

大白菜随体染色体的附加和减少对种株光合特性的影响

申书兴^{1,2}, 侯喜林^{1*}, 付雅丽³

(¹ 南京农业大学作物遗传与种质资源创新国家重点实验室, 园艺学院, 南京 210095; ² 河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001; ³ 石家庄市农业科学研究院, 石家庄 050041)

摘要: 以大白菜随体单体、三体和二倍体为试材, 在自然条件下, 对生殖生长期的功能叶的叶绿素含量、希尔反应活性、净光合速率、光合速率日变化、Rubisco 活性等生理生化指标进行了测定, 以研究同源染色体的附加和减少对光合特性的影响, 为开展染色体工程育种提供参考。结果表明: 随体染色体的减少或附加对叶绿素含量有正效应, 对叶绿素 a/b 的比值有负效应。随体染色体的减少或附加对大白菜的光合速率都产生不同程度的负效应。随体三体和二倍体净光合速率日变化均呈典型的双峰曲线, 有明显的“午休”现象, 随体单体“午休”现象不明显。随体染色体的减少或附加对希尔反应和 Rubisco 活性均有负效应。希尔反应活性和 Rubisco 活性的降低是引起随体单体、三体光合速率降低的直接原因。

关键词: 大白菜; 染色体; 染色体附加; 单体; 三体; 光合作用; 染色体工程

中图分类号: S 634.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 05-1157-06

Characteristics of Photosynthesis in Seed Plants of Satellite Chromosome Monosome, Diploid and Trisome of Chinese Cabbage

SHEN Shu-xing^{1,2}, HOU Xi-lin^{1*}, and FU Ya-li³

(¹ State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ² College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001, China; ³ Shijiazhuang Academy of Agricultural Science, Shijiazhuang 050041, China)

Abstract: In order to research the effect of addition or dropping of satellite chromosome on the photosynthetic characteristics of Chinese cabbage, the satellite chromosome monosome (sat-monosome), diploid and trisome (sat-trisome) of Chinese cabbage were used to examine the chlorophyll content, Hill reaction activity, photosynthetic rate (Pn), diurnal variation and Rubisco activity etc. The result showed that the addition or dropping of sat-chromosome had a positive effect on chlorophyll content and a negative effect on chl. a/b. The addition or dropping of sat-chromosome had a negative effect on the photosynthetic rate (Pn). The curves of diurnal change of Pn of trisome and diploid were similar, all showed typical two peaks and showed conspicuous ‘noon sleep’. The decline of Hill reaction activity and Rubisco activity were the direct factors resulting in low photosynthetic rate of sat-monosome and sat-trisome. The results helped to realize the function of sat-chromosome of Chinese cabbage and high-photosynthetic efficiency breeding using the chromosome engineering.

Key words: Chinese cabbage; Chromosome; Chromosome addition; Monosome; Trisome; Photosynthesis; Chromosomal engineering

收稿日期: 2007-07-09; 修回日期: 2007-08-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270915, 39970517, 30471182); 河北省自然科学基金项目 (C020210); 河北农业大学将帅计划项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: hxl@njau.edu.cn)

高光效育种,即通过提高农作物的光合作用效率来提高产量水平,一直是光合作用研究和作物育种等领域专家关注的热点。

研究表明,在产量水平已相当高的前提下,采用常规育种进一步提高产量和品质的难度很大。而通过染色体工程等生物技术改善作物光合生理生化过程,提高作物的光合生产力,进而实现高光效遗传改良将成为进一步增加产量和品质的重要途径(胡延吉和赵檀方,1995)。但这需要把光合特性同核质基因组联系在一起进行研究,明确遗传背景对光合作用的效应,有关这方面的研究在小麦上已有报道(彭远英等,2005;李小娟等,2006)。在大白菜上的研究主要集中在外部环境条件对光合作用的影响(张振贤等,1993,1994;魏珉等,1998),关于大白菜核基因对光合作用影响的系统研究尚未见报道。

