

不同倍性黄瓜的形态和一些生理生化指标比较

雷春 陈劲枫* 张晓青 陈丽娟 张永兵

南京农业大学园艺学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095

提要 由同一基因型产生的单倍体、二倍体和四倍体黄瓜的叶面积和花大小等形态性状、单位面积叶绿素含量和苹果酸脱氢酶(MDH)表达量等生理生化指标随染色体倍性的增加而增加, 过氧化物酶(POD)活性则随倍性的增加而降低, 剂量效应明显; 其他形态指标和可溶性蛋白含量等与染色体倍性无明显相关性。

关键词 黄瓜; 单倍体; 四倍体; 基因剂量

Morphologies and Several Physiological and Biochemical Indexes of Cucumbers (*Cucumis sativus* L.) with Different Ploidies

LEI Chun, CHEN Jin-Feng*, ZHANG Xiao-Qing, CHEN Li-Juan, ZHANG Yong-Bing

State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract Haploid, diploid and tetraploid cucumbers (*Cucumis sativus* L.) developed from the genotype 'Jinlvshiao' were used as experimental materials. The results showed that leaf and flower size, chlorophyll content and malate dehydrogenase (MDH) electrophoretogram intensity increased and peroxidase (POD) activity decreased as the genome doubled, indicating significant gene dosage effect. The other morphological traits and soluble protein content showed no significant relation to ploidy levels.

Key words cucumber (*Cucumis sativus* L.); haploid; tetraploid; gene dosage

有关黄瓜(*Cucumis sativus* L.)形态和生理生化指标的报道很多, 但大多集中在黄瓜二倍体物种上^[1], 由同一基因型产生的不同染色体倍性即单倍体、二倍体和四倍体黄瓜为试材进行比较的研究尚未见报道。本文初步探讨了不同倍性黄瓜形态和某些生理生化指标与染色体倍性之间的关系。

材料与方 法

二倍体黄瓜(*Cucumis sativus* L.)品种“津绿4号”的单倍体是用辐射花粉授粉进而进行幼胚拯救获得的^[2], 其四倍体是用秋水仙素水溶液浸萌动的种子加倍而来^[3]。不同倍性黄瓜于2003年10月种植于本校试验地。各随机挑选3株进行形态学观察和各种植株测定分析。

植株长出2片真叶后, 取长0.5~1.0 cm的幼嫩卷须, 参照陈劲枫等^[4]方法进行有丝分裂染色体制片; 按照文献5的方法, 每株至少统计30个分生细胞的中期染色体, 以确定植株的染色体数目。

盛花期时测量植株第3、5、7、9节上的节间长、茎粗、叶长、叶宽、叶柄长等指标; 每

株分别取3朵当天开放的雌、雄花, 测量花萼长、花瓣长和花瓣宽; 授粉20 d后测瓜长、瓜粗并计算瓜形指数(瓜长/瓜粗)。

从上往下取第4片功能叶, 用打孔器打取没有叶脉的小圆叶片, 测其叶面积并称重。采用丙酮: 无水乙醇: 水=4.5:4.5:1的提取液提取至叶片发白, 用722型分光光度计分别测定波长645和663 nm处的光吸收值。鉴于西瓜上用鲜重和叶面积分别作单位测叶绿素含量时变化趋势不同^[6], 本文分别计算了单位鲜重和单位叶面积的叶绿素含量, 计算公式为: 叶绿素a含量=12.21×OD₆₆₃-2.81×OD₆₄₅, 叶绿素b含量=20.13×OD₆₄₅-5.03×OD₆₆₃。同时, 采用愈创木酚法^[7]测定过氧化物酶(peroxidase, POD)活性, 用考马斯亮蓝G-

收稿 2004-11-16 修定 2005-03-20

资助 国家高技术研究发展计划专项经费(2002AA241251、2002AA207012、2004AA241120)、国家自然科学基金(30470120)、教育部跨世纪优秀人才培养计划。
*通讯作者(E-mail: jfchen@njau.edu.cn, Tel: 025-84396279)。

250 法测定可溶性蛋白质含量^[8]。试验均重复 3 次, 数据采用 SPSS 软件进行 LSD 测验。

取茎顶端刚展开的幼嫩叶片提取粗酶液, 进行苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)电泳。样品制备、电泳、染色方法、谱带记录分析参考文献 9 并做了如下改动: 分离胶浓度 10%; 开始电压 100 V, 进入分离胶后电压调为 180 V, 凝胶染色 0.5 h。酶谱带相对迁移率(R_f)=酶带迁移率 / 溴酚蓝迁移率。

