(118)
四、花斑植物的遗传	(121)
五、关于混合细胞 (Mixed cell) 问题	(124)
六、光合突变体的诱导、筛选和鉴定	(125)
参考文献	(129)
第八章 细胞质雄性不育性	(133)
一、叶绿体 DNA 与雄性不育性	(133)
二、叶绿体蛋白质与雄性不育性	(141)
三、叶绿体超微结构与雄性不育性	(146)
四、叶绿体、线粒体与细胞质雄性不育性	(147)

参考文献	(150)
第九章 DNA重组与叶绿体遗传工程	(154)
一、DNA重组的一般程序	(154)
二、叶绿体遗传工程	(158)
参考文献	(168)
附录 I：叶绿体分子遗传与遗传工程研究进展	(171)
附录 I：高等植物叶绿体分子遗传学研究方法	(184)

第一章 质体的种类、结构和功能

质体是一个重要的真核生物细胞器。它通过光合作用，借助于叶绿素把光能转变为化学能，为整个生物界提供能量，从而更新着大气中的氧气，改善着地球上生命存在的条件。质体含有光合作用所必需的全部酶及成分，因而是光合作用器官。其次，从遗传学的角度看，正常成熟的质体——叶绿体中，包含有DNA、RNA以及DNA复制，转录和翻译的整个系统，称为叶绿体遗传系统。它和线粒体遗传系统、核质遗传系统共同组成真核植物中三个相对独立而又相互联系的遗传系统。因而，在遗传学研究中占有重要地位。

一、质体的种类

高等绿色植物叶肉细胞中的叶绿体，一般被认为是典型的叶绿体，形状像一个凸透镜，直径约 5μ ，厚 $2-3\mu$ ，被包围在细胞质中，倾向于靠近细胞间隙区域，便利进行气体交换。叶绿体的形状、大小，依遗传与环境条件而有不同。它的干物质化学成分为：蛋白质40-50%，类脂23-25%，叶绿素a+b，5-10%，类胡萝卜素1-2%。图(1.1)显示几种藻类叶绿体的不同形状。

质体的种类，根据不同的标准而有不同的划分。根据颜色可以分为有色体(Chromoplasts)及无色体(Leucoplasts)。而有色体又分为有光合活性及无光合活性两类质体。有光合活性的有色体中有叶绿体(Chloroplasts)，棕色体(Pheoplasts)，红色体(Rhodoplasts)，兰绿藻中的Chromatopheres以及光合细菌中的Chromatopheres等。无光合活性的有色体一般含有胡萝卜素，但不含叶绿素，它的颜色，从红至黄，变化很大，花与果实的颜色常与此有关。

无色体是所有成熟而无颜色的质体，包括淀粉贮存器官中的淀粉体(Amyloplasts)，油分占优势器官中的油体(Elaio-plasts)以及蛋白质颗粒结晶占优势的器官中的蛋白质体(Aleurone-plasts)。

根据发育时期，可以将质体分为尚未开始分化的原质体(Proplastids)，分化质体，充分发育质体以及开始衰老质体等。

根据功能，又可将质体分为光合作用质体，如叶绿体，贮存质体如上述的淀粉体等；具有次级功能的质体，如果实及花中的有色体及无色体；以及具有分裂功能的质体如原质体(Gramick 1961)。

二、叶绿体的结构和功能

高等植物中的原质体，系指胚胎细胞或分生组织细胞中未充分发育的质体，圆形或不规则形，无色，比成熟质体小，一般直径为1—1.5 μ ，可以随细胞的分裂而分裂。从原质体分化为叶绿体必需要光。未分化前的原质体无色，又称白色体(Etioplasts)，它本身已经包含有形成具有光化学活性的叶绿体的一切前体，经几小时照光，即迅速分化为叶绿体。故这种白色体同前述的无色体(Leucoplasts)不同，不可混为一谈。

在电子显微镜下，可以观察到叶绿体由被膜(Envelope)、基质(Matrix或Stroma)和片层系统(Lamellar system)所组成。如果用钨酸固定，在基质中还可以发现嗜钨酸颗粒。

叶绿体被膜是包被叶绿体的双层膜。外面与细胞质相接触的一层称外膜(Outer membrane)，内面与基质相接触的一层称为内膜(Inner membrane)。叶绿体以其被膜同细胞质隔开，由光合作用形成的各种物质，通过这种薄膜传送，因而被膜具有半渗透性质。