本研究以大白菜随体染色体单体(缺少一条随体染色体)、三体(多一条随体染色体)及其二倍体为试材,从染色体水平上较系统地开展随体染色体对光合作用影响的研究,以期利用染色体工程创建大白菜高光效种质和开展高光效育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及取样

试验于2002~2003年在河北农业大学园艺基地和实验室进行。

供试材料为本实验室从一个纯合基因型材料获得的大白菜随体单体株系9405-15(含1条随体染色体)、随体三体株系9405-11(含3条随体染色体),以相应的二倍体株系(即双体,含两条随体染色体)为对照。

将供试材料的试管苗于2002年12月份接种到生根培养基($1/2\text{ MS} + 0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{NAA} + 3\%$ 蔗糖 + 0.7% 琼脂)上,待根长 $0.5 \sim 1\text{ cm}$ 时经炼苗后,于2003年春季1月份栽入阳畦春化,3月中旬定植到露地,各株系定植 $30 \sim 40$ 株,常规管理。

本试验选取初花期从上数第4~5片功能叶用于光合特性的测定。

1.2 测试指标及方法

1.2.1 叶绿素含量的测定

采用混合液法测定(沈伟其,1988)。将大白菜叶片剪碎,浸入到酒精:丙酮:水 = $4.5:4.5:1$ 混合液中,密封避光条件下,待叶组织变白后,用752型分光光度计在波长645和663 nm下比色测定。

1.2.2 希尔反应活性的测定

叶绿体活性用叶济宇的希尔反应活力的分光光度法测定(薛应龙,1985)。反应体系的组成为 $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{Tris-HCl}$ ($\text{pH } 7.6$) 0.1 mL , $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{MgCl}_2$ 0.1 mL , $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 0.1 mL , $0.01\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.1 mL , 叶绿体悬浮液 $100 \sim 200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 0.1 mL 和 H_2O 0.5 mL 。分照光和暗对照两组,经过照光后,用10%的三氯乙酸终止反应。离心,取上清液作 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 分析。用752型分光光度计在波长520 nm处比色测定。

1.2.3 净光合速率和光合速率日变化的测定

净光合速率(P_n)采用英国PP-Systems公司生产的Ciras-2型便携式光合系统测定。在大白菜植株生长的初花期,选晴天上午进行净光合速率的测定;光合速率日变化也选择晴天进行,从7:00~18:00,每隔1 h测定1次。

1.2.4 RuBP羧化酶活性的测定

采用分光光度法测定NADH的氧化量来计算(李合生等,2000)。反应液含 $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{Tris-HCl}$ ($\text{pH } 7.8$), $12\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{MgCl}_2$, $0.4\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{EDTA}$, $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NADH}$, $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

ATP, 50 mmol · L⁻¹ 磷酸肌酸, 0.2 mol · L⁻¹ NaHCO₃, 25 mmol · L⁻¹ RuBP, 16 单位磷酸肌酸激酶, 160 单位磷酸甘油酸激酶, 160 单位磷酸甘油醛脱氢酶, 酶提取液 100 μL, 反应液总体积为 3 mL。未加 RuBP 前充分摇匀, 以蒸馏水为空白, 加入 100 μL RuBP 于比色杯后, 立即于 340 nm 波长下测定光密度的减少值。

1.2.5 可溶性蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝 G-250 法测定 (李合生 等, 2000)。

2 结果与分析

2.1 随体单体、三体 and 二倍体叶绿素含量的比较

叶绿素是包含在光合器官中最典型的色素。从表 1 可以看出, 初花期随体单体和三体的叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均显著或极显著高于二倍体, 但叶绿素 a/b 的比值却极显著低于二倍体。这表明, 缺失或附加一条随体染色体对叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量都有正效应, 并且对叶绿素 b 含量增加的效应大于对叶绿素 a 含量增加的效应。