实验结果

1 形态特征比较

单倍体(H)、二倍体(D)、四倍体(T)黄瓜的染色体数目分别为 7、14、28 (图 1-c), 在形态上差异很大(表 1)。单倍体明显“微型化”, 茎、叶、花、瓜等形态指标的测量值均明显小于二倍体和四倍体, 如蔓约为二倍体 1/2、叶仅为二倍体的 1/3, 差异极显著($\alpha=0.01$)。四倍体植株的部分器官表现出“巨大性”, 叶面积、雌雄花大小均比二倍体的大, 差异显著($\alpha=0.05$)或极显著。但是, 四倍体的节间长、茎粗、瓜长、瓜粗等指标与二倍体相比差异不显著, 叶柄长和果型指数均比二倍体小, 差异极显著。另外还观察到, 随着染色体成倍性增加, 叶片逐渐变厚, 叶缘逐渐变皱褶, 叶色逐渐加深(图 1-a)。随着倍性

增加, 3 种材料的雌花、二倍体和四倍体的雄花逐渐变大, 花瓣表面和边缘逐渐变皱折, 花色渐深(图 1-b)。单倍体的雄花在开放前黄化败育。四倍体雌花子房上的果刺比二倍体的粗密, 而单倍体的则较细疏(图 1-b)。与二倍体和单倍体相比, 四倍体果实成熟后具有明显的果棱。

2 叶绿素含量比较

以单位叶面积计算的叶绿素含量随倍性增加而增加, 叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素的含量均是四倍体最高, 二倍体次之, 单倍体最低。其中, 四倍体与二倍体之间, 除了叶绿素 b 的含量差异显著外, 叶绿素 a 和总叶绿素的含量差异均达极显著水平, 二倍体和单倍体之间叶绿素 a、b 及总含量之间的差异不显著。叶绿素 a/b 的值单倍体最高, 四倍体居中, 二倍体的最低。其中, 二倍体和四倍体之间无显著差异, 但两者均显著低于单倍体(表 2)。但以单位鲜重计算的叶绿素含量没有呈现出随着染色体倍性增加而增大的现象, 单倍体与四倍体之间没有显著差异, 并且都低于二倍体。

3 POD 活性和可溶性蛋白含量比较

从表 3 可以看出, 随着倍性的增加, POD 活性降低, 单倍体明显高于二倍体和四倍体, 差异极显著; 四倍体的活性最低, 但与二倍体差异不显著。单倍体和四倍体之间可溶性蛋白含量差异

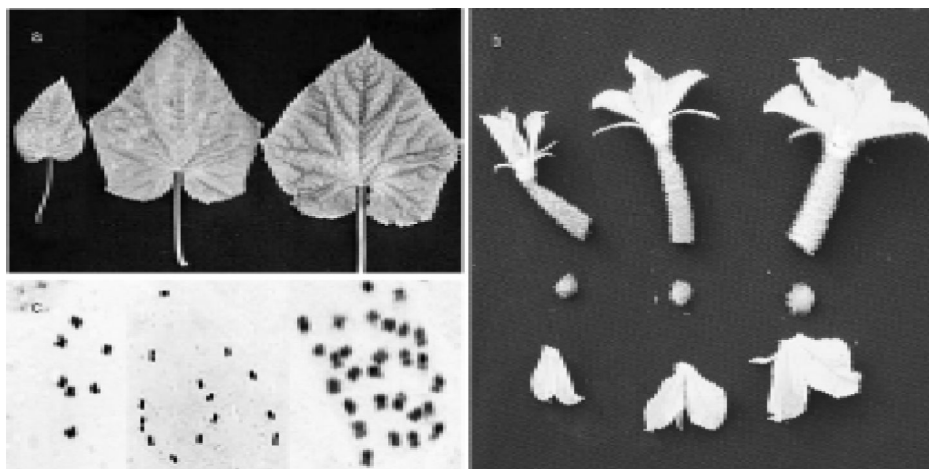


图1 不同倍性黄瓜的染色体计数和部分形态学比较

Fig.1 Comparisons of chromosome number and some morphological traits among cucumbers with different ploidy levels

a: 叶形态(左:单倍体;中:二倍体;右:四倍体);b:雌花形态(左:单倍体;中:二倍体;右:四倍体);c:染色体计数(左:单倍体;中:二倍体;右:四倍体)。

表1 不同倍性黄瓜形态特征比较
Table 1 Comparisons of morphological characters among cucumbers with different ploidies

