

转 *rolB-pttGA20ox* 双价基因毛白杨光合特性研究

贾香楠¹, 李 伟¹, 冷青云¹, 孙立洋¹, 陈晓阳^{1,2}

(1. 北京林业大学 林木育种国家工程实验室 北京 100083; 2. 华南农业大学 林学院, 广东 广州 510642)

摘 要: 为探讨转双价基因毛白杨光合特性与规律, 以 4 个转 *rolB-pttGA20ox* 双价基因毛白杨株系和 1 个对照株系 PT-16 的 1 a 生盆栽苗为材料, 采用 Li-6400 光合测定系统对其光合作用指标进行测定, 并分析光合特性与苗木生长的相关性。结果表明: 转基因株系与对照株系的净光合速率—光响应曲线变化趋势相似, 其中 3 个转基因株系 RG-1、RG-3 和 RG-4 在各个光有效辐射下的净光合速率均高于对照; 转基因株系的光补偿点均低于对照, RG-3 和 RG-4 的光饱和点高于对照; 株系间瞬时净光合速率差异显著, 其中 RG-4 最高; 转基因毛白杨株系净光合速率与地径显著相关, 与苗高相关不显著。

关键词: 转双价基因; 毛白杨; 光合特性; 相关性

中图分类号: S 792.117 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)13-0140-04

毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)是我国特有的优良白杨派乡土树种, 栽培历史悠久、分布广泛, 具有材质

优良、抗性和适应性强等特点, 是我国北方地区常用的建筑、家具用材和造纸工业原料树种^[1]。毛白杨生产中主要为无性繁殖, 但毛白杨插条生根较难、扦插成活率低^[2-6], 很大程度上阻碍了这一优良树种的推广和产业化进程。熊瑾^[7]以转 *rolB* 基因毛白杨进行了温室扦插试验, 发现转基因毛白杨扦插成活率显著高于对照, 达到了 93.3%, 但植株出现了矮化现象。GA20-氧化酶(GA20-oxidase, GA20ox)对植物茎伸长、叶伸展有促进

第一作者简介: 贾香楠(1981-), 女, 内蒙古赤峰人, 在读博士, 研究方向为林木基因工程。Email: jiaxiangnan0616@163.com。

通讯作者: 陈晓阳(1958-), 男, 四川南充人, 教授, 博士生导师, 现主要研究方向为林木基因工程。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271097)。

收稿日期: 2010-03-09

[10] Noh H Y, Choi J S, Ahn B J. Plant regeneration through somatic embryogenesis in zoysiagrasses (*Zoysia* spp.) [J]. J Kor Soc Hort Sci, 1995, 36: 582-587.

[11] 赵昕, 李玉霖. 结缕草种子打破休眠的研究[J]. 种子, 2002(1): 22-27.

[12] 王渭霞, 胡张华, 陈锦涛, 等. 松南结缕草成熟胚愈伤组织的诱导和再

生[J]. 2006 15(3): 132-137.

[13] 柴建萍, 白兴荣, 谢道燕. 壳聚糖——一种极具开发利用价值的活性物质[J]. 云南农业科技, 2005(1): 26-27.

[14] 陈惠萍, 徐朗莱. 壳聚糖调节植物生长发育及诱发植物抗病性研究进展[J]. 云南植物研究, 2005 27(6): 613-619.

Callus Induction and Plant Regeneration from Seeds of *Zoysia japonica*

ZHANG Qi, ZHENG Li-ping, CAI Ping, JIANG Qian

(College of Architecture and Urban Environment, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123)

Abstract: With mature *Zoysia japonica* weeds explant, studied the influence of different treatment of weeds, basic medium and the addition of growth regulator and chitosan to the induction of callus and the effect of subculturing times on the plantlet regeneration. Compared on the frequency and the forms of callus, the best method to induce callus was in N6 medium, under dark condition and with the combination of 2, 4-D (4 mg/L) and chitosan (4 g/L). Under such condition, the induction frequency of callus was 100%, while the percentage of embryogenic callus was 84.4%. Regenerated plantlets with regeneration frequency 81.7% were obtained after transferring embryogenic callus to the 1/2MS medium with 2, 4-D 0.1 mg/L.