2.2 随体单体、三体 and 二倍体的希尔反应活力比较

对初花期 3 个株系的功能叶希尔反应活性测定结果 (表 1) 可以看出, 随体单体和三体的希尔反应活性显著低于二倍体, 分别比二倍体降低 43.3% 和 31.7%。说明缺失或附加一条随体染色体都不利于希尔反应的进行, 并表现出负效应, 且缺失一条随体染色体对希尔反应的影响更大。三者的希尔反应活性高低与其净光合速率的比较结果一致。因此认为随体单体和三体光合速率低的原因之一是其希尔反应活性低所致。

表 1 大白菜随体单体、三体、二倍体的叶绿素含量和希尔反应活性

Table 1 The chlorophyll content and Hill reaction vitality of monosome, trisome and diploid of Chinese cabbage

株系 Lines	Chl. a (mg · g ⁻¹ FM)	Chl. b (mg · g ⁻¹ FM)	Chl. (a + b) (mg · g ⁻¹ FM)	Chl. a/b	希尔反应活性 Hill reaction vitality (μmol · L ⁻¹ · mg ⁻¹ · h ⁻¹)	与二倍体相比 Compared to diploid (%)
随体单体 Monosome	0.543a	0.202aA	0.745aA	2.69bB	38.8b	-43.3
随体三体 Trisome	0.512a	0.186aA	0.699aAB	2.75bB	46.7b	-31.7
二倍体 Diploid	0.424b	0.141bB	0.565bB	3.01aA	68.4a	-

注: a, b, c 表示 5% 显著性差异; A, B, C 表示 1% 显著性差异。下表同。

Note: a, b, c show significant difference at $P < 0.05$; A, B, C show significant difference at $P < 0.01$. The same below.

2.3 随体单体、三体 and 二倍体的净光合速率比较

在自然栽培条件下, 对生殖生长阶段初花期的大白菜 3 个株系种株的功能叶叶片的光合速率测定结果 (表 2) 可以看出, 3 个株系间光合速率存在着一定的差异。随体单体和三体的净光合速率都不同程度的低于对照二倍体, 分别比对照降低了 16% 和 11%。说明缺失或附加一条随体染色体对植株光合作用都有不同程度的负效应, 而且缺失比附加一条随体染色体对初花期大白菜的光合速率负面影响更大。

表 2 大白菜随体单体、三体、二倍体的净光合速率比较

Table 2 The photosynthetic rate of monosome, trisome, diploid of Chinese cabbage

株系 Lines	光照强度 PAR (μmol · m ⁻² · s ⁻¹)	气温 Air temperature (°C)	CO ₂ 浓度 CO ₂ concentration (μL · L ⁻¹)	光合速率 Pn (μmol · m ⁻² · s ⁻¹)
随体单体 Monosome	1 200	27.8	400	16.8b
随体三体 Trisome	1 210	28.0	400	17.8ab
二倍体 Diploid	1 180	27.3	402	20.0a

2.4 随体单体、三体和二倍体光合速率日变化的比较

初花期, 对3个株系的功能叶叶片的净光合速率的日变化测定结果(图1)可以看出, 3个株系的净光合速率日变化均呈不对称双峰曲线, 这与张振贤等(1994)、魏珉等(1998)在大白菜光合作用日变化的研究结果相一致。双峰曲线的峰值分别出现在上午10:00和下午16:00。第1个峰值, 随体单体、三体和二倍体的光合速率分别为15.3、18.2和22.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 第2个峰值光合速率分别为11.5、9.7和14.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 第1个峰值大于第2个峰值。

随体三体和二倍体均有明显的“午休”现象, 但随体单体的“午休”现象不明显。植物的光合“午休”现象是受生物节律(生物钟)调节和控制的一种生物学现象, 是对晴天午后高温、强光照环境的一种适应性表现(刘文革等, 2003)。随体单体在中午高温强光条件下, “午休”现象不明显, 说明其对光的反应不敏感。