基质(Matrix，又译作衬质)是构成片层的底物，以含亲水性蛋白质为主。如果被膜遭到破坏，基质即可外流，故呈高度流

动状态。基质中含有淀粉粒、DNA、沉降系数为70S的叶绿体核糖体以及各种酶等。亦有些著作中称此部分为Stroma。

片层系统由基粒片层(Grana lamellae) 及间质片层 (Stroma lamellae, 亦译基质片层) 两部分所组成。前者指由类囊体 (Thylakoid) 双层膜紧密地垛叠在一起的圆柱体, 每一层像一个圆盘 (disc, disk or stack), 直径约为 $0.3-1.0\mu$ 。每层膜的厚度约 $40-60\text{\AA}$ 。连接不同基粒之间的单个片层, 称为间质片层。组成基粒的类囊体称小类囊体, 组成间质的类囊体称 大 类 囊 体 图 (1.2)

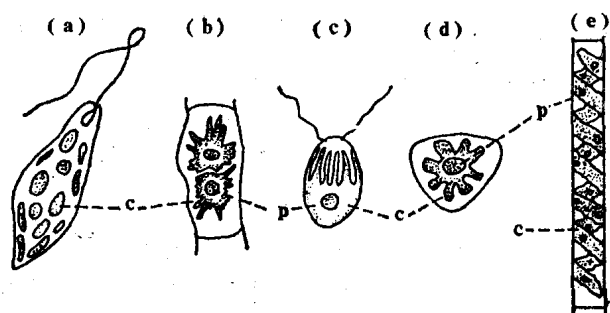


图1.1 几类藻类叶绿体

- a) 眼虫藻 (*Euglena gracilis*)
 - b) 双星藻 (*Zygnema Stellinum*)
 - c) 衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)
 - d) 叉星藻 (*Staurastrum kjellmannii*)
 - e) 水绵 (*Spirogyra sp.*)
- c—叶绿体 p—造粉体

关于类囊体膜的超微结构, 存在有不同的假说和模式。这里简要介绍四种, 以供参考比较。

第一种模式是Schnepf(1980)提出的。如(图1.3)所示, 在基粒类囊体相邻的间隔区 (Partition zone), 集中有光系统 I 与 I 活性, 叶绿素a : b比例低于间质类囊体中, 膜内有两类大小不同的颗粒。大颗粒直径为 $13-17\text{nm}$ 。位于膜的EF面, 代表光系



图1.2 蕃茄(品种: 大叶早粉)叶肉细胞叶绿体(15000 $\times$)的超微结构

G—基粒 S—基质 E—被膜

统Ⅱ (PS—Ⅱ) 反应中心和捕光叶绿素与蛋白质的联合;小颗粒直径9—12nm, 为光系统Ⅰ (PS—Ⅰ) 反应中心,它在间质区占优势,主要位于膜的PF面。连接在PS面上的是直径为10—11nm的颗粒,代表光合磷酸化的偶联因子,也就是ATP酶。

第二种模式是Miller(1978)提出的。如(图1.4)所示, Miller认为,类囊体膜的外表面是偶联因子,而贯穿膜的大颗粒为PS—Ⅱ复合体。该复合体包括一个核心,即PS—Ⅱ反应中心以及周围起捕光作用的叶绿素蛋白质复合体。附近也存在有PS—Ⅰ复合体。至于PS—Ⅰ复合体的结构性质,偶联因子的结合位点以及膜中其它成分,目前尚不十分清楚,虽然也可能PS—Ⅰ复合体就是利用冰冻蚀刻技术所显示在PF面上的可看见的颗粒。

第三是Jan M. Anderson 1981提出的模式。按照这个模式,整个类囊体由两个不同膜区组成:外表面直接同基质相接触的区,称为外露类囊体 (Exposed thylakoid)。包括基质类囊体(St-

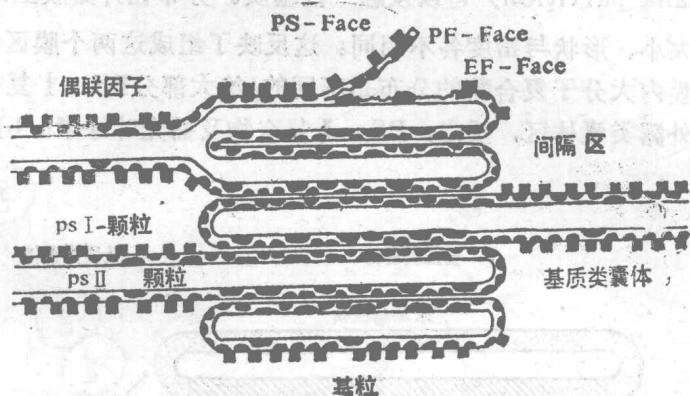


图1.3 基于超薄切片与冰冻蚀刻的叶绿体类囊体膜系统图式

roma thylakoid)，末端基粒膜 (End grana membrane) 以及基粒的两端端 (Margins) 等部分。挤压在一起的基粒类囊体膜，称为挤压类囊体 (Appressed thylakoid)，它的基粒间隔