材料	茎		叶		雄花		
	节间长	茎粗	叶长×叶宽	叶柄长	萼片长	花瓣长	花瓣宽
单倍体	6.12 ^{bb}	0.38 ^{bb}	7.32×6.78 ^{cc}	6.44 ^{cc}	—	—	—
二倍体	14.91 ^{aa}	0.63 ^{aa}	20.80×15.90 ^{bb}	13.80 ^{aa}	0.70 ^{bb}	1.51 ^{bb}	1.10 ^{bb}
四倍体	13.22 ^{aa}	0.62 ^{aa}	22.14×15.90 ^{aa}	11.10 ^{bb}	1.00 ^{aa}	2.36 ^{aa}	1.80 ^{aa}

材料	雌花			果实		
	萼片长	花瓣长	花瓣宽	果长	果粗	果形指数
单倍体	0.30 ^{bb}	1.50 ^{cb}	0.70 ^{bb}	12.50 ^{bb}	3.10 ^{bb}	4.03 ^{cc}
二倍体	1.48 ^{aa}	1.85 ^{ba}	1.41 ^{aa}	33.85 ^{aa}	3.93 ^{aa}	8.75 ^{aa}
四倍体	1.77 ^{aa}	2.30 ^{aa}	1.61 ^{aa}	31.60 ^{aa}	4.93 ^{aa}	6.47 ^{bb}

小写字母表示在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著, 大写字母表示在 $\alpha=0.01$ 水平上差异显著。

表2 不同倍性黄瓜的叶绿素含量比较
Table 2 Comparisons on chlorophyll contents among cucumbers with different ploidies

材料	叶绿素a含量		叶绿素b含量		总叶绿素含量		
	单位鲜重 / mg·g ⁻¹ (FW)	单位叶面积 / mg·m ⁻²	单位鲜重 / mg·g ⁻¹ (FW)	单位叶面积 / mg·m ⁻²	单位鲜重 / mg·g ⁻¹ (FW)	单位叶面积 / mg·m ⁻²	叶绿素a /b
单倍体	1.78 ^{bb}	367.00 ^{bb}	0.55 ^{bb}	113.00 ^{bb}	2.33 ^{bb}	481.00 ^{bb}	3.24 ^a
二倍体	2.35 ^{aa}	356.00 ^{bb}	0.84 ^{aa}	127.00 ^{ba}	3.19 ^{aa}	483.00 ^{bb}	2.8 ^{bb}
四倍体	1.80 ^{bb}	446.00 ^{aa}	0.60 ^{bb}	148.00 ^{aa}	2.40 ^{bb}	594.00 ^{aa}	3.00 ^{ab}

小写字母表示在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著, 大写字母表示在 $\alpha=0.01$ 水平上差异显著。

表3 不同倍性黄瓜功能叶的POD活性和
可溶性蛋白含量的比较

Table 3 Comparisons on POD activity and soluble protein contents among cucumbers with different ploidies

材料	POD/ U·min ⁻¹ ·g ⁻¹ (FW)	可溶性蛋白/ mg·g ⁻¹ (FW)
单倍体	27.32 ^{aa}	26.54 ^{bb}
二倍体	7.19 ^{bb}	30.00 ^{aa}
四倍体	6.73 ^{bb}	27.59 ^{ba}

小写字母表示在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著, 大写字母表示在 $\alpha=0.01$ 水平上差异显著。

不显著, 二倍体最高, 比单倍体高约 13%, 差异极显著, 比四倍体的高约 8.7%, 差异显著。

4 MDH 同工酶酶谱比较

单倍体与二倍体、四倍体之间的 MDH 同工酶酶谱有明显的差异(图2)。MDH-1、MDH-2 和

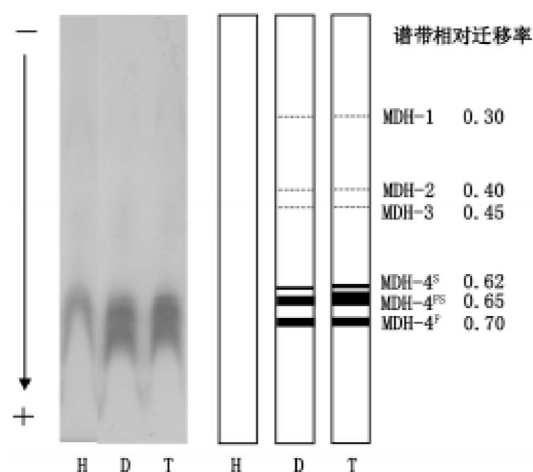


图2 不同倍性黄瓜 MDH 同工酶电泳图谱
Fig. 2 MDH isozyme electrophoretogram of cucumbers with different ploidies
H: 单倍体; D: 二倍体; T: 四倍体。

