

芥菜型油菜叶片黄化突变体的初步研究

李 玮,于澄宇,胡胜武

(西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了揭示芥菜型油菜叶片黄化突变体的黄化机理,通过田间统计、叶绿素测定和同工酶分析,初步研究了芥菜型油菜叶片黄化突变体 L638-y 的生物学特性。结果表明,与原始材料 L638-g 相比,黄化突变体 L638-y 的子叶宽度、株高、一次分枝数、单株产量均减少,始花期推迟 1 d,生育期减少 1 d,说明叶片黄化突变对植株发育的进度影响较大;黄化突变体 L638-y 的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量均明显降低,特别是叶绿素 b 含量锐减,说明突变影响了叶绿素 a 向叶绿素 b 的转变;黄化突变体 L638-y 与原始材料 L638-g 叶片的过氧化物酶和酯酶同工酶的条带数目以及条带亮度均无明显差异。提示芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 可能为缺总 Chl 型,导致叶片缺绿的原因因为叶绿素代谢异常。

[关键词] 芥菜型油菜;黄化突变体;叶绿素;同工酶

[中图分类号] S565.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)09-0079-04

Primary investigation on a chlorosis mutant in *Brassica juncea* L.

LI Wei, YU Cheng-yu, HU Sheng-wu

(College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to reveal the mechanism of chlorosis mutant, the characteristics of chlorosis mutant in *Brassica juncea* L. was primarily studied by field investigation, determination of chlorophyll content and analysis of zymogram. Compared with the wild type L638-g, the width of cotyledon, plant height, the number of the primary branches and yield per plant of the chlorosis mutant all reduced. The mutant bloomed one day later, but life time reduced by one day, which indicated that the chlorosis mutant had a large influence on plant development. The content of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoid in the leaves of the mutant plants decreased, especially the content of chlorophyll b decreased sharply, which showed the mutation had influence on the transform action from chlorophyll a to chlorophyll b. No obvious difference of the zymogram of peroxidase and esterase isozyme was observed between the mutant and the wild type. In summary, the chlorosis mutant in *Brassica juncea* L. probably belonged to one of the total chlorophyll deficient mutants.

Key words: *Brassica juncea* L.; chlorophyll-reduced mutant; chlorophyll; isozyme

绿色植物叶片黄化现象在自然界中比较普遍,通过人工诱变的方法也能得到叶片黄化突变植株。叶片黄化突变体是研究光合作用的有用工具,到目前为止,已对小麦^[1-3]、拟南芥^[4-5]、玉米^[6]、烟草^[7]、

大豆^[8]、水稻^[9]、大麦^[10-11]等植物材料的叶绿素缺失突变体进行了研究,探讨了其光合作用机制及突变对光合作用的影响。在油菜方面,董遵等^[12]用氮离子处理甘蓝型油菜种子获得失绿黄化而后复绿的突

[收稿日期] 2006-08-15

[基金项目] 西北农林科技大学科研骨干支持计划项目

[作者简介] 李 玮(1982-),男,陕西蓝田人,在读硕士,主要从事油菜杂种优势利用研究。E-mail:davidlee5@163.com

[通讯作者] 胡胜武(1966-),男,陕西柞水人,博士、教授、博士生导师,主要从事油菜遗传育种研究。

E-mail:swhu8325@yahoo.com.cn

变体,发现该突变体发黄是因为叶绿素减少,而且叶绿素 a 和叶绿素 b 在失绿和复绿过程中消长不同步;突变体叶绿体内膜结构已解体,但捕光叶绿素 a/b 蛋白的复合体仍存在,并保持了光合功能。该突变体的失绿和复绿是属于阶段性反应还是受温度影响,目前尚无定论。大量研究表明^[13-16],幼叶黄化突变材料 Cr3529 的黄化突变性状由一对隐性基因控制,当基因杂合时,对杂种植株的产量和抗性无明显负面影响,可作为标记性状用于油菜杂种优势利用;与野生型油菜 3529 相比,黄化突变体 Cr3529 幼苗中全蛋白、HLC 和叶绿素含量较少,Chl a/Chl b 却较高,推测突变体中 Chl a → Chl b 转化效率降低,导致 Chl b 的含量下降;HLC 组成没有变化,色素缺乏影响了 HLC 含量;较少的基粒片层数可能是引起 Cr3529 油菜叶绿素含量减少,并最终导致植株显著减产的重要原因;分子生物学研究表明^[17],Cr3529 可能与拟南芥黄化突变体 *Pp1l* 具有不同的分子突变机理。

