

强光胁迫下农田人参不同表型种质抗性评价

陈佳颖^{1,2}, 王业², 徐福荣¹, 李西文^{1,2*}

(1. 云南中医药大学中药学院, 昆明 650500; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:探究农田栽培模式下不同表型人参对强光胁迫的生理响应,为农田参新品种选育和田间精细管理提供理论支撑。方法:以4年生不同茎色人参植株为试验材料,无色透光薄膜代替蓝膜进行强光胁迫,考察人参叶片生长状态、叶片光响应曲线、光合和荧光等参数变化,同时分析胁迫前后叶片超微结构特征,比较不同表型人参对强光生理适应性及细胞超微结构差异。结果:在强光胁迫下,人参叶色变浅,叶绿素含量大幅减少,叶缘出现“灼烧”现象。紫茎人参最大净光合速率和光饱和点均大于绿茎人参;紫茎人参蒸腾速率和水分利用率等气体交换参数具有逆境优势;光合电子传递速率、最大光化学效率、光化学猝灭系数等叶绿素荧光参数均高于绿茎人参。2种种质超微结构均有变化,绿茎人参质壁分离现象更加明显,叶绿体膜破裂,内含物外渗,淀粉粒、嗜银小体累积数量增多;紫茎叶绿体膜结构相对稳定,多泡体数目强光下比绿茎增加显著。结论:强光胁迫下不同茎色的农田人参叶片生长均受到抑制,绿茎人参受强光胁迫后光合效率大幅下降,叶绿体完整性受到破坏,对逆境的生理抵抗性较弱。紫茎人参通过自身特殊的细胞构造和非光化学猝灭优势,减缓了强光胁迫对植株光合系统的破坏,可培育成抗逆新品种。

[关键词] 人参; 农田栽参; 叶绿素荧光; 超微结构; 光合作用; 抗逆新品种; 光胁迫

[中图分类号] S567.5+1;R931;R282;P575.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)20-0121-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211349

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210331.1715.006.html>

[网络出版日期] 2021-04-01 10:06

Resistance Evaluation of Different Phenotypes of Farmland Ginseng Radix et Rhizoma Germplasm Under High Light Stress

CHEN Jia-ying^{1,2}, WANG Ye², XU Fu-rong¹, LI Xi-wen^{1,2*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the physiological response of Ginseng Radix et Rhizoma with different phenotypes to high light stress under farmland cultivation mode, and to provide theoretical support for breeding of and fine management of new varieties of farmland ginseng. **Method:** Four-year-old ginseng plants with different stem colors were used as materials, and blue film was replaced by the colorless and translucent film for performing high light stress and investigating the change of growth status, light response curve, photosynthetic and fluorescence parameters of ginseng leaves. Meanwhile, the physiological adaptability and cell ultrastructural differences of ginseng with different phenotypes for strong light were compared by analyzing the variation of leaf ultrastructural characteristics before and after the stress. **Result:** The color of ginseng leaves became weak and the content of chlorophyll was greatly decreased with burning phenomenon on the leaf margin under high light stress. The maximum net photosynthetic rate and light saturation point of purple-stem ginseng

[收稿日期] 20210217(014)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2017YFC1702100, 2019YFC1710601); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09201005-006-001)