MDH-3 三条酶带为三者共有。在 MDH-4 位点上, 单倍体纯合, 仅表现 1 条慢带 (MDH-4^S), 二倍体和四倍体均杂合, 除了呈现慢带 (MDH-4^S) 外, 还有 1 条快带 (MDH-4^F) 和 1 条“杂种带”(MDH-4^{FS})。另外, 还可以看出, 不同倍性黄瓜在 MDH-4 这一位点上的表达量不同, 表达量随着倍性的增加而增强。对 MDH-4^S 而言, 单倍体和二倍体差异不明显, 但低于四倍体, 对 MDH-4^{FS} 来说, 二倍体的表达量明显低于四倍体。但两者的 MDH-4^F 差异不明显。

讨 论

一般认为, 染色体组数量增加导致基因拷贝数增加, 基因转录产物量发生变化, 性状和代谢物质的数量和质量也必然发生变化。本文结果表明, 在形态上, 单倍体器官表现“微型化”, 四倍体某些器官表现“巨大性”, 单位面积的叶绿素 a、b 及其总含量、MDH 的表达量均随着倍性增加而增加, 这在一定程度上体现出基因的剂量效应。POD 等保护酶是植物体内自由基的有效清除剂^[10], 它在逆境胁迫下和衰老过程中可清除过量的自由基, 维持代谢平衡, 保护细胞的正常结构, 因而植物能在一定程度上忍耐、减缓和抗御逆境胁迫, 延缓植物器官的衰老过程。我们在实验中看到, 单倍体的 POD 活性最高, 四倍体的最低, 表明随着倍性的增加, 黄瓜对逆境的缓冲能力逐渐增强, 这也在一定程度上体现了基因的剂量效应。然而, 我们同时也观察到: 四倍

体的某些形态性状、叶绿素 a/b 值和可溶性蛋白含量并没有随着倍性的增加而表现出简单的上升或下降的线性相关, 这同前人在水稻上的结论^[11]相似, 表明基因的表达量并不始终与剂量呈线性相关。

总之, 从单倍体到四倍体, 黄瓜植株的生长量从“微型化”向“巨大性”发展过程中, 单位叶面积内叶绿素含量增加和抗逆性酶 POD 活性随着倍性增加而降低的现象是黄瓜多倍体育种中值得考虑的参数。

参考文献

- 1 张衍鹏, 于贤昌, 张振贤等. 日光温室嫁接黄瓜的光合特性和保护酶活性. 园艺学报, 2004, 31(1): 94~96
- 2 雷春, 陈劲枫, 钱春桃等. 辐射花粉授粉和胚培养诱导产生黄瓜单倍体植株. 西北植物学报, 2004, (9): 1739~1743
- 3 陈劲枫, 雷春, 钱春桃等. 黄瓜多倍体育种中同源四倍体的合成和鉴定. 植物生理学通讯, 2004, 40(2): 149~152
- 4 陈劲枫, 钱春桃. 利用几种园艺作物卷须制片鉴定染色体数目的研究. 园艺学报, 2002, 29(4): 378~380
- 5 李懋学, 张赞平. 作物染色体及其研究技术. 北京: 中国农业出版社, 1996. 235~238
- 6 刘文革, 阎志红, 王鸣. 不同染色体倍性西瓜光合色素的研究. 中国西瓜甜瓜, 2003, (1): 1~3
- 7 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000. 164~165
- 8 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000. 184~185
- 9 纪颖彪, 朱其杰. 同工酶分析在黄瓜杂种一代纯度检测上的应用研究. 园艺学报, 1995, 22(3): 251~255
- 10 陈少裕. 膜脂过氧化对植物细胞的伤害. 植物生理学通讯, 1991, 27(2): 84~90
- 11 傅亚萍, 颜红岚, 李玲芳等. 不同染色体倍性水稻植株光合特性的研究. 中国水稻科学, 1999, 13(3): 157~160