

也门铁及其嵌合体叶绿素合成特性研究

刘和平^{1,2}, 何业华², 林剑波¹, 林顺权², 胡桂兵², 杨转英²

(1. 阳江职业技术学院 生命科学与技术系, 广东 阳江 529566; 2. 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:以 2 a 生的也门铁及其嵌合体变异品种‘金心也门铁’和‘金边也门铁’为试材, 研究了也门铁及其嵌合体的主要叶绿素合成前体物质。结果表明:‘金边也门铁’叶片变异(黄色)部分叶绿素合成在 PBG 与 Urogen III 之间受阻, ‘金心也门铁’叶片变异(混合)部分的叶绿素合成在 Urogen III 与原卟啉之间受阻, 导致颜色发生变化; ‘金边也门铁’叶片绿部、‘金心也门铁’叶片绿部及也门铁三者之间的叶绿素 a、b 及叶绿素总含量差异不大, 所以三者都呈绿色。

关键词: 也门铁; 嵌合体; 叶绿素; 叶绿素前体物质

中图分类号: S 687 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)14-0120-03

也门铁(*Dracaena fragrans* (L.) Ker-Gawl.) 为龙舌兰科(Agavaceae)龙血树属(*Dracaena*)常绿乔木, 又名香龙血树、千年木等, 是我国流行的室内观叶植物, 我国市场上主要有 3 个品种, 即也门铁(*Dracaena fragrans*)、‘金心也门铁’(*Dracaena fragrans* cv. *massangeana*)和‘金边也门铁’(*Dracaena fragrans* cv. *lindenii*)。‘金边也门铁’与‘金心也门铁’为也门铁的嵌合体变异品种^[12]。观赏植物的金心、金边和花叶等品种极具观赏价值, 在观赏植物育种和开发利用中占有重要地位^[3-4]。研究也门铁等嵌合体植物的叶绿素合成特性及机理可以为观赏植物育种和开发利用提供理论指导和技术支持。

植物叶绿素的合成途径为: Glu (Glutamate, 谷氨酸) → ALA (δ -Aminolevulinic acid, δ -氨基酮戊酸) → PBG (Porphobilinogen, 胆色素原) → Uro III (Uroporphyrinogen III, 尿卟啉原 III) → Proto IX (Protoporphyrin IX, 原卟啉 IX) → Mg-Proto IX (Mg-Protoporphyrin IX, 镁原卟啉 IX) → Pch (Protochlorophyll, 原叶绿素酸) → Chl a (Chlorophyll a, 叶绿素 a) → Chl b (Chlorophyll b, 叶绿素 b), 其中任何一步受阻, 都将影响叶绿素的生物合成, 进而导致颜色变异。

该试验通过分析也门铁及其嵌合体品种叶绿素合成特性, 探讨也门铁及其嵌合体中影响叶绿素合成的因素, 为进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2 a 生的也门铁(*Dracaena fragrans* (L.) Ker-Gawl.) 及其嵌合体变异品种‘金心也门铁’(*D. fragrans* cv. *massangeana*)和‘金边也门铁’(*D. fragrans* cv. *lindenii*)。4%三氯乙酸溶液、1 mol/L 醋酸钠、Ehrlich-Hg 试剂、提取缓冲液(0.6 mol/L Tris、0.1 mol/L EDTA)、0.067 mol/L (pH 6.8)磷酸缓冲液、1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液、1% 氨水溶液、80% 碱性丙酮、丙酮乙酸混合液。

1.2 试验方法

参照徐培洲等^[5]、喻敏等^[6]、王保莉等^[7]的方法。

1.2.1 δ -氨基乙酰丙酸(ALA)的测定 0.5 g 叶片用 3 遍 5 mL 4% 的三氯乙酸(w/v)及少量石英砂研磨, 合并上清液并定容至 20 mL; 18 000 r/min 离心 15 min; 取 5 mL 上清液加入 2.35 mL 醋酸钠(1 mol/L)和 0.15 mL 乙酰丙酮。沸水浴 10 min 后冷却至室温。取其中的 2 mL 加入 2 mL 显色液(Ehrlich-Hg 试剂)黑暗下 15 min 后测 553 nm 的 OD 值。Ehrlich-Hg 试剂: 1 g P-二甲氨基苯甲醛溶解于 30 mL 冰醋酸中, 加入 8 mL 70% 的高氯酸(高氯酸遇有机溶剂易爆炸), 用冰醋酸稀释到 50 mL, 最后加入 0.2 g 升汞。此溶液存于棕色瓶中, 外面用锡纸包裹, 可以在 4℃ 长期保存。

