

陈友根, 陈劲枫, 李为观, 等. 甜瓜属不同倍性异源多倍体光合特性及超微结构研究 [J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(1): 32-36

甜瓜属不同倍性异源多倍体光合特性及超微结构研究

陈友根^{1,2}, 陈劲枫^{1*}, 李为观¹, 崔利¹, 陈龙正¹

(1. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/园艺学院, 江苏 南京 210095;
2. 安徽农业大学园艺学院, 安徽 合肥 230036)

摘要: 以不同倍性的甜瓜属二倍体种间杂种 F_1 、异源三倍体和异源四倍体为试材, 比较了三者间光合特性和超微结构的差异。结果表明: 与种间杂种 F_1 相比, 异源四倍体的净光合速率 (P_n)、气孔导度 (G_s)、蒸腾速率 (T_r)、PS II 电子传递量子效率 ($\Phi PS II$) 和光化学猝灭系数 (qP) 显著升高, 并且叶绿体、线粒体、基粒和片层的数目也显著增多, 表现出明显的基因组剂量效应。异源三倍体的 P_n 、 G_s 、 $\Phi PS II$ 及线粒体和片层数目显著高于异源四倍体, 表现出明显的杂种优势。

关键词: 甜瓜属; 异源多倍体; 光合特性; 超微结构; 基因组剂量

中图分类号: S642.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2030 (2010) 01-0032-05

Photosynthetic characteristics and ultrastructure in *Cucumis* allopolyploids with different ploid levels

CHEN You-gen^{1,2}, CHEN Jin-feng^{1*}, LI Wei-guan¹, CUI Li¹, CHEN Long-zheng¹

(1. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Three germplasms with different ploidies from interspecific hybridization in *Cucumis* were investigated for the photosynthetic characteristics and ultrastructure difference caused by genome dosage. The results showed that net photosynthesis rate (P_n), stomatal conductance (G_s), transpiration rate (T_r), quantum efficiency of PS II photochemistry ($\Phi PS II$) and photochemical quenching (qP) in allotetraploid increased obviously compared to interspecific hybrid F_1 . In addition, the number of chloroplast, mitochondria, granule and lamella also increased significantly, which indicated genome dosage effects. Meanwhile, allotriploid had evident heterosis in P_n , G_s , $\Phi PS II$, the number of mitochondria and lamella. These results will be helpful for further investigation of the genome dosage effect in *Cucumis*.

Key words: *Cucumis*; allopolyploid; photosynthetic characteristics; ultrastructure; genome dosage

远缘杂交和多倍化是高等植物进化最重要的动力之一^[1]。据估计, 70% 以上的被子植物在进化过程中至少经历了一次多倍化事件^[2]。多倍体植物由于基因组组成、结构及基因表达方面的变化, 往往会产生不同的生理现象^[3]。如单倍体、二倍体和四倍体黄瓜叶绿素含量也随染色体倍性增加而增加^[4]; 四倍体白菜净光合速率高于二倍体^[5]; 不同倍性小麦在净光合速率、气孔导度、最大光化学效率和实际光化学效率等方面存在明显的差异^[6]。因此, 多倍体形成后的生理变化已成为研究的热点。

栽培黄瓜的遗传基础狭窄, 利用种内变异进行黄瓜育种已受到严重制约^[7]。前人利用野生黄瓜 (*Cucumis hystrix* Chakr., $2n=2x=24$) 与栽培黄瓜 (*Cucumis sativus* L., $2n=2x=14$) 进行种间杂交, 合成杂种 F_1 ($2n=2x=19$), 通过胚拯救和体细胞无性系变异加倍杂种 F_1 , 获得异源四倍体 (*Cucumis hytivus* Chen & Kirkbrid., $2n=4x=38$)^[8], 再与栽培黄瓜杂交获得异源三倍体 ($2n=3x=26$, HCC)^[9]。此前对这些不同倍性异源多倍体的离体保存^[10], 形态指标和生理特性与基因组剂量间的关系^[11]等方面进行过一些研究, 发现叶片厚度、主蔓直径等随着基因组剂量的增加而增加, 并且叶绿素含量、POD 活性及相关内源激素也随着基因组剂量的改变而变化。但对不同倍性异源多倍体光合作用及超微结构的