[第一作者] 陈佳颖, 硕士, 从事中药优良种源选育研究, E-mail: 1218239489@qq.com

[通信作者] * 李西文, 副研究员, 博士生导师, 从事品质中药材栽培及育种研究, E-mail: xwli@icmm.ac.cn

were higher than those of green-stem ginseng. Transpiration rate, water use efficiency and other gas exchange parameters of purple-stem ginseng had adversity advantages, photosynthetic electron transport rate, maximum photochemical efficiency, photochemical quenching coefficient and other chlorophyll fluorescence parameters were higher than those of green-stem ginseng. There were changes in ultrastructure of the two germplasm, and the plasmolysis of green-stem ginseng was more obvious, its chloroplast membrane ruptured, the contents were exuded and the accumulation of starch grains and osmiophilic bodies increased. The chloroplast membrane structure of purple-stem germplasm was relatively stable, and its number of multivesicular bodies increased significantly by comparing with that of green-stem ginseng under high light. **Conclusion:** High light stress inhibits the leaf growth of farmland ginseng with different stem colors. The photosynthetic efficiency of green-stem ginseng is obviously reduced, and the integrity of chloroplast is damaged, leading to the weak physiological resistance. The purple-stem ginseng can reduce the damage of the photosynthetic system of plants under high light stress by its special cell structure and non-photochemical quenching advantages. Therefore, the purple-stem ginseng can be cultivated into a new resistant variety.

[Keywords] Ginseng Radix et Rhizoma; farmland planting ginseng; chlorophyll fluorescence; ultrastructure; photosynthesis; new varieties of stress resistance; light stress

人参 *Panax ginseng* 为多年生草本植物,起源于新生代第三纪,是一种古老的孑遗植物。我国早在西晋时期,已有“秧参”栽植的记载,距今有1 600余年^[1]。现今我国已成为人参的主产国,产量和栽培面积均居世界首位,吉林省产量占全国的85%^[2]。人参富含四环三萜达玛烷型皂苷类成分,是人参属中的代表性植物,具有抗肿瘤、肝肾保护、神经保护、免疫调节等生物活性^[3],可作为食品、药品、化妆品等的原材料。我国自1950年代开始进行人参的育种工作,在人参种质资源和品种选育方面取得显著成效^[4],但与农作物育种研究相比基础还十分薄弱,尤其是农田参新品种选育尚处于起步阶段。

2012年人参被批准作为市场上流通的新资源食品,国内外市场需求增加显著,但传统的伐林栽参模式已成为人参产业可持续发展的瓶颈,对生态环境保护造成了沉重的负担,国务院明令禁止林业部门新批伐林栽参用地。2015年4月1日《吉林省人参产业条例》正式实施,人参药材生产逐步向非林地种植发展。我国人参主产地在吉林、辽宁、黑龙江三省,可耕种土地面积大,农田栽参可解决伐林栽参引起的多种生态问题^[5],是解决当前人参林地资源紧张和市场供需矛盾较为有效的方法。然而,农田土有机质含量低、孔隙度小,土壤肥力较差^[6],栽培的人参产量大幅减少,且品质下降、抗逆性差,亟需选育适合农田生长环境的人参种质,以满足人参产业健康发展的需求。人参为阴生植物,野生人参多生于林下。在农田生产实践中,通过人工搭建拱形蓝膜遮荫棚用以调节光强(透光率实测

值 $\approx 13.62\%$),模拟人参自然生长环境。经实地调查发现,因存在棚内通风降温、参农日常打理、不同株龄调光及不同时间光线照射角度等问题,遮荫膜通常遮盖不完全,导致棚向阳边缘生长的植株遮荫受限,10%~20%的参苗常遭受不同程度的强光胁迫,轻者叶片发黄萎蔫干枯,重者地上部分死亡,极大影响了人参植株的存苗率和产量,抗强光种质选育迫在眉睫。另外,农田与林下土壤理化性质不同,对光的漫反射有差异,棚下光照有变化,对传统遮荫的方式也需要相应调整。人参种质资源的筛选是新品种选育及其改良的基础,是保证人参药材品质和产业化发展的前提^[4]。目前,人参种质评价多针对不同种质来源的初生或次生代谢产物进行比较研究^[7],也有文献报道分析其生物学和遗传特性^[8]。人参逆境生物学研究(如高光胁迫等)多集中在化学成分及光合产物等方面^[9-11],对于从超微结构等角度的表型组学方面的逆境研究鲜有报道。叶绿素荧光标记等技术作为研究药用植物光合作用的探针,可作为研究中药材来源植物逆境胁迫表型的有力工具,实现优质药用植物表型的快速筛选,在人参优良种质筛选和评价中具有广阔的发展前景^[12]。