Key words: *Zoysia japonica*; embryogenic callus; regenerated plantlet; chitosan

作用^[8-9]。李伟^[10-11]首次构建了由 *rolB* 和 *pttGA20ox* 基因组成的双价植物表达载体, 并成功转化入烟草和银白杨基因组中, 研究发现 *rolB-pttGA20ox* 双价基因植株生根能力和高生长显著优于对照。辛蓓^[12]将双价基因 *rolB-pttGA20ox* 转入毛白杨优良株系 PT-16 基因组中, 对试管苗和盆栽苗的生根能力及生长研究发现转基因植株明显高于对照。

光合作用制造有机物质并释放氧气的过程, 是植物体内有机物质和能量的最终来源, 一定程度上决定着植物的生长^[13]。对杨树光合特性的研究一直是杨树遗传改良的一个重要方面, 目前国内外对杨树的光合作用进行过大量的研究^[14-20], 但对于转基因毛白杨光合特性的研究比较少见, 尤其是对转双价基因毛白杨光合特性的研究目前尚未见报道。现以 4 个转 *rolB-pttGA20ox* 双价基因毛白杨株系和 1 个对照株系 PT-16 为材料, 通过对其净光合速率、光响应规律和叶绿素的对比分析, 初步揭示了转 *rolB-pttGA20ox* 双价基因毛白杨的光合特性和规律, 为分析其光合特性与生长的关系以及转基因毛白杨的选育提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为转 *rolB-pttGA20ox* 双价基因毛白杨株系 RG-1、RG-2、RG-3、RG-4 和对照 PT-16 的 1 a 生盆栽苗。

1.2 试验方法

1.2.1 不同株系净光合速率—光响应曲线的测定 测定时间为 2009 年 6 月 15 日(晴)上午 9:00~11:00。每个株系选取 3 株, 选择同一部位、同一方向、受光量尽可能一致的完整叶片, 采用 Li-6400-02B 红蓝光源, 在光合有效辐射(PAR)为 2 000、1 800、1 600、1 400、1 200、1 000、800、600、400、200、100、50、20、0 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时分别测定净光合速率(P_n), 3 次重复。采用二次多项式形式的最小二乘法进行光响应曲线拟合, 求出光饱和点(LSP), 并将光合有效辐射在 0~200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 范围内的测定值进行直线回归分析, 求出光补偿点(LCP)和表观量子效率(AQY)。

1.2.2 不同株系瞬时净光合速率的测定 于 6 月 18 日(晴)上午 09:00~11:00, 每个株系选取 4 株, 选择同一部位、同一方向、受光量尽可能一致的完整叶片, 利用 Li-6400-02B 红蓝光源测定 5 个株系的瞬时净光合速率, 3 次重复。同时测量每个株系的苗高和地径, 以净光合速率对苗高和地径分别进行一元线性回归分析。

1.2.3 不同株系叶绿素含量的测定 取功能叶片避开

主脉, 称取 0.2 g, 用 95% 的乙醇浸提 48 h, 紫外—可见分光光度计测定每个处理提取液在波长为 649 nm、665 nm 的吸光度值, 并计算叶绿素含量。数据采用 Excel 和 SPSS 13.0 分析。

2 结果与分析

2.1 不同株系净光合速率—光响应规律对比分析

不同株系净光合速率—光响应曲线如图 1 所示。光合有效辐射在 0~400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 范围内, 随光强的增加, 转基因与对照株系的净光合速率均接近直线上升趋势, 光合有效辐射大于 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 净光合速率增速减缓。3 个转基因株系 RG-1、RG-3 和 RG-4 在各个光有效辐射下的净光合速率均高于对照。对光响应曲线进行拟合得出光补偿点和光饱和点。可以看出, 转基因株系 RG-1、RG-2、RG-3 和 RG-4 的光补偿点均低于对照株系 PT-16, RG-3 和 RG-4 的光饱和点高于 RG-1、RG-2 和 PT-16。RG-2 和 RG-4 的表观量子效率与对照 PT-16 相同, 高于 RG-1 和 RG-3。