2002 年春季,本课题组首次在芥菜型油菜品系 L638-g 中发现几株叶片发生黄化突变的天然植株,该黄化突变无致死效应。本研究以该类芥菜型油菜叶片黄化突变体为材料,初步研究其生物学特征,旨在为揭示其黄化突变机理,探索其在油菜杂优育种中的利用潜力奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

芥菜型油菜叶片黄化突变系 L638-y 为本课题组选育,对照为选育出该突变系的原始材料 L638-g。仪器包括:上海精密科学仪器有限公司生产的 722N 型可见分光光度计和北京市六一仪器厂生产的 DYY-10C 型电泳仪。

1.2 试验处理

于 2005-09-16 在陕西杨凌西北农林科技大学农作二站试验地,直播芥菜型油菜突变材料 L638-y 自交 3 代的株系及原始材料 L638-g,一般田间管理。在苗期、始花期和成熟期分别统计芥菜型油菜黄化突变体与原始材料的子叶宽度、冻死率、始花期、生育期、株高、一次分枝数、单株产量。

2006-03-20 日分别随机选择 10 株突变株和原始材料,收获大小相同叶片,一部分用于叶片色素(叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素)含量的测定,另一部分用于过氧化物酶和酯酶同工酶的分析。

1.3 测定方法

叶片色素含量测定参考文献[18]的方法,用 722N 可见分光光度计测定。同工酶电泳参考文献[19-20]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 的生物学性状

芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 出苗后,子叶即出现黄化现象,植株生长缓慢(图 1),幼苗叶片几乎完全黄化,株型较小,冬季低温下仍然具有黄化现象,但老叶叶色较深,在抽苔初期幼嫩叶片黄化现象比较明显,苔茎后期逐渐恢复正常叶色,在始花期叶片和花蕾还会再度出现局部轻度黄化,花瓣颜色较浅,随后整个植株恢复正常。从整体来看,芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 的子叶、幼嫩叶片、茎干、花蕾等器官容易发生黄化,而随着器官发育成熟,色素含量能够恢复正常。



图 1 芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 的子叶及幼叶
A. 原始材料 L638-g; B. 黄化突变体 L638-y

Fig. 1 Young leaves and cotyledons of the chlorosis mutant in *Brassica juncea* L.

A. Wild type L638-g; B. Chlorosis mutant L638-y

从表 1 可以看出,芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 的子叶宽度、株高、一次分枝数、单株产量与原始材料 L638-g 相比均减少。一般而言,叶片黄化对抗冻性有影响,原始材料 L638-g 为北方冬性芥菜型油菜,冬季心叶生长点下陷,抗冻性很强。在本试验条件下,黄化突变体 L638-y 和原始材料 L638-g 的越冬冻死率均很低,分别为 2.2% 和 2.1%,这可能是因为二者的抗冻性差异未能完全表现出来所致。芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 的始花期较原始材料 L638-g 推迟 1d,生育期却比原始材料 L638-g 减少 1d。说明叶片黄化对植物发育的进度影响较大,而且对产量形成不利,具有较大负作用,但不具有致死效应,仍然具有一定的生产能力,在遗传育种

上可能具有一定的实用价值。

表 1 芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 与原始材料 L638-g 生物学性状的比较

Table 1 Comparison of biological traits between the chlorosis mutants and the wild type L638-g

材 料 Material	子叶宽度/ mm Width of cotyledon	冻死率/ % Percentage of death from freezing	始花期/ d Initiation of anthesis	生育期/ d Life time	株高/ cm Plant height	一次分枝数 No. of Primary branches	单株产量/ g Yield per plant
黄化突变体 L638-y Chlorosis mutant L638-y	5.7	2.2	204	245	161	13.0	6.2
原始材料 L638-g Wild type L638-g	8.2	2.1	203	246	175	13.4	8.8

2.2 芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 叶片叶绿素含量的变化

从表 2 可以看出,与原始材料 L638-g 相比,黄化突变体 L638-y 叶片的叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均大幅度降低,分别为原始材料的 0.34 和 0.19 倍。叶绿素 a / 叶绿素 b 明显升高,为原始材料 L638-g 的 1.69 倍。虽然黄化突变体叶片中叶绿素 a 和 b 的含量均减少,但叶绿素 b 含量的减少比例大于叶绿素 a,两者减少比例不同步,说明突变可能使叶绿素 a 合成叶绿素 b 的过程受阻。与原始材料 L638-

g 相比,黄化突变体 L638-y 叶片的类胡萝卜素含量也明显降低,为原始材料的 0.38 倍,但其降低不会引起叶片黄化。原始材料 L638-g 和黄化突变体 L638-y 的叶片叶绿素 (a + b)/ 类胡萝卜素分别为 3.12 和 2.64,差异较小,可知叶绿素 (a + b) 和类胡萝卜素含量在二者叶片中的比例基本一致。综上所述,芥菜型油菜黄化突变体叶片变黄的主要原因是叶绿素含量减少,特别是叶绿素 b 含量锐减。推测叶绿素 b 含量锐减的原因为突变影响了叶绿素 a 向叶绿素 b 的转变。