1.2.2 胆色素原(PBG)的测定 参照 Bogorad^[8]的方法。0.5 g 叶片用液氮研磨后, 加入 5 mL 提取缓冲液(0.6 mol/L Tris, 0.1 mol/L EDTA, 用盐酸调 pH 8.2), 过滤或 18 000 r/min 离心 10 min。加 2 mL Ehrlich-Hg 试剂, 黑暗中显色 15 min, 测 553 nm 的 OD 值。

1.2.3 尿卟啉原 III(Urogen III)的测定 参照 Bogorad^[8]的方法加以改进。1 g 叶片用液氮研磨后, 加入 10 mL 提取缓冲液(0.067 mol/L (pH 6.8)磷酸缓

第一作者简介: 刘和平(1976), 男, 博士, 讲师, 园林工程师, 现主要从事园林技术专业教学和园林植物生物技术研究工作。E-mail: hortlu@yahoo.com.cn.

责任作者: 何业华(1960), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事园艺植物生物技术研究工作。E-mail: heyehua@scau.edu.cn.

基金项目: 广东省科技攻关资助项目(2006B20101003)。

收稿日期: 2011-04-20

冲液), 过滤或 18 000 r/min 离心 10 min。取 5 mL 加入 0.25 mL 1% 的 Na₂S₂O₃, 剧烈震荡, 再用强光照射 20 min。加入 1 mol/L 甲酸(或冰醋酸)至 pH 3.5。用 10 mL 乙醚萃取 3 次, 分层后测水相的 405.5 nm 的 OD 值。

1.2.4 原卟啉 IX Proto IX、镁原卟啉 Mg-Proto IX、原脱植基叶绿素 Pchl 按 Hodgins R 等^[9]的方法, 取 0.3 g 去主脉鲜叶, 加 25 mL 80%碱性丙酮[体积比为 80(丙酮):20(1%氨水溶液)], 研磨提取后, 分别在波长 575、590、628 nm 处测得吸光值 A, 并以下列公式计算其含量($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)。Mg-Proto IX=0.06077A₅₉₀-0.01937A₅₇₅-0.003423A₆₂₈; Proto IX=0.18016A₅₇₅-0.04036A₆₂₈-0.04515A₅₉₀; Pchl=0.03563A₆₂₈+0.007225A₅₉₀-0.02955A₅₇₅。

1.2.5 叶绿素(Chl)的测定 取新鲜的叶片 0.5 g, 放入盛有 2 mL 丙酮:乙酸=1:1 的 Eppendorf 管中, 浸泡 24 h。在波长 663 nm、645 nm 处测 OD 值, 并根据下列公式计算叶绿素的浓度和含量。叶绿素 a 的浓度: Ca=12.7A₆₆₃-2.69A₆₄₅; 叶绿素 b 的浓度: Cb=22.9A₆₄₅-4.68A₆₆₃; 叶绿素总浓度: Ct=Ca+Cb; 叶绿素的含量: Ci×V/w。(注:i=a、b、t, V 为浸提液的体积, w 为材料的重量)。

2 结果与分析

2.1 ‘金边也门铁’叶绿素及其前体物质含量

2.1.1 ‘金边也门铁’叶绿素前体物质相对含量 该研究测定了也门铁、‘金边也门铁’叶片黄部和‘金边也门铁’叶片绿部的数种叶绿素主要前体物质, 将也门铁的各种前体物质含量定为 100%, 与‘金边也门铁’叶片的黄部和绿部分别进行比较, 由图 1 可看出, 相对于也门铁, ‘金边也门铁’叶片黄色部分的叶绿素前体物质 ALA 和 PBG 相对含量较高; 而从 Urogen II 到原叶植酸, 其含量下降较大, 且都低于也门铁, 说明‘金边也门铁’叶片黄色部分的叶绿素合成受阻至少是在 PBG 之后。

