

LB 技术获得的科间植物[烟草(+)菠菜] F₂、F₃ 代植株与亲本呼吸代谢途径及叶绿素含量的遗传分析

崔亚亚 白云 陈毅平 吴伯骥

(中国科学院成都生物研究所, 成都, 610015)

本文报道了通过人工技术(LB 技术)促使不同植物细胞间细胞质和染色质穿壁转移获得的科间植物[烟草(+)菠菜]F₂代植株与其双亲同一生长发育时期叶片的呼吸代谢途径及 F₂、F₃ 代植株单位叶面积叶绿素含量的测定及比较分析,为 LB 技术导入外源遗传物质并使之遗传和表达从而获得杂种的真实性提供了佐证。

关键词: LB 技术,(烟草+菠菜)杂交后代,呼吸代谢途径,叶绿素 a 和叶绿素 b

高等植物的呼吸代谢过程是植物的一个基本生命活动过程。前人的研究表明,在植物中同时存在着多条呼吸代谢途径,它们在时间上是平行和交错的,在空间上是多方向的。多条途径在时空上的不同强度和速率的搭配,构成了植物体的呼吸代谢类型,并由基因通过酶活动予以决定^[1-4]。叶绿素 a 和叶绿素 b 是高等植物光合作用的最主要色素,作用是吸收和传递光能,其遗传由多基因控制^[5,14-16]。这样,具不同呼吸代谢类型及叶绿素含量的植物间及其杂交后代在遗传基础上的差异,必将在杂交后代与双亲的呼吸代谢途径和叶绿素成分及含量上表现出来。为此我们进行了以下实验。

材料和方法

(一) 材料

柳叶烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、大圆叶菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 和烟草(+)菠菜 (*Nicotiana tabacum* L. (+) *Spinacia oleracea* L.) 17N-2 株系有性繁殖种子,温室播种。温度 24—28℃,湿度 70—80%,每天 12 小时 3000—4000lux 光照,苗龄 40 天时随机平

行取样测定。

(二) 方法

1. 呼吸代谢途径测定 每次测定 1 株植株的整株展开叶片,蒸馏水冲洗后去除中脉,剪成 25mm² 左右小片,用 CS-5 呼吸强度自动记录仪(重庆师范学院应用物理研究室制)和 SP-2 氧电极装置(中国科学院上海植物生理研究所制)测定^[8]。测总呼吸强度时用 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.5) + 5% 葡萄糖,测 EMP 途径用 10mmol/L 碘代乙酸抑制, HMP 途径用 10mmol/L 碘酸三钠抑制,测抗 KCN 呼吸用 1mmol/L KCN 作抑制剂,各种抑制剂均用含 5% 葡萄糖的 0.02mol/L 磷酸缓冲液配制,调至 pH 6.5。测定前将材料在各自处理液中浸泡 20 分钟。6 次重复。

2. 叶绿素的提取和测定 分别取相同叶位的鲜叶 2.5cm²,剪碎于研钵中加少量碳酸钙、石英砂和 4.5ml 蒸馏水研成匀浆,再加 20ml 丙

Cui Yaya et al.: Comparison and Analysis of Chlorophyll and Respiratory Metabolic Pathways for *N. tabacum* L.(+) *S. oleracea* L. Interclassic Hybrid F₂, F₃ Plants and Parents

本文于 1990 年 9 月 24 日收到。

酮,继续研磨至组织变白。将提取液倒入小烧杯中静置数分钟,过滤,定容至50ml。吸取该提取液2ml加80%丙酮2ml稀释后,用72-1型分光光度计分别在645nm和663nm处测定光密度值,以80%丙酮作为对照^[9,10,12]。另加一组1/2菠菜、1/2烟草叶绿素提取液等量混合液为对照。重复3次。

3. 计算和统计学分析 EMP、HMP途径运行水平用总呼吸量减去加抑制剂后剩余呼吸量表示(单位:微克O₂/克(鲜重)/小时)。抗KCN呼吸用加KCN抑制时的剩余呼吸量表示,被抑制部分为对氰化物敏感的细胞色素途径。