表 2 芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 与原始材料 L638-g 叶片色素含量的比较

Table 2 Comparison of the content of pigments between the mutant and the wild type foliage

材 料 Material	叶绿素 a/ (mg · g ⁻¹) Content of chlorophyll a	叶绿素 b/ (mg · g ⁻¹) Content of chlorophyll b	类胡萝卜素/ (mg · g ⁻¹) Content of carotenoid	叶绿素 a/ 叶绿素 b Chlorophyll a/ b	叶绿素 (a + b)/ 类胡萝卜素 Chlorophyll (a + b)/ carotenoid
原始材料 L638-g Wild type L638-g	0.945	0.126	0.343	7.50	3.12
黄化突变体 L638-y Chlorosis mutant L638-y	0.318	0.025	0.130	12.7	2.64

2.3 芥菜型油菜叶片黄化突变体 L638-y 叶片同工酶的电泳结果

L638-g 叶片的过氧化物酶和酯酶同工酶电泳结果如图 2 所示。

芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 与原始材料

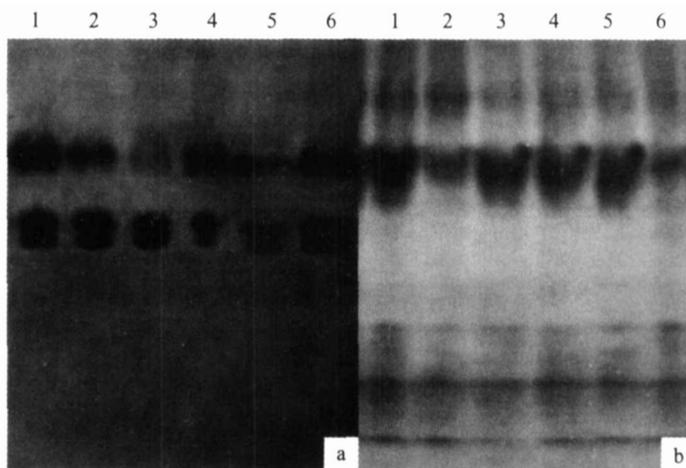


图 2 芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 与原始材料 L638-g 的过氧化物酶 (a) 和酯酶同工酶 (b) 酶谱

1,3,5. 黄化突变体 L638-y; 2,4,6. 原始材料 L638-g

Fig. 2 Zymogram of Peroxidase (a) and Esterase (b) of the chlorosis mutant and the wild type foliages

1,3,5. Chlorosis mutant L638-y; 2,4,6. Wild type L638-g

从图 2 可以看出,黄化突变体 L638-y 和原始材料 L638-g 的两种酶分别出现了 4 条和 10 条条带,条带总数以及亮度均无明显差异,说明叶绿体黄化对这两种同工酶的表达无明显影响。

3 讨 论

本研究结果表明,芥菜型油菜叶片黄化突变体 L638-y 叶片叶绿素 a 和 b 的含量均大幅度降低,且叶绿素 b 含量的减少比例大于叶绿素 a,这与董遵等^[12]和 Zhao 等^[15]对甘蓝型油菜黄化突变体的研究结果基本相似;黄化突变体 L638-y 的子叶、幼嫩叶片、茎干、花蕾等器官容易发生黄化,但随着器官发育成熟,色素含量能够恢复正常。这与 Zhao 等^[15]用中子和硫酸二乙酯复合处理得到的甘蓝型油菜幼叶黄化突变体 Cr3529 相似,而与董遵等^[12]通过氮离子处理得到的甘蓝型油菜黄化突变体表现不同。董遵等^[12]得到的黄化突变体只在苗期出现黄化,持续时间为 7~10 d。小麦返白系也存在与温度的互作现象^[1],这种黄化恢复现象是否还与特定发育时期的温度、光照等气候条件相关,值得进一步深入研究。