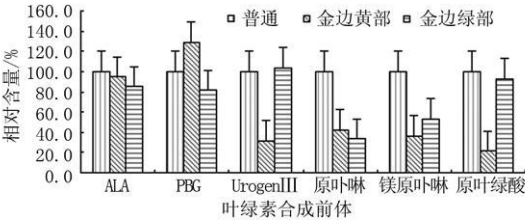


图 1 ‘金边也门铁’与也门铁叶绿素前体物质相对含量比较

2.1.2 ‘金边也门铁’叶绿素含量 从表 1 可看出, ‘金边也门铁’叶片黄色部分的叶绿素 a、b 及叶绿素总含量都很少, 所以变异部分呈现黄色; ‘金边也门铁’叶

片绿色部分的叶绿素 a、b 及叶绿素总含量与也门铁叶片的叶绿素含量相差不大, 甚至还要高于也门铁叶绿素含量, 所以呈现绿色, 有时还要比也门铁绿。这些测定结果完全符合‘金边也门铁’的表现型。

表 1 ‘金边也门铁’与也门铁叶绿素含量

	叶绿素 a 含量	叶绿素 b 含量	叶绿素总含量	叶绿素
	/mg·g ⁻¹ FW	/mg·g ⁻¹ FW	/mg·g ⁻¹ FW	a/b
普通	1.71	0.48	2.19	3.56
金边黄色	0.14	0.04	0.18	3.50
金边绿部	1.70	0.49	2.19	3.47

2.2 ‘金心也门铁’叶绿素及其前体物质含量

2.2.1 ‘金心也门铁’叶绿素前体物质含量 该试验测定了‘金心也门铁’叶片绿色部分和变异(混合)部分与也门铁叶片的数种叶绿素合成前体物质, 并且将也门铁的各种前体物质含量定为 100%, 与‘金心也门铁’叶绿素合成前体物质进行比较, 由图 2 可看出, ‘金心也门铁’叶片绿部的各种前体物质与也门铁比较接近, 但变异部分的原卟啉含量急剧降低, 远远低于也门铁和‘金心也门铁’叶片绿部, 说明‘金心也门铁’叶片变异部分叶绿素合成受阻至少在 Urogen II 之后。

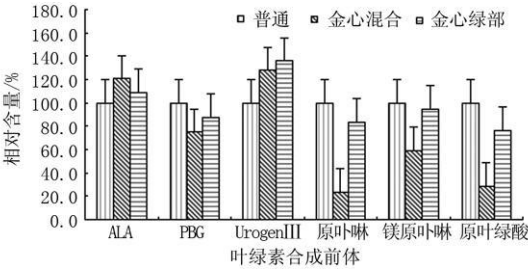


图 2 ‘金心也门铁’与也门铁叶绿素前体物质相对含量比较

2.2.2 ‘金心也门铁’叶绿素含量 从植株叶片表型来看, ‘金心也门铁’植株叶片绿色部分和中部变异部分的颜色差别没有‘金边也门铁’明显, 且绿色部分颜色与也门铁叶片叶色也比较接近。从表 2 可看出, ‘金心也门铁’叶片变异(混合)部分叶绿素 a 和 b 的含量都要低于也门铁和‘金心也门铁’叶片绿色部分的叶绿素含量; ‘金心也门铁’叶片绿色部分与也门铁的叶绿素含量相差不大; ‘金心也门铁’叶片变异(混合)部分的叶绿素 a、b 及叶绿素总含量要低于‘金心也门铁’叶片绿色部分的相应物质含量, 所以变异(混合)部分看起来不及绿色部分绿。叶绿色测定结果符合大田观察。比较表 1、2 金心也门铁’和‘金边也门铁’各个部位的叶绿素 a、b 及叶绿素总含量, 2 个品种的绿色部分各物质含量相差不大, 且都高于变异部分的含量; ‘金心也门铁’变异(混合)部分的各物质含量要高于‘金边也门铁’黄色部分的相应值, 这完全符合也门铁植株大田表型。

表 2 ‘金心也门铁’与也门铁叶绿素含量

	叶绿素 a 含量 / mg · g ⁻¹ FW	叶绿素 b 含量 / mg · g ⁻¹ FW	叶绿素总含量 / mg · g ⁻¹ FW	叶绿素 a/b
普通	1.71	0.48	2.19	3.56
金心绿部	1.60	0.59	2.19	2.71
金心混合	0.60	0.23	0.83	2.61