为筛选适宜农田栽培模式下的优良种质,课题组前期完成了不同茎色人参种质的筛选、纯化工作,以保证遗传背景的单一性。本实验在前人的研究基础上,从表型组学的角度,对不同茎色的人参植株进行强光胁迫,分析其在逆境下叶形、生理、叶绿素荧光参数及叶片超微结构变化,发现紫茎人参

在强光下表现出较强的适应性,可为紫茎农田人参新品种选育和推广种植提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 研究团队前期构建了农田栽培模式下人参种质资源圃,发现人参植株茎色存在多样性,有紫茎、绿茎及各种杂色群体,其中纯紫茎人参植株随着种植年限增加保苗率最高,且比例逐年增加,而纯绿茎的种质光合效率高,但存苗率较低。从种质圃中随机选取根质量大小基本一致、无病虫害的4年生紫茎和绿茎人参植株各30株,经中国中医科学院中药研究所李西文副研究员鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng*,多菌灵消毒后,移栽至圆形塑料花盆中(直径35 cm),放置于大田蓝膜遮荫棚中,用于胁迫试验。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 试验于吉林省靖宇县试验基地(126.8°E,42.39°N)进行,在无树木遮挡的试验区空地,用无色透明遮荫膜搭建遮荫棚。待人参进入营养生长旺期(7~8月份),从大田遮荫棚中选取长势一致的不同种质人参盆栽各30株(其中10株作为对照),生长条件同大田人参栽培条件(黑色圆丝扁丝交织网+蓝色遮荫膜),平均实测光合有效辐射(PAR)强度 $270 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$;试验组放置于无色透明遮荫棚内,平均实测 PAR 强度 $1\ 250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。对照组、试验组水分和肥料管理与大田生产一致。见图1。



图1 人参种质筛选试验田

Fig. 1 Experimental field for selection of ginseng germplasm

1.2.2 光响应曲线和光合指标测定 选择无风无云或少云的晴天,确保试验时太阳光强度相对稳定。上午8:00~11:00,采用LI-6800型便携式光合仪(美国LI-COR公司)对选取的人参掌状复叶中间最大叶片的中上部进行测量,夹取时避开叶脉。模

拟 PAR 强度设置为 1 000, 600, 300, 200, 180, 150, 120, 100, 80, 50, 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。Photosynthesis 1.0.0.770 软件采用非直角双曲线模型拟合光响应曲线,计算最大净光合速率(P_{max}),光饱和点(LSP)和光补偿点(LCP)。

模拟 PAR 采用内置红蓝光源进行控制,设置为光响应曲线测得的 LSP($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)。采用二氧化碳(CO_2)钢瓶控制叶室 CO_2 浓度,具体数值设置为 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$;通过叶室风扇控制叶室温度,设置为 $29\text{ }^\circ\text{C}$;叶室相对湿度设置 55%,叶室内气体流速 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ 。气体交换参数主要包括净光合速率(P_n),胞间 CO_2 浓度(C_i),蒸腾速率(E),气孔导度(G_s)等。下午 12:30~16:00,利用仪器内置红蓝光源,待测叶片在目标光源下充分光适应后,测量光适应下的叶绿素荧光参数,主要包括光系统 II 实际光化学效率(Φ_{psII}),光合电子传递速率(ETR),非光化学猝灭系数(NPQ)和光化学猝灭系数(qP)等;而后采用锡箔纸包住同一叶片,将叶片充分暗适应 20 min,测量暗适应下的叶绿素荧光参数并计算最大光化学效率(F_v/F_m)。

1.2.3 逆境下叶片叶绿素含量测定 分别取胁迫前后的紫茎和绿茎种质对照组与试验组植株叶片,将人参叶片剪碎,混匀,叶绿素提取采用 95% 乙醇提取法。用 T6 新世纪型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)于 665, 649, 470 nm 测定吸光度 A , 计算叶绿素 a, 叶绿素 b 和类胡萝卜素含量。