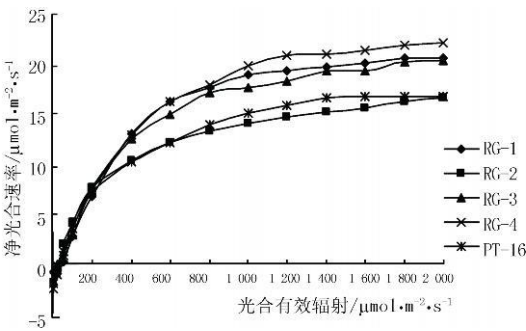


图1 不同株系净光合速率—光响应曲线

通过光响应曲线, 还可以判断树木固有的最大光合潜力, 即达到光饱和点的最大净光合速率, 这一指标可以衡量不同毛白杨株系的光合生产潜力。如表 1 所示, 株系 RG-4 的最大净光合速率最大, 达到了 22.76 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 说明株系 RG-4 具有最大光合生产潜力, RG-1、RG-3、PT-16 次之, RG-2 表现最差。

表 1 不同株系光合参数差异

株系	LCP	LSP	AQY	最大净光合速率
	$/\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	$/\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$		$/\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
RG-1	32.29	1490	0.041	22.23
RG-2	26.30	1493	0.048	16.59
RG-3	28.19	1511	0.044	21.00
RG-4	26.95	1495	0.048	22.76
PT-16	38.85	1494	0.048	17.97

2.2 不同株系瞬时净光合速率对比分析

不同株系瞬时净光合速率方差分析结果如表 2 所示。

表 2 不同株系净光合速率方差分析

变异来源	df	MS	F
株系	4	18. 087	4. 83 * *
机误	30	3. 749	
总和	34		

注 $F_{0.05}(4, 30)=2. 69$, $F_{0.01}(4, 30)=4. 02$.

方差分析显示, 不同株系的瞬时净光合速率存在极显著差异, 进行多重比较后, 由表 3 分析可知, 转基因株系 RG-4 的瞬时净光合速率显著高于 RG-2 和 RG-3, 且与 RG-2 的差异达到极显著水平, RG-4 与 RG-1、PT-16 的差异不显著。

表 3 不同株系净光合速率多重比较

株系	平均值	显著性	
		0. 05	0. 01
RG-4	21. 46	a	A
RG-1	20. 00	ab	AB
PT-16	19. 68	ab	AB
RG-3	18. 06	b	AB
RG-2	17. 43	b	B

为了进一步探讨净光合速率与生长的相关性, 利用净光合速率分别与苗高和地径作一元线性回归, 分析结果见表 4, 净光合速率与苗高、地径均为正相关, 净光合速率与苗高相关不显著, 相关系数为 0. 045, 而与地径极显著相关, 相关系数达到 0. 645, 说明净光合速率与地径的相关最紧密。

表 4 净光合速率与苗高和地径的相关性

Pn 与苗高			Pn 与地径		
MS	F	相关系数	MS	F	相关系数
58. 653	0. 047	0. 045	15. 073	16. 361 * *	0. 645 * *
1 237. 386			0. 921		

注 $F_{0.05}(1, 23)=4. 28$, $F_{0.01}(1, 23)=7. 88$.

2.3 不同株系叶绿素含量测定

叶绿素是植物光合作用的主要载体, 是植物光合生理生态研究的一项重要指标。不同株系叶绿素含量方差分析结果见表 5。

表 5 不同株系叶绿素含量方差分析

变异来源	df	总叶绿素		叶绿素 a		叶绿素 b		叶绿素 a/b	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
株系	4	0. 888	3. 731 *	0. 423	2. 943 *	0. 09	4. 685 * *	0. 108	0. 523
机误	40	0. 238		0. 144		0. 019		0. 206	
总和	44								

注 $F_{0.05}(4, 40)=2. 61$, $F_{0.01}(4, 40)=3. 83$.