收稿日期: 2009-03-25
基金项目: 国家自然科学基金项目 (30470120, 30671419, 30700541); 国家高技术研究发展计划专项 (2006AA100108, 2006AA10Z108)
作者简介: 陈友根, 博士研究生。* 通讯作者: 陈劲枫, 教授, 从事蔬菜作物遗传育种与生物技术研究, E-mail: jfchen@njau.edu.cn。

比较研究尚未见报道。本试验选用甜瓜属 3 种不同倍性异源多倍体, 比较它们间光合作用和超微结构与基因组剂量的关系, 为多倍体基因组剂量效应及杂种优势利用提供理论依据, 也为倍性育种实践及深入研究多倍体相关基因表达机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为甜瓜属种间杂种 F_1 ($2n=2x=19$, HC)、异源三倍体 ($2n=3x=26$, HCC)、异源四倍体 ($2n=4x=38$, HHCC) 及亲本野生黄瓜 ($2n=2x=24$, HH) 和栽培黄瓜 ($2n=2x=14$, CC)。试验于 2008 年春季在南京农业大学园艺学院大棚中进行。种子处理后穴盘育苗, 两叶一心时移栽至装有基质 (草炭、蛭石、珍珠岩的体积比为 2 : 1 : 1) 的营养钵 (直径 25 cm) 中, 视天气情况和幼苗长势浇灌 1/2 日本园试配方营养液, 正常管理。待植株长至伸蔓期时, 选取生长较一致的植株, 对顶部下数第 5 片壮龄功能叶进行光合参数、叶绿素荧光参数测定及超微结构观察。采用完全随机区组设计, 3 次重复。

1.2 方法

1.2.1 光合参数测定 利用 Li-6400 光合仪 (美国 Li-COR 公司生产) 于上午 9:00 至 11:00 进行光合参数的测定, 测量净光合速率、气孔导度、胞间 CO_2 浓度和蒸腾速率。测定时光照强度控制在 $600 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 温度控制在 $(25 \pm 1) ^\circ C$, CO_2 浓度为大气 CO_2 浓度。

1.2.2 叶绿素荧光参数测定 利用 PAM2100 调制荧光仪 (德国 Walz 公司生产) 进行叶绿素荧光参数测定。叶片经过 30 min 充分暗适应, 然后照射测量光, 得到原初荧光 (F_o), 随后给一个饱和脉冲光 ($8\,000 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 0.8 s) 后关闭, 得到暗适应最大荧光 (F_m)。打开作用光 (设置 $600 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$), 待叶片光合作用达到稳态后得到光合稳态荧光 (F_s) 并记录, 打开饱和脉冲光 ($8\,000 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 0.8 s) 得到光化学作用下最大荧光 F_m' , 然后关闭作用光, 立即打开远红光, 约 6 s 后关闭, 得到光适应叶片的最小荧光 F_o' 。计算出暗适应下光系统 II (PS II) 最大光化学效率 (F_v/F_m) = $(F_m - F_o) / F_m$; PS II 光合电子传递量子效率 ($\Phi PS II$) = $(F_m' - F_s') / F_m'$; 光化学猝灭系数 (qP) = $(F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$; 非光化学猝灭系数 (qN) = $1 - (F_m' - F_o') / (F_m - F_o)$ 。

1.2.3 超微结构观察 沿叶片中部主脉两侧切取 1~2 mm 小块, 立即浸入 2.5% 戊二醛溶液 (pH 7.4), 抽气, 0 $^\circ C$ 下固定 24 h, 1% 锇酸固定 4 h, 0.1 mol $\cdot L^{-1}$ 磷酸缓冲液冲洗 3 次, 各级乙醇脱水: 梯度为 30%、50%、70%、80% 和 90%。环氧丙烷置换, 包埋于环氧树脂混合液中, 切片, 厚度 8 nm, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染, JEM100CX 电镜下观察。统计单个细胞内叶绿体数、线粒体数, 叶绿体中基粒数、片层数及淀粉粒数, 每个样品观察 10 个以上视野。