叶绿素a(C_a)、叶绿素b(C_b)和叶绿素(a+b)(C_T)的浓度(mg/L)按下列公式计算^[9,10,12]:

$$C_a = 12.7D_{663} - 2.69D_{645}$$

$$C_b = 22.9D_{645} - 4.68D_{663}$$

$$C_T = 20.2D_{645} + 8.02D_{663}$$

叶绿素含量(mg/cm²叶片)

$$= \frac{C(\text{mg/L}) \times \text{提取液总量}(\text{ml}) \times \text{稀释倍数}}{\text{叶面积}(\text{cm}^2) \times 1000}$$

对测定结果进行方差分析,用最小差数法(LSD法)进行多重比较^[11]。

结果与讨论

(一) 总呼吸强度

表1表明,烟草与菠菜双亲间的呼吸强度存在极显著差异,[烟草(+)-菠菜]F₂代的总呼吸强度介于双亲之间偏于菠菜,与烟草间有极显著差异而与菠菜间差异不显著。

实验所用CS-5呼吸强度自动记录仪和

SP-2氧电极装置测试结果一致。

(二) EMP途径运行水平

表1表明,烟草与菠菜间的EMP途径运行水平及其占总呼吸比率均存在极显著差异。[烟草(+)-菠菜]F₂代的两者都介于双亲之间,与双亲均存在极显著差异。

(三) HMP途径运行水平

表2表明,两亲本间在HMP途径运行水平及其占总呼吸的比率均存在极显著差异。[烟草(+)-菠菜]F₂代的HMP途径运行水平介于双亲之间,与双亲都具极显著差异,但其HMP途径占总呼吸比率与菠菜间有极显著差异而与烟草差异不显著。

(四) 抗KCN呼吸

表2结果表明,[烟草(+)-菠菜]F₂代和双亲都有细胞色素途径和抗KCN呼吸同时存在。两亲本间无论从抗KCN呼吸速率或其占总呼吸的比率均有极显著差异,[烟草(+)-菠菜]F₂代都介于双亲之间,与双亲间均存在极显著差异,但较偏于菠菜。和菠菜一样,其抗KCN呼吸强于对KCN敏感的细胞色素途径,而对烟草则相反。

(五) EMP/HMP比值的比较

菠菜的EMP/HMP为0.87,即EMP途径运行水平弱于HMP途径。烟草的EMP/HMP为1.35,EMP途径运行水平强于HMP途径。[烟草(+)-菠菜]F₂代的EMP/HMP为1.05,EMP途径和HMP途径的运行水平几乎相等,介于双亲之间。

(六) 叶绿素a和叶绿素b含量

表3表明,F₂、F₃代与双亲及1/2烟+1/2菠的叶绿素a和叶绿素b含量均有极显著差异

表1 烟草、[烟草(+)-菠菜]F₂代和菠菜总呼吸和EMP途径运行水平比较

材 料	总呼吸强度	差异显著性 (0.01)	EMP途径 运行水平	差异显著性 (0.01)	EMP占总呼 吸比率(%)	差异显著 性(0.01)
烟草	722.8	A	624.7	A	86.5	A
[烟草(+)-菠菜]F ₂ 代	553.0	B	354.3	B	64.1	B
菠菜	566.9	B	215.9	C	38.3	C
	LSD _{0.01} = 32.5		LSD _{0.01} = 29.1		LSD _{0.01} = 5.1	

单位:微克O₂/克(鲜重)/小时

表2 烟草、[烟草(+)]菠菜]F₂代和菠菜 HMP 途径和抗 KCN 呼吸运行水平比较

材 料	HMP 途径运行水平	差异显著性(0.01)	HMP 途径占总呼吸(%)	差异显著性(%)	抗 KCN 呼吸	差异显著性(0.01)	抗 KCN 呼吸占总呼吸(%)	差异显著性(0.01)
烟草	462.6	A	64.1	A	239.0	A	53.1	A
[烟草(+)]菠菜]F ₂ 代	337.0	B	60.9	A	318.7	B	57.7	B
菠菜	247.0	C	43.6	B	367.5	C	64.4	C
	LSD _{0.01} = 27.0		LSD _{0.01} = 15.5		LSD _{0.01} = 33.0		LSD _{0.01} = 5.0	

