

文章编号:1001-7380(2019)04-0049-05

金边杂种胡颓子叶色突变体 叶色变化机理的初步研究

陈红¹, 吴昌琦², 高若诚², 刘志强², 李云龙¹, 王传永¹, 李丹丹¹, 陆小清^{1*}

(1. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095)

摘要:以野生型杂种胡颓子(WT)和突变型金边杂种胡颓子(MT)的3年生扦插苗为供试材料,研究突变型金边杂种胡颓子叶绿素含量与光合特性等生理指标,分析叶色变化的原因。结果显示:(1)叶绿素总含量:杂种胡颓子(WT 1.530 mg/g) > 金边杂种胡颓子叶片绿色部位(MT-绿色 1.078 mg/g) > 金边杂种胡颓子叶片黄色部位(MT-黄化 0.031 mg/g);类胡萝卜素含量:WT(0.505 mg/g) > MT-绿色(0.318 mg/g) > MT-黄化(0.050 mg/g);(2)金边杂种胡颓子叶片绿色部位的 *Chla/b* 比值较 WT 叶片绿色部位,没有显著性的差异,但其叶片黄化部位的 *Chla/b* 比值显著低于野生型杂种胡颓子;(3)金边杂种胡颓子较野生型胡颓子光合速率及相关参数都有显著的改变。可见,金边杂种胡颓子的叶色变化是由叶片色素含量变化导致,导致植株的光合参数与叶绿素荧光参数等指标发生改变。

关键词:胡颓子;叶绿素;叶色;光合速率;叶绿素荧光参数

中图分类号:Q945.11;Q949.761.2

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2019.04.010

Preliminary study on leaf color change of a new leaf color mutant of *Elaeagnus×ebbingei* ‘Gilt Edge’

Chen Hong¹, Wu Changqi², Gao Ruocheng², Liu Zhiqiang², Li Yunlong¹,
Wang Chuanyong¹, Li Dandan¹, Lu Xiaoqing^{1*}

(1. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China;

2. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The three-year-old cuttings of *Elaeagnus×ebbingei* ‘Gilt Edge’ wild type (WT) and mutant (MT) were used as materials to study the physiological parameters such as chlorophyll content and photosynthetic characteristics of mutant and to analyze leaf color change reason. The results showed that: (1) As for the total chlorophyll content, *E. ×ebbingei* ‘Gilt Edge’ (WT 1.530 mg/g) > green part of mutant (MT-green 1.078 mg/g) > yellow part of mutant (MT-yellow 0.031 mg/g); as for carotenoid content, WT (0.505 mg/g) > MT-green (0.318 mg/g) > MT-yellow (0.050 mg/g); (2) There was no significant difference in the *Chl a/b* ratio between the green parts of MT leaves and the leaves of WT, but the *Chl a/b* ratio of the yellow parts of MT was significantly lower than that of WT hybrids; (3) The photosynthetic rate and related parameters of MT had significantly changed compared with those of WT. In conclusion, the leaf color change of MT was caused by change in the pigment content of leaves, which led to change in the photosynthetic parameters and chlorophyll fluorescence parameters of the plants.

Key words: *Elaeagnus×ebbingei*; Chlorophyll; Leaf color; Photosynthetic rate; Chlorophyll fluorescence parameter

彩叶植物凭借其绚丽的色彩和对生长环境条件的良好适应等优异特点,近年来在园林绿化中备

收稿日期:2019-06-19;修回日期:2019-06-29

基金项目:江苏省林业科技创新与推广项目“金边胡颓子、蓝莓的离体快繁技术研究及示范推广”(LYKJ[2017]39);南京市产学研合作后补助项目“金边胡颓子的彩色机理研究及推广利用”(201722087)