1.3 数据统计

试验结果均采用 SAS 软件中的 Duncan's 多重比较法 ($P < 0.05$) 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同倍性异源多倍体及亲本叶片光合作用参数比较

F_1 染色体加倍后获得了甜瓜属异源四倍体。由表 1 可知, F_1 净光合速率 (P_n)、气孔导度 (G_s) 和蒸腾速率 (T_r) 明显低于双亲; 但胞间 CO_2 浓度 (C_i) 显著升高。尽管异源四倍体与 F_1 仅存在基因组剂量的差异, 但其 P_n 、 G_s 和 T_r 明显升高, 而 C_i 显著降低。表明基因组剂量不仅改变了甜瓜属基因组组成, 也改变了异源多倍体的光合作用参数, 即 P_n 、 G_s 和 T_r 随着基因组剂量增大而增大, C_i 随着基因组剂量增大而减小。异源四倍体与栽培黄瓜杂交后获得异源三倍体。异源三倍体的 P_n 显著高于异源四倍体和栽培黄瓜, 杂种优势明显; 但 G_s 和 T_r 与双亲无显著差异 (表 1)。

2.2 不同倍性异源多倍体及亲本叶片叶绿素荧光参数比较

由表 2 可见, F_1 及其双亲最大光化学效率均保持在 0.800 左右, 它们间无显著差异。 F_1 的 $\Phi PS II$ 和 qP 显著低于双亲, qN 显著高于双亲。与 F_1 相比, 异源四倍体 F_v/F_m 、 $\Phi PS II$ 和 qP 显著升高, 显示出较强的基因组剂量效应。异源三倍体 F_v/F_m 与亲本间无明显差异, 但 $\Phi PS II$ 显著高于其双亲, 显示出一定的杂种优势。

表 1 甜瓜属不同倍性异源多倍体叶片光合作用参数

Table 1 Photosynthesis parameters of leaves of three allopolyploidy germplasms in *Cucumis*

异源多倍体 Allopolyploid	净光合速率/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) P_n	气孔导度/ ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) G_s	胞间 CO_2 浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$) C_i	蒸腾速率/ ($\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) T_r
种间杂种 F_1 Interspecific hybrid F_1	8.18±0.14 ^c	0.087±0.007 ^c	280.5±28.3 ^a	1.902±0.096 ^c
异源四倍体 Allotetraploid	10.49±0.36 ^c	0.141±0.013 ^{ab}	223.1±15.7 ^b	3.503±0.402 ^a
异源三倍体 Allotriploid	12.87±0.55 ^a	0.168±0.011 ^a	211.3±18.5 ^{bc}	3.849±0.344 ^a
野生黄瓜 <i>Cucumis hystrix</i> Chakr.	9.58±0.21 ^d	0.117±0.015 ^b	234.2±12.4 ^b	2.787±0.276 ^b
栽培黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	11.23±0.29 ^b	0.159±0.024 ^a	202.9±15.1 ^c	3.624±0.303 ^a

注：同列数据的不同字母表示在 5% 水平上差异显著。Different letters in the same column indicate significant difference at 5% level. The same as belows.

表 2 甜瓜属不同倍性异源多倍体叶片叶绿素荧光参数

Table 2 Chlorophyll fluorescence parameters of leaves of three allopolyploidy germplasms in *Cucumis*