由表 5 分析可知, 株系间叶绿素含量差异显著, 进行多重比较后, 由表 6 可以看出, RG-1 的叶绿素总量、叶绿素 a 和叶绿素 b 含量显著高于其它各株系, 其它株系间差异不显著, RG-2 的叶绿素含量最低。各株系叶绿素 a/b 差异不显著。

表 6 不同株系叶绿素含量多重比较

株系	总叶绿素		叶绿素 a		叶绿素 b		
	平均值	0. 05	平均值	0. 05	平均值	0. 05	0. 01
RG-1	3. 25	a	2. 28	a	0. 97	a	A
RG-3	2. 71	b	1. 90	b	0. 81	b	AB
RG-4	2. 65	b	1. 83	b	0. 82	b	AB
PT-16	2. 55	b	1. 79	b	0. 76	b	AB
RG-2	2. 44	b	1. 74	b	0. 70	b	B

3 结论与讨论

光补偿点和光饱和点是植物利用光强能力的重要指标, 光补偿点低的植物被认为能更有效地利用弱光, 光饱和点高的植物被认为能更有效地利用强光^[21]。该研究中转基因株系的光补偿点均低于对照, 说明它们对弱光的利用能力较强。RG-3 和 RG-4 的光饱和点高于对照, 说明 RG-3 和 RG-4 对强光的利用能力较强。转基因增强了植株对光的利用能力, 不同程度的增大了对光的生态适应范围。

在杨树的净光合速率与生长的相关性研究中, 报道呈正相关的较多。Ceulemans 等^[14-15]认为最大净光合速率与株系第 1 年和第 2 年的苗高呈正相关, 且 1 a 生容器苗光饱和时的净光合速率也与苗高呈正相关; 刘雅荣等^[16-19]认为净光合速率×总叶面积与生长和生物量密切相关。而符军等^[20]对大田毛白杨进行研究发现净光合速率与树木的生长并没有明显的关系, 甚至出现过负相关。该研究发现, 转 *rolB-pttGA20ox* 双价基因毛白杨株系的净光合速率与地径极显著相关, 达到了 0. 645, 而与苗高相关不显著, 只有 0. 045, 这可能与转基因植株的高生长使叶面积相对减小有关。

转基因各株系在光合特性、叶绿素含量、苗高、地径和叶片形态上都存在着明显差异, 在转基因研究中, 这种性状变异有很多报道, 推测原因可能为: 在转化过程中, 由于长期的组织培养、再生以及选择剂的筛选易引起体细胞株系变异^[22-23]; 外源基因插入的位置效应, 当外源基因插入到转录活跃区时, 就有可能获得高水平的表达, 相反表达活性就会明显降低; 外源基因的表达破坏了植物固有的经长期进化而形成的耗能模式, 造成一些性状表达所需能量的相对不足, 影响生理代谢, 最终促成表型的变化^[24]。

参考文献

[1] 朱之梯. 毛白杨遗传改良[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006.
[2] 裴保华, 王世绩. 毛白杨根原基的研究[J]. 河北农学报, 1982, 7 (1): 33.
[3] 裴保华, 王世绩. 提高毛白杨插条成活率的研究[J]. 中国林业科学 1977(2): 37-42.
[4] 陈雪梅, 高红兵, 王沙生. 三种杨树扦插生根期间内源激素水平的比较研究[J]. 林业科学, 1994, 30(1): 1-7.

[5] 郑钧宝,裴保华,耿桂荣.毛白杨扦插生根的研究[J].东北林业大学学报,1988,16(6):34-40.

[6] 齐康学,贾小明,张廷桢等.石蜡处理插穗提高毛白杨扦插成活与生长的研究[J].西北林学院学报,2001,16(3):23-25.

[7] 熊瑾.转 *rolB* 基因毛白杨植株性状变异的研究[D].北京:北京林业大学,2006.

[8] Reid J B,Howell S. Hormone mutants and plant development[M]//PJ Daviesed. Plant Homones, The Netherlands 1995:448-485.

[9] Huang S, Raman A S, Ream J E, et al. Overexpression of gibberellins 20-oxidase confers a gibberellins overproduction phenotype in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 1998 118: 773-781.