作者简介:陈红(1984-),女,江苏宿迁人,助理研究员,博士。主要从事观赏植物分子功能研究与育种研究。

通信作者:陆小清(1963-),男,江苏苏州人,研究员,硕士。主要从事观赏植物分子功能研究与育种研究。E-mail:xqlu3312@163.com。

受关注,且在园林绿化中应用越来越广泛。据 1993—1997 年的初步调查我国彩叶植物 400 种以上,分别属于 62 个科 108 个属^[1],我国关于彩叶植物的研究集中在环境条件对彩叶发生的影响与彩叶发生的分子机制较多,但对其结构特征与光合特性等方面的研究较少^[2-3]。本文研究对象金边杂种胡颓子(*Elaeagnus × ebbingei* ‘Gilt Edge’)是由杂种胡颓子自然芽变而来叶色突变体,表型稳定,是彩叶植物中常色叶、镶边类的一种。

金边杂种胡颓子属于胡颓子科胡颓子属,是一种彩叶常绿灌木,枝叶浓密,叶片中央深绿色,叶片边缘具不规则的黄边。秋花春实,果色鲜亮,具有较高的园林观赏价值,同时是耐瘠薄、耐干旱、耐寒性较强的常绿阔叶观赏树种。胡颓子属植物为胡颓子科灌木,同时该属中许多植物为珍贵的药食 2 用植物,其分布广泛,主要分布在中国,全球约有 80 余种,中国有 55 种^[4]。植物的叶色是叶片中各种色素综合协同作用所表现出来的结果^[5]。叶片中色素成分、含量及外部环境因素 3 者共同影响园艺植物叶色变化,对叶片成色机理的研究可以为改良和培育彩叶植物新品种提供参考依据。

本试验从光合作用参数、叶绿素、类胡萝卜素含量及光合特性等几方面,对金边杂种胡颓子叶色变化的原因进行了比较研究,以期为提高彩叶植物的观赏价值及其优良品种的选育提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验是在江苏省中国科学院植物研究所苗圃中进行,以金边杂种胡颓子(叶色突变体,是杂种胡颓子自然芽变产生)为试验研究对象,以野生型杂种胡颓子为对照试验组。

1.2 主要生理指标测定方法

1.2.1 叶片光合参数测定 以野生型杂种胡颓子植株为对照,利用 LI-6400 型便携式光合仪测定叶片(从顶芽往下数第 5 片或第 6 片成熟叶片)净光合速率(P_n),同时得到 G_s (气孔导度)、 C_i (胞间 CO_2 浓度)、 Tr (蒸腾速率)。选择晴天的 9:00—11:00 测定,采用红蓝 LED 光源,光照强度为 1 000 lx, CO_2 注入系统设定为 400 μmol ,气体流量 500 $\mu mol/s$ 。5 次重复,每个重复测定 2 株,取平均值。

1.2.2 叶绿素和类胡萝卜素含量的测定 采用 95% 乙醇浸提法^[6-7]测定叶片光合色素含量。具体步骤

如下:剪取植株从顶芽往下数第 5 片或第 6 片成熟叶片(①野生型:去除叶片中脉与边缘,只剪取叶片绿色部位;②突变体的绿色部位:去除叶片中脉与黄色部分,只剪取突变体叶片绿色部位;③突变体的黄化部位:去除叶片绿色部分,只剪取突变体叶片黄色部位),称取质量后剪碎,随即浸入 95%乙醇中,黑暗处静置 48 h,静置期间需多次轻摇混匀直至叶片发白,之后 3 000 g 离心力离心 30 min,去除残留的植物组织残渣。上清液用 HITACHI-800 紫外分光光度计测定 665, 649, 470 nm 波长下吸光值并进行记录,5 次重复。叶片单位鲜质量的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量的计算采用 Lichtenthaler(1987)的方法^[8],各光合色素的浓度计算方法如下:

$$\text{叶绿素 a} = 12.21 A_{665nm} - 2.81 A_{649nm};$$

$$\text{叶绿素 b} = 20.13 A_{649nm} - 5.03 A_{665nm};$$

$$\text{类胡萝卜素} = (1\,000 A_{470nm} - 3.27 \text{ 叶绿素 a} - 104 \text{ 叶绿素 b}) / 229。$$