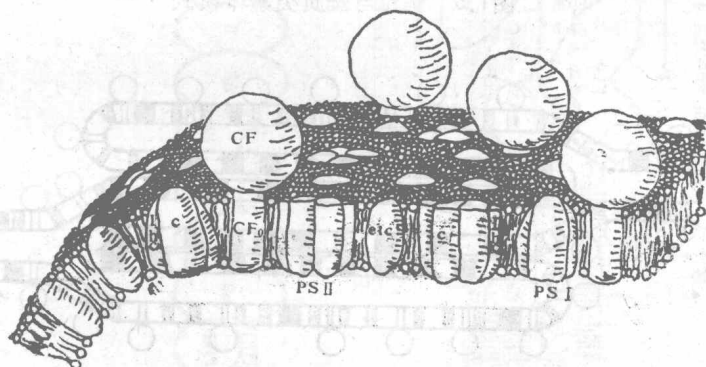


图1.4 类囊体膜中光反应成分的组织模式图

PSI—光系统 I 复合物；PS II—光系统 II 复合物

C—光系统 I 与 II 的核心复合物；CF—偶联因子

CF₀—偶联因子结合位点；LHC—和光系统 I 与

II 联合的各种捕光复合物

etc—其它电子传递链成分

(Grana partition) 可以接触一些基质。分布在外露膜上的颗粒，大小、形状与密度各不相同。这反映了组成这两个膜区的类囊体膜内大分子复合物的分布是不同的。绝大部分PS—I 复合物位于外露类囊体区，反之，PS—I 复合物及捕光叶绿素a/b蛋白