1.2.4 逆境下叶片超微结构 采集植株中部功能叶片,取主叶脉两侧部分,用刀片切成 $5\text{ mm}\times 5\text{ mm}$ 的小方块,将其放在 2 mL 离心管中,加入磷酸盐缓冲液(PBS, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.2~7.4, 下同)配制的 2.5% 戊二醛,固定 2 h 以上,用 PBS 漂洗 3~4 次,每次 15 min。放入 PBS 配制的 1% 锇酸,固定 4 h,用 PBS 漂洗 3~4 次,每次 15 min。以上均在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 环境下进行。之后用乙醇梯度脱水,丙酮过渡, Epon812 型环氧树脂(美国 SPI 公司,批号 90529-77-4)包埋, UC7 型超薄切片机(德国 Leica 公司)切片,经乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色后,在 HT7800 型透射电子显微镜(TEM, 日本日立公司)下观察主要超微特征变化。

1.3 数据处理与分析 原始实验数据使用 Microsoft Excel 2016 进行整理。单因素方差分析使用 SPSS 21.0 软件完成,方差齐性检验后使用 Duncan 法进行多重分析比较,采用 Pearson 方法进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 光胁迫下人参叶片表型特征变化 强光胁迫后,人参植株周围环境温度升高,植株水分流失严重。叶片E和呼吸速率失调,渗透压调节失衡,叶片形态出现明显变化。紫茎和绿茎人参种质植株叶片在胁迫前均生长良好;胁迫3 d左右,人参叶片从叶尖、叶缘开始,颜色变浅;胁迫5 d左右,叶片逐渐退绿甚至黄化,并附着有黄白色小斑点,叶片变薄,褶皱明显,质地变轻;胁迫10 d以后,人参叶片边缘干枯褐化,出现“烧伤”症状,见图2;持续胁迫后,整株人参掌状复叶叶片、叶柄逐渐变黄,脱落;植株茎秆干枯,地上部分死亡。由图2可知,强光条件对人参叶色具有显著影响。与对照组比较,试验组2个种质中叶绿素a,叶绿素b及类胡萝卜素含量均显著降低,紫茎种质分别下降65.44%,39.05%和56.20%,绿茎种质分别下降59.47%,30.49%和48.48%。说明叶绿素a和类胡萝卜素合成受强光胁迫抑制作用较大,叶绿素b含量受影响相对偏小。



图2 人参光胁迫不同阶段叶片形态特征

Fig. 2 Leaf morphological characteristics of ginseng at different stages of light stress

2.2 人参种质光合作用光响应曲线 由图3可知,2种人参种质的 P_n 对PAR强度的响应曲线存在差异。在PAR强度为0~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,2种种质的 P_n 迅速增加;当PAR强度达300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时, P_n 均增加缓慢;PAR强度在600~1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,2个种质 P_n 则表现出不同的变化趋势,紫茎种质

P_n 缓慢上升,绿茎种质 P_n 趋于稳定并小幅下降。利用Photosynthesis 1.0.0.770软件拟合光响应曲线,计算紫茎人参的 $P_{n\text{max}}$ 较大,为3.296 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。紫茎人参LSP(262.667 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)大于绿茎人参的213.333 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,但其LCP(2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)则小于绿茎人参的8.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,说明紫茎人参光适应性较强。