3 讨论与结论

‘金边也门铁’叶片绿色部分、‘金心也门铁’叶片绿色部分与也门铁叶片三者之间的叶绿素 a、b 及叶绿素总含量均相差不大, 所以都呈现绿色; ‘金边也门铁’叶片变异(黄色)部分的叶绿素 a、b 及叶绿素总含量明显低于也门铁和‘金边也门铁’叶片绿色部分, 故颜色呈现黄色; ‘金心也门铁’叶片变异(混合)部分叶绿素 a、b 及叶绿素总含量低于也门铁, 但高于‘金边也门铁’叶片变异(黄色)部分的相应指标含量, 故‘金心也门铁’叶片变异(混合)部分也发生变化, 呈现黄绿相间的结果。试验结果完全符合也门铁的表现型。

比较‘金边也门铁’叶片绿部和黄部的几个主要叶绿素合成前体物质与也门铁的相对含量可知, ‘金边也门铁’叶片黄部的叶绿素合成受阻导致颜色变异, 且至少是在 PBG 之后受阻, 初步认定其叶绿素是在 PBG 与 Urogen II 之间合成受阻。比较‘金心也门铁’叶片绿部和变异(混合)部分的几个主要叶绿素合成前体物质与也门铁的相对含量可知, ‘金心也门铁’叶片变异(混

合)部分的叶绿素合成受阻导致颜色变异, 且至少是在 Urogen II 之后受阻, 初步认定叶绿素是在 Urogen II 与原卟啉之间合成受阻。根据叶绿素合成受阻的位置, 可以进一步进行分子生物学研究, 进行相应基因克隆、测序等研究, 探索也门铁嵌合体品种变异的分子机理。

参考文献

[1] 何业华, 刘和平, 刘颂颂, 等. 也门铁嵌合体品种在离体培养中的变异规律及调控[J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(2): 70-73.
[2] 易清, 何业华, 刘颂颂, 等. 3 个也门铁品种高效离体繁殖体系的建立[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2007, 33(4): 440-447.
[3] 于晓南, 张启翔. 彩叶植物多彩形成的研究进展[J]. 园艺学报, 2007, 27(增刊): 533-538.
[4] 李明银, 何云晓. 植物遗传嵌合体及其在观赏植物育种中的应用[J]. 植物学通报, 2005, 22(6): 641-647.
[5] 徐培洲, 李云, 袁澍, 等. 叶绿素缺乏水稻突变体中光系统蛋白和叶绿素合成特性的研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(7): 1299-1305.
[6] 喻敏, 胡承孝, 王运华. 低温条件下钼对冬小麦叶绿素合成前体的影响[J]. 中国农业科学, 2006, 39(4): 702-708.
[7] 王保莉, 郭蔼光, 汪沛洪. 小麦突变体返白系阶段叶绿素代谢的变化[J]. 植物学报, 1996, 38(7): 557-562.
[8] Bogorad L. Porphyrin synthesis In: Colowick S P, Kaplan N O (eds). Methods in Enzymology 5[M]. New York: Academic Press, 1962: 885-891.
[9] Hodgins R, van Huystee R B. Rapid simultaneous estimation of protoporphyrin and Mg-protophyrins in higher plants[J]. Journal of Plant Physiology, 1986, 125: 311-323.

Studies of Chlorophyll Synthesis in *Dracaena fragrans* and its Chimeras

LIU He-ping^{1,2}, HE Ye-hua², LIN Jian-bo¹, LIN Shun-quan², HU Gui-bing², YANG Zhuan-ying²

(1. Yangjiang Vocational and Technical College, Yangjiang Guangdong 529566; 2. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract: Using two-year leaves of three varieties (*Dracaena fragrans* (L.) Ker-Gawl.) and its two chimeras: *D. fragrans* cv. *lindenii*. and *D. fragrans* cv. *massangeana* as test materials, the contents of chlorophyll synthesis precursors were studied. The results showed that the chlorophyll synthesis was hampered between PBG and Urogen III in *D. fragrans* cv. *lindenii*., between Urogen III and Proto IX in *D. fragrans* cv. *massangeana*, which caused leave-color differentiation. The content difference of chlorophyllide (Chlide), Chl a and Chl b was little in the green part of *D. fragrans* cv. *lindenii*.'s leaf, the green part of *D. fragrans* cv. *massangeana*'s leaf and the leaf of *D. fragrans*, so they looked green.

Key words: *Dracaena fragrans*; chimera; chlorophyll; chlorophyll synthesis precursor