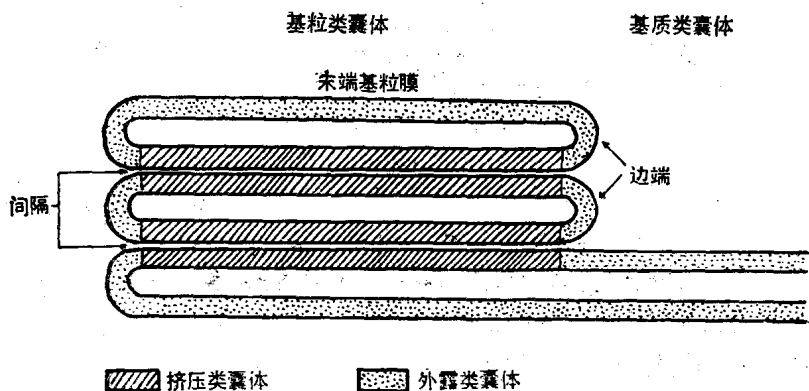


图1.5 基粒与基质类囊体模式

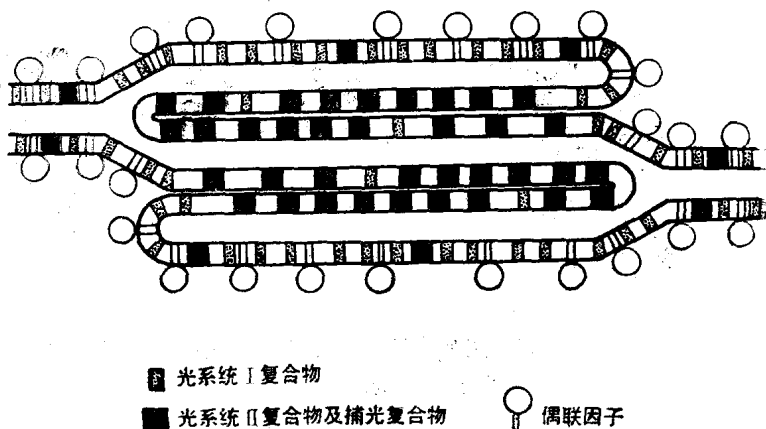


图1.6 光系统 I 复合物与光系统 II 复合物位置图

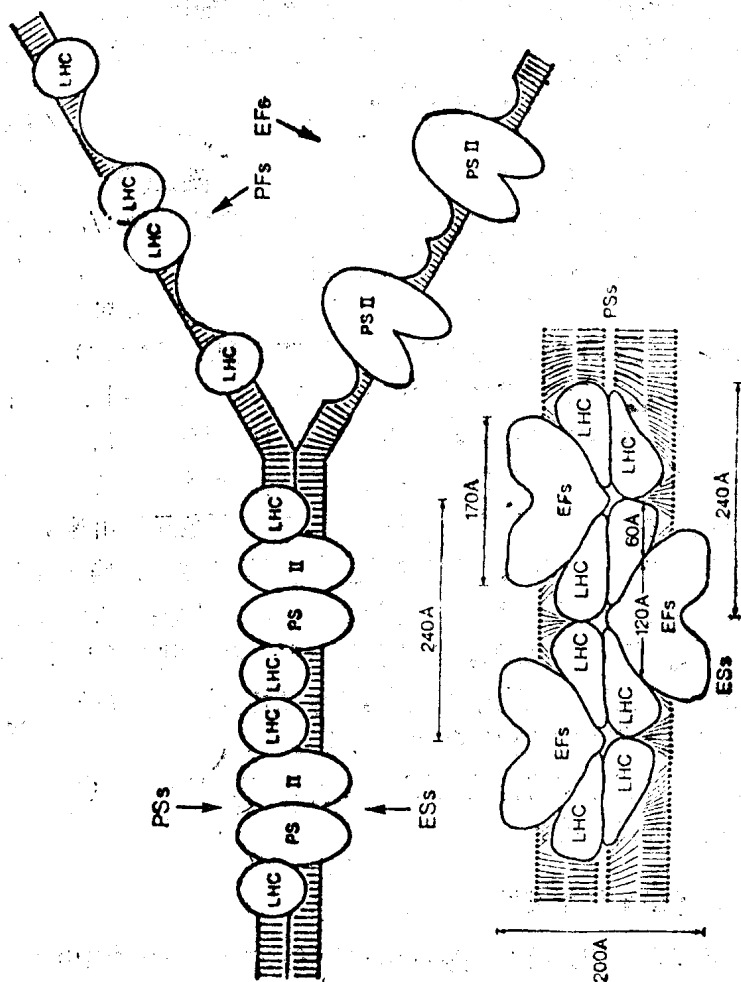


图1.7 类囊体膜结构图 LHC—捕光叶绿素a/b复合物

质复合物，则位于挤压类囊体膜区。此外，偶联因子主要位于外露类囊体膜上。换言之，类囊体膜结构上的分化是与功能分化平行的，而PS—I与PS—II复合物的分布则是空间隔离的。这是这一模式的一个特点。至于由于空间隔离而造成的电子传递问题，Anderson认为，从PS—II到PS—I的电子传递载体，很可能是由质体醌来完成的（图1.5和1.6）。

第四个模式包括一个较简单的膜结构图式和一个更为详细的膜结构图式。主要显示经冰冻蚀刻技术处理后垛叠区(Stacked)的4个膜面以及PS—I反应中心及其周围的捕光叶绿素a/b复合物(LHC)的结构。EF面的特点是大颗粒在垛叠区(EFs)的分布较之非垛叠区(EFu)更为密集，而PF面的特点是小颗粒的分布在垛叠区(PFs)比非垛叠区(PFu)更为密集(图1.7)。

从另两幅更为详细的彩色图中可以看出，构成PS—I、PS—II和偶联因子的各个亚基及各种成分，是用不同颜色标示出来的。各种成分所在位置及其化学组成也同时标出。更为重要的是，各种不同成分的合成部位与编码部位，也用不同颜色显示出来。着黄色部分为核DNA编码、经细胞质80S核糖体合成后，输入并整合到叶绿体中的；而紫色部分，则为叶绿体DNA编码、并且是在叶绿体70S核糖体中合成的。未着色的白色部分，其合成与编码部位，均尚待证明。从这个模式中，可以看到叶绿体DNA与核DNA联合作用的重要性图(1.8和1.9)。

这两个类囊体膜结构模式均为D. von Wettstein (1981、1983)新近提出来的。

三、叶绿体的连续性

大量观察表明，分裂是质体增殖的唯一形式。子细胞中的质体，来源于母细胞。沉入水中的植物泥炭藓属(*Sphagnum cuspidatum*)基部小叶中含有1、2、4、8、16及32个叶绿体。相邻的细胞也是如此。这就说明，叶绿体在每一个单细胞中呈倍数地