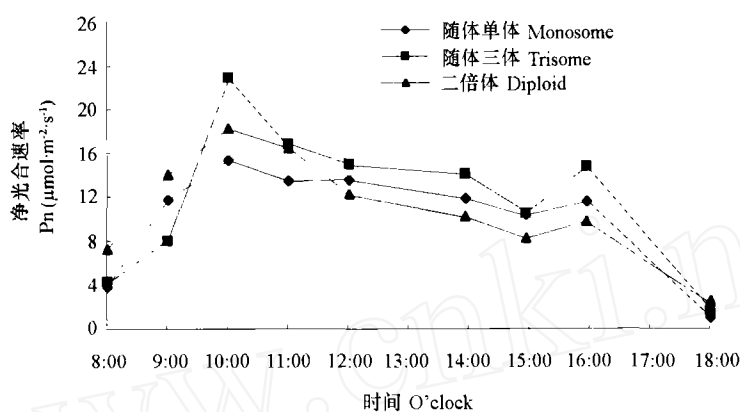


图1 随体单体、二倍体和随体三体净光合速率日变化

Fig. 1 Diurnal variation of Pn of monosome, diploid and trisome

2.5 随体单体、三体和二倍体的可溶性蛋白含量、Rubisco 活性及其比活性

前人研究表明: 叶片中的可溶性蛋白主要是酶类, 其中 RuBP 羧化酶占可溶性蛋白总量的 50%, 叶片中可溶性蛋白含量大体上能反映 Rubisco 含量的水平 (Kawashima & Wildman, 1970; Dean & Leech, 1982)。对随体单体、三体和二倍体功能叶叶片的可溶性蛋白质含量和 Rubisco 活性进行测定, 结果(表3)可以看出, 随体单体、三体可溶性蛋白含量略低于二倍体, 但差别不显著, 即随体单体和三体在 Rubisco 含量上没有差异, 而二者的 Rubisco 活性显著低于二倍体。

表3 大白菜随体单体、三体、二倍体功能叶可溶性蛋白和 RuBP 羧化酶活性

Table 3 Soluble protein and RuBP case activity of monosome, trisome, diploid of Chinese cabbage

株系 Lines	RuBP 羧化酶活性 RuBPcase activity ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	可溶性蛋白含量 Soluble protein content ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$)	RuBP 羧化酶比活性 RuBPcase specific activity ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
随体单体 Monosome	0.091b	5.47a	0.333b
随体三体 Trisome	1.047b	5.65a	0.371b
二倍体 Diploid	1.399a	5.72a	0.489a

3 讨论

张荣铨等(1995)研究带有 *Rht3* 基因的 4B 染色体双体、单体、缺体三种小麦的光合特性, 发现带有 *Rht3* 基因的 4B 染色体对叶绿素含量、光合速率、RuBP 羧化酶含量及活性、叶片导度均有正

效应并具有累加作用。而本试验对于带有不同数目随体染色体的单体、三体和二倍体的大白菜来说, 其光合速率并不存在类似的基因剂量效应, 而是都不同程度的低于二倍体。这说明随体染色体上不带有与光合作用直接相关的基因。而是通过间接影响光合作用相关基因的表达来对大白菜的光合作用产生作用。

叶绿素是光合作用中最重要的色素分子。从本试验的结果来看, 随体单体和三体的叶绿素含量都不同程度的高于二倍体, 但光合速率却低于二倍体。蒋观敏等(2000)在比较同源四倍体与二倍体高粱的生理特性方面时指出, 旗叶期的四倍体叶片叶绿素含量高于二倍体, 而光合速率却低于二倍体。同时指出, Chl. a/b 值均表现出四倍体小于二倍体。本试验中也得出类似的结果。因此, 我们认为当叶绿素含量超过光合作用的需要量时, Chl. a/b 值可能成为影响光合作用的一个重要的内在因子。