1.2.3 叶色参数的测定 叶色参数的测定方法参照 Wang 方法^[9]:随机挑选叶片长势相近的 5 片功能叶,采用 Minolta CR-400 自动色差仪进行测定叶片的颜色,并记录 L^* , a^* , b^* 值。

1.3 数据处理与分析

所有指标测量值皆以平均值 \pm 标准误表示,处理分析数据软件为 Microsoft excel 2010。

2 结果与分析

2.1 金边杂种胡颓子的形态特征

金边杂种胡颓子与野生型杂种胡颓子植株相比,突变体叶片黄化的边在发芽后 5 d 就已经出现,并且随着植株的生长,叶子边缘的黄化现象越来越明显。具体表现为①刚抽出的心叶,叶子边缘表现为黄绿色(由于叶子表面鳞片的覆盖,黄绿色的叶子边缘不明显);②随着叶子发育,叶子边缘由黄绿色逐渐变成金黄色(见图 1)。突变体长势比正常野生型相对滞后,但能够正常结实,且黄化性状能够稳定遗传。

2.2 金边杂种胡颓子叶片色素含量测定

野生型杂种胡颓子叶片和突变型金边杂种胡颓子叶片绿色部位(MT-绿色)与黄化部位(MT-黄化)的叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素含量、类胡萝卜素的含量和叶绿素 a($Chla$)/叶绿素 b($Chlb$)的比值见图 2。金边杂种胡颓子的光合色素含量显著低于野

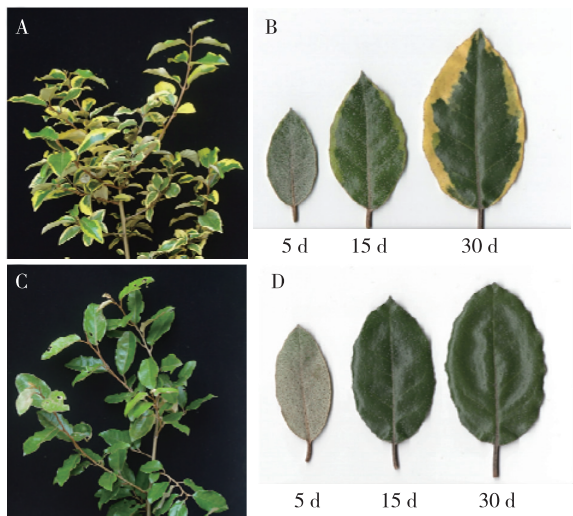
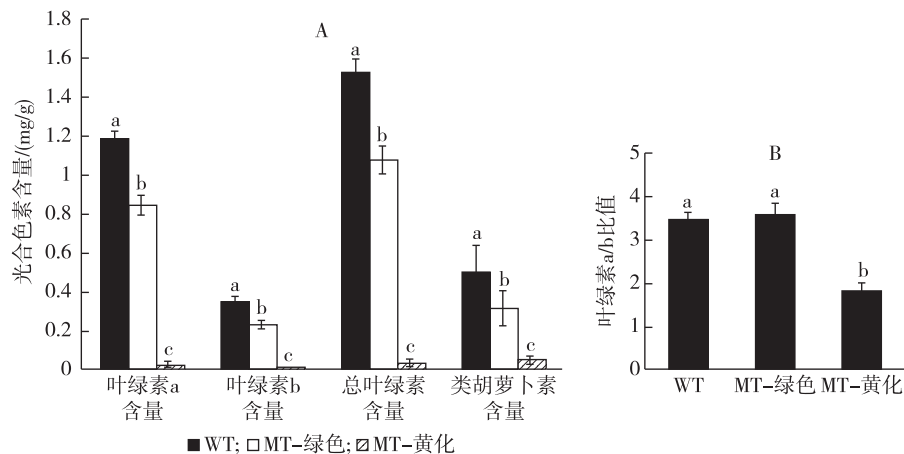