[10] 李伟. 转双价基因促进植物生根及顶端优势的研究[D]. 北京:北京林业大学,2004.

[11] 李伟,李慧,陈晓阳. 转 *rolB/pttGA20ox* 双价基因提高银白杨生根能力及生长速度的研究[J]. 北京林业大学学报,2009,31(2):92-95.

[12] 辛蓓. *rolB-pttGA20ox* 双价基因转化毛白杨及遗传稳定性研究[D]. 北京:北京林业大学,2009.

[13] 杨细明,洪伟,吴承祯等.雷公藤株系苗木光合生理特性研究[J]. 福建林学院学报,2008,28(1):14-18.

[14] Ceulemans R, Impens L. Net CO₂ exchange rate and shoot growth of young poplar(*Populus*) clones[J]. J. Exp. Bot, 1983, 34: 866-870.

[15] Ceulemans R, Impens U, Steenackers V. Variations in photosynthetic anatomical and enzymatic leaf traits and correlations with growth in recently selected *Populus* hybrids[J]. Can J Bot, 1987, 17: 273-283.

[16] 刘雅荣,刘奉觉,王爽等.四种杨树苗木的生长与光合作用特性的研究[J]. 林业科学,1983,19(3):269-275.

[17] 张志毅,沈应柏,林惠斌等.毛白杨及其杂种株系苗期生长与光合性能的比较研究[J]. 北京林业大学学报,1992,14(增刊2):35-39.

[18] Isebrands J G, Ceulemans R, Wiard B. Genetics variation in photosynthetic traits among *Populus* clones in relation to yield[J]. Plant Physiol Biochem 1988 26(4):427-437.

[19] 李静怡,张志毅.三倍体毛白杨株系光合特性的研究[J]. 北京林业大学学报,2000,22(6):12-15.

[20] 符军,符毓崇,刘玉媛等.田间条件下毛白杨株系光合和蒸腾特性研究[J]. 陕西林业科技,1995(3):1-6.

[21] 朱万泽,王金锡,薛建辉.台湾桫欏木引种的光合生理特性研究[J]. 西北植物学报,2004,24(11):2012-2019.

[22] Altman D W. Quantitative trait variation in phenotypically normal regenerants of cotton[J]. In Vitro Cell Dev Biol, 1991, 27: 132-138.

[23] Zhang S, Warkentin D, Sun B, et al. Variation in the inheritance of expression among sublines for unselected(*uidA*) and selected(*bar*) transgenes in maize(*Zea mays* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 752-761.

[24] 崔海瑞,王忠华,舒庆尧.转 *Bt* 基因水稻克螟稻杂交转育后代农艺性状的研究[J]. 中国水稻科学,2001,15(2):101-106.

Photosynthetic Characteristics of the Transgenic *rolB-pttGA20ox* Double Genes *Populus tomentosa* Carr.

JIA Xiang-nan¹, LI Wei¹, LENG Qing-yun¹, SUN Li-yang¹, CHEN Xiao-yang^{1,2}

(1. National Engineering Laboratory of Forest Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083; 2. College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract: In order to study the photosynthetic characteristics of the transgenic *rolB-pttGA20ox* double genes *Populus tomentosa* Carr., one-year-old potted seedlings of 4 transgenic clones (RG-1 ~ RG-4) and a control clone (PT-1616) were used as experimental materials for the measurement of photosynthesis using Li-6400. The correlation between photosynthetic and growth characteristics was also analyzed. The results showed that the light response curves of net photosynthetic rate of the five clones were similar to each other, and the net photosynthetic rate of RG-1, RG-3 and RG-4 were higher than that of the control clone with the same photosynthetic active radiation. The light compensate points of all the 4 transgenic clones were lower than that of the control clone, but the light saturation points of RG-3 and RG-4 were higher than that of the control clone; The difference of net photosynthetic rates between different clones was significant, with RG-4 being the highest; The net photosynthetic rate of transgenic clones were correlated significantly with their ground diameters, while not significantly related to the seedling height.

Key words: transgenic double genes; *Populus tomentosa* Carr.; photosynthesis; correlation