高等植物中, Rubisco 由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成, 大亚基由叶绿体基因编码, 而小亚基由核基因编码, 在细胞核中转录成 RNA 后, 在胞质中翻译形成 Rubisco 小亚基前体, 运入叶绿体后切去前导肽, 同时还需一个由核基因编码的 Rubisco 亚基结合蛋白, 将大小亚基结合后, 形成 Rubisco 全蛋白。核基因是 RuBP 羧化酶量的主要控制者(李小娟等, 1999)。因为随体单体、三体和二倍体在酶蛋白量上没有明显差异, 因此, 认为编码 Rubisco 小亚基和 Rubisco 亚基结合蛋白的基因可能不在随体染色体上。而随体单体和三体的 Rubisco 活性显著低于二倍体, 说明造成随体单体和三体光合速率降低的原因与 Rubisco 含量的关系很小, 而与 Rubisco 比活性的降低有关, 即与单位质量酶蛋白的活性下降有关。

另外, Rubisco 活性的发挥受很多因素(环境因子和植物体内生理因子)的影响, Rubisco 活化酶在 Rubisco 的活性调节上发挥着很大的作用, Rubisco 活化酶也是一种由核基因编码的酶蛋白, 因此, 可能随体染色体数量的变化打破了基因间的协调(其上可能有与编码 Rubisco 活化酶的基因相关的基因或基因片段), 从而影响了 Rubisco 活化酶的活化功能, 使 Rubisco 活性降低, 光合速率下降。

References

- Dean C., Leech R M. 1982. Genome expression during normal leaf development I: Direct correlation between ribulose biphosphate carboxylase content and nuclear ploidy in a polyploid series of wheat. *Plant Physiology*, 70; 1605 - 1608.
- Hu Yan-ji, Zhao Tan-fang. 1995. The inheritance and improvement potential of photosynthesis in common wheat. *Scientia Agricultura Sinica*, 28 (Supplement): 14 - 21. (in Chinese)
- 胡延吉, 赵檀方. 1995. 小麦光合作用的遗传和改良潜力的初步研究. *中国农业科学*, 28 (增刊): 14 - 21.
- Jiang Guan-min, Luo Yao-wu, Li Ji-hao. 2000. Biological and physiological features of male sterile and maintenance lines of autotetraploid sorghum. *Acta Agronomica Sinica*, 26 (4): 444 - 448. (in Chinese)
- 蒋观敏, 罗耀武, 李皓浩. 2000. 同源四倍体高粱不育系和保持系的生物学及生理特性研究. *作物学报*, 26 (4): 444 - 448.
- Kawashima N, Wildman S G. 1970. Fraction I protein. *Annual Review Plant Physiology*, 21: 325 - 328.
- Li He-sheng, Sun Qun, Zhao Shi-jie. 2000. The experimental principle and technique in plant physiology and biochemistry. Beijing: Higher Education Press; 138 - 141. (in Chinese)
- 李合生, 孙群, 赵世杰. 2000. 植物生理生化试验原理和技术. 北京: 高等教育出版社: 138 - 141.
- Liu Wen-ge, Yan Zhi-hong, Wang Ming. 2003. The study on diurnal variation of photosynthesis in watermelon with different ploidies. *Chinese Watermelon and Melon*, (2): 4 - 6. (in Chinese)
- 刘文革, 阎志红, 王鸣. 2003. 不同染色体倍性西瓜光合速率日变化的研究. *中国西瓜甜瓜*, (2): 4 - 6.
- Li Xiao-juan, Lan Lan, Li Yan-ming, Xiao Kai. 2006. Studies on the parameters of energy exchange of photosynthesis for different ditelosomic lines of B genome in wheat flag leaves. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 21 (5): 9 - 12. (in Chinese)
- 李小娟, 蓝岚, 李雁鸣, 肖凯. 2006. 小麦 B 染色体组双端体旗叶光合能量转换参数的研究. *华北农学报*, 21 (5): 9 - 12.
- Li Xiao-juan, Zhao Yu-xin, Xiao Kai, Li Yan-ming. 1999. Preliminary studies on the photosynthetic characteristics of different ditelosomic lines