图 1 金边杂种胡颓子与杂种胡颓子的叶片表型比较



注:图中不同的小写字母表示不同样本同一色素的含量差异显著($P<0.05$)。

图 2 叶色黄化突变体与野生型叶片各光合色素含量(A)及叶绿素 a/b 的比值(B)

2.3 金边胡颓子叶色参数的测定分析

叶色参数是衡量叶片表征色泽变化值, L^* 值代表颜色亮度, L^* 值越大亮度越高; a^* 值代表红/绿的分量, a^* 值越大,代表红色越深,反之,代表绿色越深; b^* 值代表黄/蓝的分量, b^* 值越大,代表黄色越深,反之,代表蓝色越深。表 1 表明,金边杂种胡颓子叶片黄色部位的 L^* 值最大,说明亮度最大,杂种胡颓子的亮度最低, L^* 值仅是金边杂种胡颓子叶片黄色部位的 1/2;金边杂种胡颓子叶片黄色部位的 a^* 值最大,杂种胡颓子次之,金边杂种胡颓子叶片绿色部位的 a^* 值最小;金边杂种胡颓子叶片黄色部位的 b^* 值最大,金边杂种胡颓子叶片绿色部位的 b^* 值次之,杂种胡颓子最小。

生型杂种胡颓子,具体表现为(1)金边杂种胡颓子叶片绿色部位叶绿素含量比杂种胡颓子降低 29.5%,叶绿素 a 含量比杂种胡颓子降低 28.6%,叶绿素 b 含量比杂种胡颓子降低 32.4%,类胡萝卜素含量比杂种胡颓子降低 37.0%;(2)金边杂种胡颓子叶片黄色部位叶绿素含量比杂种胡颓子降低 98.0%,叶绿素 a 含量比杂种胡颓子降低 81%,叶绿素 b 含量比杂种胡颓子降低 97.6%,类胡萝卜素含量比杂种胡颓子降低 90.1%;(3)金边杂种胡颓子叶片绿色部位的 $Chla/b$ 比值没有显著性的差异,但金边杂种胡颓子叶片黄化部位的 $Chla/b$ 比值显著低于正常的杂种胡颓子。以上结果表明,叶片叶绿素含量的显著降低是金边杂种胡颓子叶片边缘产生黄化表型的直接原因。

表 1 叶色参数 (L, a, b)

处理	L^*	a^*	b^*
MT-黄化	77.01±0.84 a	5.00±0.75 a	59.24±3.64 a
MT-绿色	40.80±0.49 b	-9.58±0.93 b	21.35±1.28 b
WT	37.52±1.14 c	-9.20±0.26 b	17.79±0.77 c

注:同列中不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。

2.4 金边杂种胡颓子的光合速率及相关参数测定分析

从表 2 可以看出,金边杂种胡颓子的净光合速率、气孔导度、蒸腾速率明显低于野生型,但胞间 CO_2 的摩尔分数却高于杂种胡颓子。说明金边杂种胡颓子较野生型的光合速率及相关参数都有显著的改变。

图 3 显示,金边杂种胡颓子与野生型都出现较

明显的双峰曲线,即先增大后逐渐降低,早晨 8:00 左右达到一个小高峰后逐渐降低,野生型是 11:00 达到最低值,金边杂种胡颓子 13:00 达到最低值,然后略有升高,说明 2 者的净光合速率可能出现了“午休”现象。除净光合速率外,植物的蒸腾速率(T_r)、气孔导度(G_s)、胞间 CO_2 摩尔分数(C_i)等光合指标日变化也不尽相同。 T_r 和 G_s 变化趋势基本上呈现出较为规则的先增大后减小的趋势。

表 2 金边杂种胡颓子与杂种胡颓子的
光合速率及相关指标

材料	净光合速率/ [$\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]	气孔导度/ [$\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]	胞间 CO_2 摩尔 分数/($\mu\text{mol}/\text{mol}$)	蒸腾速率/ [$\text{mmol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]
MT	7.649±0.624 b	0.150±0.005 b	273.729±9.791 a	3.477±0.086 b
WT	11.775±0.430 a	0.201±0.004 a	256.078±2.438 b	4.329±0.131 a