异源多倍体 Allopolyploid	最大光化学效率 F_v/F_m	电子传递量子效率 $\Phi\text{PS II}$	光化学猝灭 qP	非光化学猝灭 qN
种间杂种 F_1 / Interspecific hybrid F_1	0.782±0.009 ^b	0.363±0.011 ^d	0.416±0.008 ^c	0.851±0.065 ^a
异源四倍体 Allotetraploid	0.825±0.006 ^a	0.491±0.055 ^b	0.588±0.051 ^{ab}	0.644±0.031 ^b
异源三倍体 Allotriploid	0.819±0.014 ^a	0.625±0.024 ^a	0.691±0.024 ^a	0.526±0.023 ^c
野生黄瓜 <i>Cucumis hystrix</i> Chakr.	0.795±0.170 ^{ab}	0.417±0.017 ^c	0.513±0.041 ^b	0.547±0.036 ^c
栽培黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	0.807±0.290 ^{ab}	0.529±0.029 ^b	0.629±0.072 ^a	0.654±0.043 ^b

2.3 不同倍性异源多倍体叶片超微结构比较

比较 3 种不同倍性异源多倍体超微结构发现（表 3，图 1），单个叶肉细胞中叶绿体数目 F_1 最少，且叶绿体膜结构模糊，叶绿体结构变化剧烈，内部产生较多空腔；异源四倍体和异源三倍体叶绿体数目显著提高，且叶绿体膜结构完整，内部结构清晰。与 F_1 相比，异源四倍体的单个叶肉细胞中线粒体数目增加了 60%，异源三倍体增加近 1 倍。单个叶绿体中基粒数目在 3 种材料间没有明显差异，但在 F_1 中，基粒排列混乱，结构无序，而异源四倍体和异源三倍体中基粒排列有序，结构整齐。基粒片层数目在 3 种不同倍性异源多倍体间存在显著差异， F_1 片层数最少，且片层扭曲，排列松散，呈断裂或解体状态；异源三倍体片层数最多，并且片层垛叠整齐，排列紧密，未见有解体现象出现。种间杂种 F_1 淀粉粒体积较大且数目较多，异源四倍体和异源三倍体淀粉粒体积较小且数目显著降低。

表 3 甜瓜属不同倍性异源多倍体叶片超微结构比较

Table 3 Ultrastructure of leaves of three allopolyploidy germplasms in *Cucumis*

异源多倍体 Allopolyploid	叶绿体数 Chloroplast	线粒体数 Mitochondria	基粒数 Granule	基粒片层数 Granule lamella	淀粉粒数 Starch grains
种间杂种 F_1 Interspecific hybrid F_1	8.3 ^b	5.8 ^c	8.3 ^{ab}	7.8 ^c	11.8 ^a
异源四倍体 Allotetraploid	11.5 ^a	9.3 ^b	10.2 ^a	10.8 ^b	6.8 ^c
异源三倍体 Allotriploid	12.3 ^a	11.5 ^a	9.5 ^a	13.4 ^a	9.7 ^b

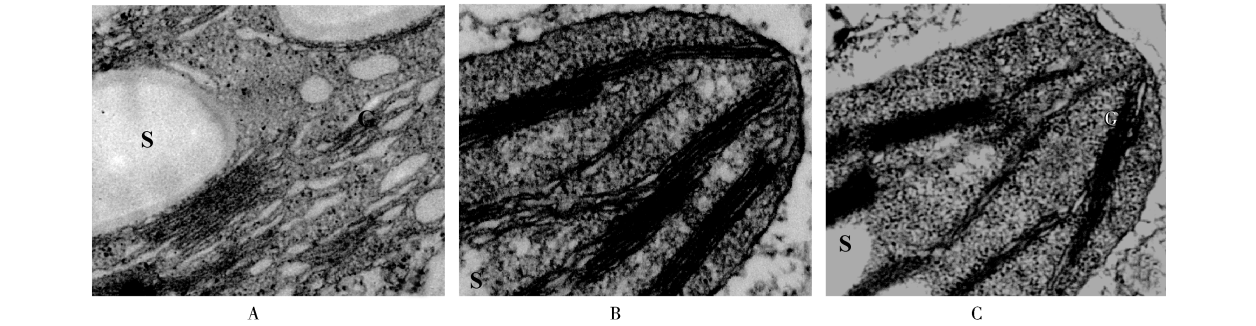


图 1 甜瓜属不同倍性异源多倍体叶片叶绿体超微结构

Fig. 1 Ultrastructure of chloroplast in leaves of three allopolyploidy germplasms in *Cucumis*