- of B genome. *Henan Science*, 17: 35–38. (in Chinese)
- 李小娟, 赵玉新, 肖 凯, 李雁鸣. 1999. 小麦 B 染色体组双端体光合性能的初步研究. *河南科学*, 17: 35–38.
- Peng Yuan-ying, Peng Zheng-song, Song Hui-xing. 2005. Chromosomal location of the genes associated with photosynthesis of *Lophopyrum elongatum* (Host) A. Löve in Chinese spring background. *Scientia Agricultura Sinica*, 38 (11): 2182–2188. (in Chinese)
- 彭远英, 彭正松, 宋会兴. 2005. 小麦中国春背景下长穗偃麦草光合作用相关基因的染色体定位. *中国农业科学*, 38 (11): 2182–2188.
- Shen Wei-qi. 1988. Extraction of mixed solution for determination of chlorophyll content in rice leaf blade. *Plant Physiology Communications*, (3): 62–64. (in Chinese)
- 沈伟其. 1988. 测定水稻叶片叶绿素含量的混合液提取法. *植物生理学通讯*, (3): 62–64.
- Wei Min, Wu Shu-yun, Zhang Qi-pei. 1998. Photosynthetic characteristics in seed plants of Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 25 (2): 159–164. (in Chinese)
- 魏 珉, 吴淑芸, 张启沛. 1998. 大白菜小株采种种株的光合特性. *园艺学报*, 25 (2): 159–164.
- Xue Ying-long. 1985. Plant physiological experiment manual. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press: 108–109. (in Chinese)
- 薛应龙. 1985. 植物生理实验手册. 上海: 上海科学技术出版社: 108–109.
- Zhang Rong-xian, Lu Jing-jie, Ma Guo-ying, Wu Yuan-ying, Fang Min. 1995. Effects of *Rht3* gene and 4B-chromosome with *Rht3* on photosynthetic carbon-assimilation of wheat. *Acta Genetica Sinica*, (4): 264–271. (in Chinese)
- 张荣铄, 陆京杰, 马国英, 吴源英, 方 敏. 1995. *Rht3* 基因及带有 *Rht3* 基因的 4B 染色体对普通小麦光合碳同化特性的影响. *遗传学报*, (4): 264–271.
- Zhang Zhen-xian, Liang Shu-hua, Chen Li-ping. 1994. The study on diurnal variation of photosynthesis and noon break in Chinese cabbage. *Acta Botanica Sinica*, 36 (Supplement): 97–101. (in Chinese)
- 张振贤, 梁书华, 陈利平. 1994. 田间大白菜光合速率日变化与“午睡”现象的研究. *植物学报*, 36 (增刊): 97–101.
- Zhang Zhen-xian, Zheng Guo-sheng, Zhao De-wan. 1993. Study on the characteristics of photosynthesis in Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 20 (1): 38–44. (in Chinese)
- 张振贤, 郑国生, 赵德婉. 1993. 大白菜光合作用特性的研究. *园艺学报*, 20 (1): 38–44.



《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的专业性学术期刊, 全国优秀农业期刊。该刊为中国科技核心期刊、中国科学引文数据库来源期刊、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊, 被多种国内重要数据库收录。据中国期刊引证研究报告统计, 2006 年度影响因子达 0.872。

报道内容为大田、园艺、药用植物, 林用植物, 草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如, 种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新、信息学、管理学等; 起源、演化、分类等系统学; 基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

季刊, 大 16 开本, 128 页。定价 20 元, 全年 80 元。各地邮局发行, 邮发代号: 82-643。国内刊号 CN11-4996/S, 国际统一刊号 ISSN1672-1810。本刊编辑部常年办理订阅手续, 如需邮挂每期另加 3 元。

地 址: 北京市中关村南大街 12 号, 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部;

邮 编: 100081; 电话: 010-62180257, 62180279 (兼传真);

E-mail: zwyzyxb2003@163.com; zwyzyxb2003@sina.com。