注:同列中不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。

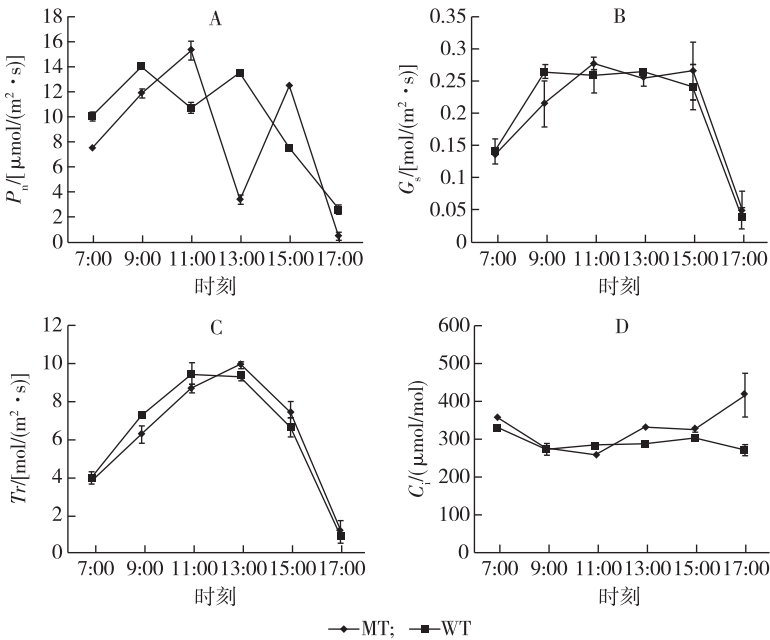


图 3 MT 和 WT 光合指标(A,净光合速率;B,气孔导度;C,蒸腾速度;D,胞间 CO_2 摩尔分数)的日变化

表 3 显示,金边杂种胡颓子叶片黄化与绿色部分荧光参数和光系统 II 的捕光能力存在明显差异,叶绿素含量的降低明显抑制了光适应下光系统 II 的最大光化学效率与光系统 II 的光化学效率。金边杂种胡颓子叶片绿色部分的非光化学淬灭比黄化叶片高。

表 3 金边杂种胡颓子与野生型的荧光参数指标

材料	F_v/F_m	Φ_{PSII}	NPQ
MT	0.160±0.019 b	0.065±0.013 b	0.084±0.012 b
WT	0.458±0.007 a	0.186±0.013 a	0.742±0.013 a

注:同列中不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。

3 讨论和结论

叶片颜色的变化是由复杂的生物过程决定的^[10]。叶绿体是绿色植物所特有的半自主性细胞器,叶绿体除了可以进行光合作用,还是叶绿素、淀

粉等重要有机物的合成场所^[11-12]。叶绿体发育过程中同时还结合叶绿素,类胡萝卜素及其他光合色素^[13-14]。如果叶绿体在发育进程中出现缺陷能引起植物叶色改变和光合作用下降或丧失,最终导致植物生长迟缓,甚至死亡。

导致叶色变化除了叶片器官形态的改变,其影响的主要原因还包含叶片中各种色素的种类、含量及比值的关系,例如叶绿素与类胡萝卜素的含量就是影响植物叶片光合作用的重要因素^[15]。此前已有研究报道叶绿素含量影响叶绿素结合蛋白的转录与翻译。类胡萝卜素是光合器官和光保护系统的重要组成部分,其生物合成与叶绿体中叶绿素的合成相协调^[16]。由于叶绿素含量降低,叶绿素荧光和叶片吸收光能的能力也相应降低,但是金边杂种胡颓子的正常绿色部分的叶片功能弥补了黄色部分的功能,使光合能力与野生型没有显著的差异。叶绿素的含量直接影响到植物光合能力,且在光合