单位: 微克 O₂/克(鲜重)/小时

表3 烟草、[烟草(+)]菠菜]F₂、F₃代和菠菜叶绿素 a、叶绿素 b 及叶绿素 (a + b) 含量比较

材 料	叶绿素 a	差异显著性(0.01)	叶绿素 b	差异显著性(0.01)	叶绿素 (a + b)	差异显著性(0.01)
烟草	0.01821	A	0.00906	A	0.02727	A
[烟草(+)]菠菜]F ₂ 代	0.01367	B	0.00635	B	0.02002	B
[烟草(+)]菠菜]F ₃ 代	0.01401	B	0.00623	B	0.02024	B
菠菜	0.02407	C	0.02122	C	0.04529	C
1/2 烟 + 1/2 菠	0.02263	D	0.02111	D	0.04374	D
	LSD _{0.01} = 0.00072		LSD _{0.01} = 0.00034		LSD _{0.01} = 0.00077	

单位: mg/cm² (叶片)

并低于双亲, F₂代与 F₃代间差异不显著。

(七) 叶绿素 (a + b) 含量

表3结果表明,[烟草(+)]菠菜]F₂、F₃代的叶绿素(a+b)的含量明显低于双亲,与双亲及1/2烟+1/2菠间有极显著差异, F₂代和 F₃代间差异不显著。

高等植物的呼吸代谢途径和叶绿素合成都是由基因通过酶活动控制的,但也受组织(或器官)类型、年龄、生长发育时期、外界条件等影响而变化^[1-4,13,17]。呼吸代谢各途径都是由一系列酶(酶系统)所控制,即由多基因共同控制的。同样,叶绿素的合成也是由多基因控制的^[4,10]。同等条件下呼吸代谢途径及叶绿素成分和含量的差异,在一定程度上反映了植物在多基因水平上的差异,并相应地引起其它生理功能和形态结构上的不同。

LB 技术实现的植物细胞对外源遗传物质的导入,是以多基因水平(基因群)进行的,同时也导入部分细胞质和细胞器,在多基因水平上改变植物的遗传基础。通过该技术已获得了科间植物烟草+菠菜杂交植株^[6,7]。本实验结果表明,[烟草+菠菜]F₂代 EMP 途径运行水平及其占总呼吸比率、HMP 途径运行水平、抗 KCN 呼吸及其占总呼吸比率、EMP/HMP 比

值上均介于双亲之间,与双亲都有极显著差异。总呼吸强度与菠菜间无显著差异, HMP 途径占总呼吸比率与烟草间无显著差异。叶绿素含量方面,[烟草(+)]菠菜]F₂、F₃代单位叶面积叶绿素 a、叶绿素 b 及叶绿素(a+b)含量都低于双亲并与双亲间存在极显著差异,而 F₂代与 F₃代间差异不显著,趋于稳定。

参 考 文 献

- [1] 汤佩松: 1979. 植物学报, 21: 93-106.
- [2] 汤佩松等: 1956. 植物学报, 5: 377-397.
- [3] 薛应龙: 1980. 植物生理学通讯, 1: 60-72.
- [4] 曹宗巽等: 1979. 植物生理学, 31-72.
- [5] 李继耕: 1983. 中国农业科学, 1: 49-53.
- [6] 吴伯骥等: 1987. 中国科学(B 辑), 10: 1068-1073.
- [7] 吴伯骥等: 1987. 大自然探索, 4: 29-35.
- [8] 李德耀等: 1980. 植物生理学通讯, 1: 35-40.
- [9] 梅镇安: 1983. 植物生理学报, 6(4): 387-391.
- [10] 程保成等: 1985. 遗传, 7(3): 1-4.
- [11] 莫惠栋: 1984. 农业试验统计, 151-159.
- [12] Arnon, D. C.: 1949. *Plant Physiol.*, 24:1-15.
- [13] Bonner, J. A.: 1965. *Plant Biochemistry*. 2nd ed. Acad. Press New York., 850-866.
- [14] Baur, E.: 1909. *Vererbungslehre*, 1:330-351.
- [15] Correns, C.: 1909. *Vererbungslehre*, 1:291-321.
- [16] Sager, R.: 1972. *Cytoplasmic Genes and Organelles*. New York.
- [17] Thorpe, T. A.: 1978. *In: frontiers of plant tissue culture*. Published by The International Association for Plant Tissue Culture. 49-58.