- 1) A. F_1 (×20 000); B. 异源三倍体 (×12 000) Allotriploid; C. 异源四倍体 (×12 000) Allotetraploid
- 2) S: 淀粉粒 Starch grain; G: 基粒 Granule

3 讨论

光合作用是植物生物产量形成和生理代谢的基础。本研究结果表明, 甜瓜属种间杂种 F_1 叶片 P_n 低于双亲。光合速率降低是由气孔或非气孔 (叶肉) 两方面因素引起, 判定依据为 G_s 和 C_i 变化方向, 只有两者同时下降的情况下, 才能证明 P_n 下降是由气孔因素引起的, 如果 G_s 下降, C_i 不变或上升, 则光合速率下降则是由叶肉细胞同化能力降低等非气孔因素所致^[12]。本研究中 F_1 的 G_s 下降, 而 C_i 上升, 可判断 F_1 的 P_n 下降是由非气孔因素引起的。这与董德坤等^[13] 对芸薹属两个亚种间杂种研究结果相反, 究其原因可能是甜瓜属种间杂交时两亲本遗传背景差异较大, 杂交后其基因表达调控受到不同基因组相互作用的影响, 也可能是受到 DNA 甲基化、核仁显性或其他作用的影响所致^[13], 这一点从其超微结构图中有所体现, 但具体原因还有待于进一步深究。

叶绿素荧光参数中 F_v/F_m 可代表 PS II 原始光能转化效率, 其下降表明 PS II 反应中心受到损伤, 植物受到光抑制^[14]。本研究中, F_1 及其双亲间 F_v/F_m 无显著差异, 表明甜瓜属种间杂交过程中, 不同基因组的相互作用未造成 PS II 反应中心损伤, 植株未受到光抑制。 $\Phi PS II$ 和 qP 代表光能捕获效率及光合电子传递速率, 其下降表明 ATP、NADPH 等同化力形成减弱, 电子传递速率减慢^[15]。本研究中, F_1 的 $\Phi PS II$ 和 qP 均低于双亲, 说明种间杂交过程中, 因不同基因组间的相互作用影响到植株对光能的捕获、同化及电子的传递。 qN 则反映 PS II 天线色素吸收的光能中不能用于光化学电子传递而以热的形式耗散的部分, 较高的 qN 有助于耗散过剩的激发能, 对光合机构起一定的保护作用^[14]。本研究中, F_1 具有较高的 qN , 说明其在电子传递受阻、同化力减弱的情况下, 迫使植株将过剩的激发能量以热的形式耗散出去, 保护光合机构, 避免植株受到光抑制。

异源四倍体基因组是种间杂种 F_1 基因组的 2 倍。异源四倍体的 P_n 、 F_v/F_m 、 $\Phi PS II$ 和 qP 显著高于 F_1 , 这与前人报道异源四倍体在植株叶面积、叶片厚度、主蔓直径等方面随着染色体加倍而增加相一致。Ni 等^[16] 在拟南芥中的研究表明, 异源多倍体植物似乎能通过可逆调整生物节律时钟调控因子而从生理及代谢通道的控制中获得优势。本研究结果也与此观点相符, 即甜瓜属 F_1 的 P_n 、 F_v/F_m 、 $\Phi PS II$ 和 qP 等可通过染色体加倍增大, 这与对白菜^[5] 和小麦^[6] 的研究结果相一致。从超微结构图中也可以看出, 种间杂种 F_1 淀粉粒体积甚大, 将基粒片层挤至叶绿体内膜边缘, 基粒片层分散, 内部存在较多空腔, 这不利于 P_n 、 $\Phi PS II$ 和 qP 的提高。异源四倍体叶绿体数、线粒体数和基粒片层等数目显著增加, 且排列整齐, 分布均匀, 表明其具有良好的光合性能。