目前已发现的色素突变体大多数为缺总 Chl 型或 Chl b 型^[21]。本研究中,与原始材料 L638-g 相比,黄化突变体 L638-y 叶片的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量均明显降低,叶绿素(a+b)/类胡萝卜素变化不大。这个突变体可能为缺总 Chl 型,导致叶片缺绿的原因因为叶绿素代谢异常。董遵等^[12]和 Zhao 等^[13]用诱变方法得到的甘蓝型油菜叶片黄化突变材料,可能也属于缺总 Chl 型。

叶色突变在遗传学上称花斑(variegation),诱发原因除生理因素,如病虫害、冷害、缺素之外,在遗传方面,如核基因、核质基因互作、单纯叶绿体基因和线粒体基因均可以直接或间接影响叶绿体色素形成。本研究的芥菜型油菜黄化突变体 L638-y 已经稳定遗传 4 代,黄化突变体和其他正常材料正反杂交, F₁ 代的叶色均正常,因此该黄化突变可能由隐性核基因单独或者与细胞质互作控制,而不是单纯细胞质遗传。

Zhao 等^[13]研究表明,油菜幼叶黄化突变体 Cr3529 与正常野生型油菜相比,其株高、分枝数、单株角果数、角粒数、单株产量等性状显著降低,不能直接用于生产;而当黄化性状基因突变 Cr 或者与之紧密连锁的基因处于杂合状态时,对杂种 F₁ 的产量和抗病性无负作用,因此提出利用该黄化性状

(Cr) 作为苗期标记性状生产油菜杂交种的设想,并得到实践证明。本研究中,芥菜型油菜叶片黄化突变体不具有致死效应,仍然具有一定的生产能力,在遗传育种上可能具有实用价值。如果进一步遗传分析证实该黄化突变由隐性核基因控制,可以按照 Zhao 等^[13]的策略把该基因导入到雄性不育材料中,选育具有黄化标记性状的雄性不育系,用这个雄性不育系作为母本生产杂交种,可以在子叶期根据黄化标记统计母本自交率,鉴定种子遗传纯度,减少推广杂交种的风险。因此,该芥菜型油菜叶片黄化突变体的发现,将拓宽油菜杂交种选育可利用的苗期标记性状,为研究植物光合作用提供有用材料。

[参考文献]

- [1] Luo P G, Ren Z L. Wheat leaf chlorosis controlled by a single recessive gene[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2006, 32(3): 330-338.
- [2] 杨 莉, 郭霭光, 关 旭. 小麦突变体返白系返白阶段叶绿体超微结构变化研究[J]. 西北农业学报, 2003, 12(4): 64-67.
- [3] 曹 莉, 王 辉, 孙道杰, 等. 小麦黄化突变体光合作用及叶绿素荧光特性研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(10): 2083-2087.
- [4] Jarvis P, Chen L J, Li H, et al. An *Arabidopsis* mutant defective in the plastid general protein import apparatus[J]. Science, 1998, 282: 100-103.
- [5] Rodermeil S. *Arabidopsis* variegation mutants[EB/OL][2006-08-15]. <http://www.bioone.org/perlserv/?request=getdocument&issn=1543-8120&volume=30&issue=1&page=1>
- [6] Greene B A, Allred D R, Morishige D T, et al. Hierarchical response of light harvesting chlorophyll-proteins in a light-sensitive chlorophyll b deficient mutants of maize[J]. Plant Physiology, 1988, 87: 357-362.
- [7] Bae C H, Abe T, Matsuyama T, et al. Regulation of chloroplast gene expression is affected in ali, a novel tobacco albino mutant[J]. Annals of Botany, 2001, 88(4): 545-553.
- [8] Xu D Q, Chen X M, Zhang L X, et al. Leaf photosynthesis and chlorophyll fluorescence in a chlorophyll-deficient soybean mutant[J]. Photosynthetica, 1993, 29(1): 103-112.
- [9] 黄晓群, 赵海新, 董春林, 等. 水稻叶绿体合成缺陷突变体及其生物学研究进展[J]. 西北植物学报, 2005, 25(8): 1685-1691.
- [10] 成 英, 汤泽生, 王祖秀, 等. 叶绿素缺乏的大麦突变体的生理与遗传研究[J]. 四川师范学院学报: 自然科学版, 2001, 22(2): 131-133, 138.
- [11] 林宏辉, 杜林芳, 贾永炯, 等. 野生和黄化大麦类囊体膜色素蛋白的分离和比较[J]. 西北植物学报, 1997, 17(1): 34-38.
- [12] 董 遵, 刘敬阳, 马红梅, 等. 甘蓝型油菜黄化(苗)突变体的叶绿素含量及超微结构[J]. 中国油料作物学报, 2000, 22(3): 27-29, 34.