作用中捕获光能这个过程中发挥重要作用。金边杂种胡颓子的金边在全生育期表达,伴随着发育时期,叶片边缘的黄化现象越来越明显。金边杂种胡颓子的光合色素含量显著低于野生型杂种胡颓子,且金边杂种胡颓子叶片黄化部位的 *Chla/b* 比值显著低于正常的杂种胡颓子。结果表明,叶片色素的显著降低可能是金边杂种胡颓子叶片边缘产生黄化表型的直接原因。

本研究表明,叶绿素总含量由高到低的顺序依次为杂种胡颓子>金边杂种胡颓子叶片绿色部位>金边杂种胡颓子叶片黄色部位;金边杂种胡颓子叶片绿色部位的 *Chla/b* 比值没有显著性的差异,但金边杂种胡颓子叶片黄化部位的 *Chla/b* 比值显著低于正常的杂种胡颓子。由此看出,金边杂种胡颓子叶色突变是否是因为叶绿素合成受阻导致,还需要今后从分子生物学、蛋白组学上进一步对其调控机理进行更深入的研究,以利于揭示金边杂种胡颓子叶色形成机理,并利用该变色机理为今后通过分子育种工作培育彩叶新品种胡颓子提供有力的参考依据。

参考文献:

- [1] 楼炉煥. 观赏树木学[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [2] 姜卫兵,庄 猛,韩浩章,等.彩叶植物呈色机理及光合特性研究进展[J]. 园艺学报, 2005, 32(2):352-358.
- [3] 王泽瑞. 彩叶树种的光合特性和呈色机理研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(22):13495-13497.
- [4] 彭国全,季梦成. 江西胡颓子属植物资源及开发利用研究[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(1):63-67.
- [5] ZHAO C L, GUO H C. Research advances in the subcellular organization of the enzymes catalyzing anthocyanins bioynthesis in higher plants [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2007, 27(8):1695-1701.
- [6] MASUDA T. Functional analysis of isoforms of NADPH: Protochlorophyllide Oxidoreductase (POR), PORB and PORC, in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant and Cell Physiology, 2003, 44(10): 963-974.
- [7] SANTIAGO-ONG, M S. GREEN R M, TINGAY S, et al. shygr1 is a mutant affected in multiple aspects of photomorphogenesis [J]. Plant Physiology, 2001, 126(2):587-600.
- [8] LICHTENTHALER H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes [J]. Methods in Enzymology, 1987, 148:350-382.
- [9] WANG L S, HASHIMOTO F, SHIRAISHI A, et al. Coloration and pigmentation of tree peony cultivars of the Northwest of China [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2000, 69(S2):233.
- [10] WU H Y, SHI N R, AN X Y, et al. Candidate genes for yellow leaf color in common wheat (*Triticum aestivum* L.) and major Related metabolic pathways according to transcriptome profiling [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(6): 1594-1619.
- [11] KLIMYUK V I, PERSELLO-CARTIEAUX F, HAVAUX M, et al. A chromodomain protein encoded by the arabidopsis *CAO* gene is a plant-specific component of the chloroplast signal recognition particle pathway that is involved in LHCP targeting [J]. Plant Cell, 1999, 11: 87-99.
- [12] CHEN G, BI Y R, LI N. EGY1 encodes a membrane-associated and ATP-independent metalloprotease that is required for chloroplast development [J]. Plant Journal, 2010, 41(3): 364-375.
- [13] SCHMID V H R. Light-harvesting complexes of vascular plants [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(22): 3619-3639.
- [14] CAZZONELLI C I, POGSON B J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants [J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(5):266-274.
- [15] 王平荣,张帆涛,高家旭,等.高等植物叶绿素生物合成的研究进展[J]. 西北植物学报, 2009, 29(3):629-636.
- [16] DEMMIG-ADAMS B, ADAMS III W W, DEMMING B, et al. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis [J]. Trends in Plant Science, 1996, 1(1):21-26.