异源三倍体基因组比种间杂种 F_1 多一个拷贝的“C”基因组, 比异源四倍体少一个拷贝的“H”基因组。基因组间的差异导致异源三倍体的 P_n 、 $\Phi PS II$ 和 qP 显著高于异源四倍体和种间杂种 F_1 , 也显著高于原始亲本栽培黄瓜和野生黄瓜, 显示出较强的杂种优势, 其超微结构图清晰完整。前人研究表明, 在杂交植物中与光合作用和代谢有关的基因表达加强^[16]。异源三倍体基因组中, “C”拷贝的基因组占 2/3, “H”拷贝的基因组占 1/3; 在异源四倍体和种间杂种 F_1 基因组中“C”和“H”拷贝的基因组各占 1/2。“H”基因组来自于野生黄瓜, “C”基因组来自于栽培黄瓜。野生黄瓜采集于西双版纳原始森林中, 长期的阴湿环境造成其耐弱光特性, 其 P_n 显著低于栽培黄瓜。但异源三倍体光合优势是否因基因组拷贝比例差异引起还应从分子水平上进行研究。

参考文献:

[1] Masterson J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms [J]. Science, 1994, 264: 421-424

[2] Soltis D E, Soltis P S, Tate J A. Advances in the study of polyploidy since plant speciation [J]. New Phytologist, 2003, 161: 173-191

[3] Peng Hai, Zhang Jing, Wu Xianjun. The ploidy effects in plant gene expression: progress, problems and prospects [J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2008, 51(4): 295-301

[4] 雷春, 陈劲枫, 张晓青, 等. 不同倍性黄瓜的形态和一些生理系列化指标比较 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(4): 471-474

[5] 侯喜林, 徐明宇, 张蜀宁. 白菜不同倍性材料间光合特性差异分析 [J]. 园艺学报, 2006, 33(6): 1338-1340

[6] 刘建辉, 孙建云, 戴廷波, 等. 不同小麦进化材料生育后期光合特性和产量 [J]. 植物生态学报, 2007, 31(1): 138-144

[7] Staub J E, Serquen F C, Horejsi T, et al. Genetic diversity in cucumber (*Cucumis sativus* L.). IV. An evaluation of Chinese germplasm [J]. Genetics Resources and Crop Evolution, 1999, 46(3): 297-310

[8] Chen Jinfeng, Kirkbride H Jr. A new synthetic species of *Cucumis*(Cucurbitaceae) from interspecific hybridization and chromosome doubling [J]. Brittonia, 2000, 52(4): 315 – 319

[9] Chen Jinfeng, Luo Xiangdong, Staub J E, et al. An allotriploid derived from an amphidiploid×diploid mating in *Cucumis*. I : production, micropropagation and verification [J]. Euphytica, 2003, 131: 235 – 241

[10] 罗向东, 陈劲枫, 钱春桃. 甜瓜属种间杂交中 3 种不同倍性资源的微繁 [J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(5): 549 – 552

[11] 罗向东, 戴亮芳, 钱春桃, 等. 黄瓜属不同倍性异源多倍体的形态及生理特性分析 [J]. 西北植物学报, 2008, 28(3): 542 – 546

[12] 朱士农, 郭世荣, 张爱慧, 等. NaCl 胁迫对西瓜嫁接苗叶片抗氧化酶活性及光合特性的影响 [J]. 西北植物学报, 2008, 28(11): 2285 – 2291

[13] 董德坤, 师恺, 曹家树. 芸薹属两个亚种间杂种光合作用优势及其机理 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(12): 2804 – 2810

[14] 史庆华, 朱祝军, Al-aghabary K, 等. 等渗 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 NaCl 胁迫对番茄光合作用的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(2): 188 – 191

[15] 朱进, 别之龙. 盐胁迫对 3 种黄瓜砧木幼苗光合特性的影响 [J]. 园艺学报, 2007, 34(6): 1418 – 1424

[16] Ni Zhongfu, Kim E D, Ha M, et al. Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids [J]. Nature, 2009, 457(1): 327 – 333

责任编辑：范雪梅