(下转第 89 页)

效应并不普遍存在。林建荣等^[10-11]研究表明,杂交粳稻品质性状中的糙米率、糙米长宽比、糙米长厚比均受母体遗传效应和种子直接遗传效应的控制。吕文彦等^[12-13]通过对常规粳稻品种的研究认为,根据种子基因型对糙米率选择最为有效,垩白面积的母体加性方差最大,所以根据种子鉴定的结果对母体基因型选择具有较高效率,垩白率的直接加性方差与母体加性方差均较大,说明种子基因型与植株基因型均对其有较大影响。本研究结果表明,杂交粳稻的整精米率、垩白率、透明度3个品质性状均以种子直接加性方差为主,糙米率、精米长宽比、精米长厚比均以种子直接显性方差为主,垩白面积性状以母体显性方差为主,在精米率中未检测出达显著水平的遗传效应,在糙米率和垩白率性状中还检测出了细胞质效应,达极显著水平,这与以上研究结果基本一致。

[参考文献]

- [1] 莫惠栋. 谷类作物胚乳品质性状遗传研究[J]. 中国农业科学, 1995, 28(2): 1-7.
- [2] 朱 军. 广义遗传模型与数量遗传分析新方法[J]. 浙江农业大学学报, 1994, 20(6): 551-559.
- [3] 朱 军. 包括基因型 × 环境互作效应的种子遗传模型及其分析方法[J]. 遗传学报, 1996, 23(1): 56-68.
- [4] 朱 军. 遗传模型分析方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [5] 石春海, 朱 军. 粳型杂交稻稻米外观品质的种子和母体遗传效应分析[J]. 北京农业大学学报, 1993, 19(增刊): 69-74.
- [6] 石春海, 朱 军. 粳稻稻米外观品质的细胞质、母体和胚乳遗传效应分析[J]. 生物数学学报, 1996, 11(1): 73-81.
- [7] 张利华, 王建军, 王林友, 等. 杂交稻稻米品质的遗传相关分析[J]. 浙江农业科学, 2003(6): 319-323.
- [8] 李 欣, 莫惠栋, 王安民, 等. 粳型杂种稻米品质性状的遗传表达[J]. 中国水稻科学, 1999, 13(4): 197-204.
- [9] 李 欣, 汤述翥, 印志同, 等. 粳型杂种稻米品质性状的表现及遗传控制[J]. 作物学报, 2000, 26(4): 411-419.
- [10] 林建荣, 吴明国, 石春海. 粳型杂交稻稻米外观品质性状的遗传效应研究[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(2): 93-96.
- [11] 林建荣, 石春海, 吴明国. 不同环境条件下粳型杂交稻稻米外观品质性状的遗传效应[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(1): 16-20.
- [12] 吕文彦, 张 鉴, 曹 萍, 等. 粳稻品质及其与产量关系的种子效应与母体效应估测[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(4): 325-328.
- [13] 吕文彦, 张 鉴, 邵国军, 等. 粳稻品质性状间及其与经济性状间的遗传相关[J]. 遗传, 2005, 27(4): 601-604.
- [13] Zhao Y, Wang M L, Zhang Y Z, et al. A chlorophyll-reduced seedling mutant in oilseed rape *Brassica napus*, for utilization in F1 hybrid production[J]. Plant Breeding, 2000, 119: 131-135.
- [14] 陈云伟. 油菜黄化突变体叶绿体发育特性研究[D]. 成都: 四川大学, 2004.
- [15] Zhao Y, Du L F, Yang S H, et al. Chloroplast composition and structural differences in a chlorophyll-reduced mutant of oilseed rape seedlings[J]. Acta Botanica Sinica, 2001, 43(8): 877-880.
- [16] 赵 云, 王茂林, 李 江, 等. 幼叶黄化油菜(*Brassica napus* L.) 突变体 Cr3529 叶绿体超微结构观察[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2003, 40(5): 974-977.
- [17] 胡远辉, 王茂林, 张年辉, 等. 幼叶黄化油菜突变体 Cr3529 中 Toc33 cDNA 的克隆和序列分析[J]. 中国农业科学, 2004, 37(8): 1198-1202.
- [18] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000: 101-103.
- [19] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 120-124.
- [20] 李殿荣, 夏永真, 王保仁. 同工酶谱分析鉴定杂交油菜秦油2号种子纯度技术研究[J]. 陕西省农垦科技“杂交油菜专辑”, 1992, 2(22): 2-8.
- [21] 郭春爱, 刘 芳, 许晓明. 叶绿素 b 缺失与植物的光合作用[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(5): 967-973.

(上接第 82 页)