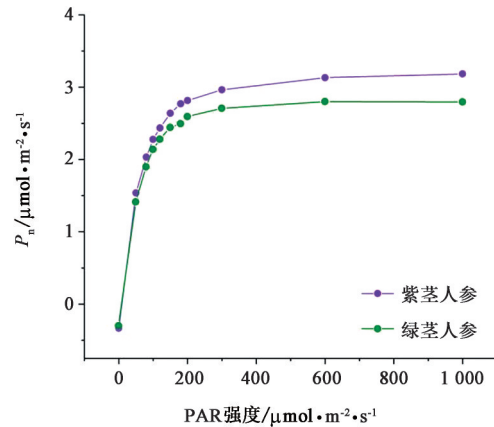


图3 紫茎和绿茎人参光合作用的光响应曲线

Fig. 3 Light response curves of purple-stem and green-stem ginseng

2.3 人参种质气体交换参数分析 P_n 是评价植物光合能力的重要指标。对照组中紫茎人参的 P_n 低于绿茎人参的;强光胁迫后,2种种质的 P_n 均显著降低,且紫茎人参略高于绿茎人参。在同等胁迫条件下,紫茎人参 P_n 降幅较少,表明强光对其光合系统的影响略小,紫茎人参抵抗强光的能力较强。 C_i 是 CO_2 同化速率与 G_s 的比值,光合仪控制 CO_2 浓度为400 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$,胞间浓度低于光合仪设置浓度,说明细胞内的 CO_2 被充分利用,从外界吸收 CO_2 , $P_n > 0$ 。当胞间浓度 $>$ 外界浓度时,说明胞间要释放 CO_2 , $P_n < 0$ 。试验组中绿茎人参的 C_i 略高于紫茎人参的,而光胁迫后,紫茎人参的 C_i 略高于绿茎人参的,二者 C_i 较对照组明显升高且均 $>400 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$,这与 P_n 变化的结果吻合。具体数值见表1。

表1 紫茎和绿茎人参正常组和试验组的气体交换参数

Table 1 Gas exchange parameters of normal and experimental groups of purple-stem and green-stem ginseng

种质	组别	$P_n/\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$C_i/\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	$E/\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$G_s/\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	WUE/g·kg ⁻¹	VPD _{leaf} /kPa
紫茎	对照	1.115±0.207 ^a	170.327±53.817 ^a	0.000 19±0.000 07 ^a	0.008 71±0.003 43 ^a	6.338±1.593 ^a	1.947±0.003 ^{a,b}
	试验	-0.279±0.150 ^b	456.971±79.079 ^b	0.000 11±0.000 03 ^a	0.005 03±0.001 12 ^a	-2.05±2.297 ^b	1.985±0.033 ^b
绿茎	对照	1.341±0.570 ^a	191.956±70.423 ^a	0.000 26±0.000 17 ^a	0.012 27±0.008 13 ^a	5.858±2.055 ^a	1.899±0.033 ^a
	试验	-0.320±0.187 ^b	435.670±18.241 ^b	0.000 12±0.000 01 ^a	0.005 76±0.000 35 ^a	-1.45±0.555 ^b	1.968±0.041 ^b

注:同列数据标记不同字母表示差异有统计学意义(表2同)。

对照组人参遮荫种植,空气中水分含量较高,此时叶片和大气的蒸汽压亏缺(VPD_{leaf})相对稳定,气孔开合正常;试验组强光胁迫会导致人参叶表面温度升高,空气相对湿度下降,叶片失水过多后, VPD_{leaf} 升高,叶片通过收缩保卫细胞并关闭气孔,来减少过多的水汽蒸腾。在不同遮荫状态下,与对照组比较,试验组紫茎人参的 VPD_{leaf} 上升1.95%, E 降低42.11%, G_s 降低42.25%;绿茎人参 VPD_{leaf} 上升3.63%, E 降低53.85%, G_s 降低53.06%,这与植物的自我保护有关。通过比较发现,紫茎种质各个参数变化趋势均较绿茎种质小,说明强光胁迫对紫茎种质的破坏较小,紫茎种质对强光适应能力更强。水分利用率(WUE)是评价植物抗旱性的关键因子,较高的WUE有利于缺水环境下植株的正常生长。在对照组中,紫茎人参的WUE高于绿茎人参;但强光胁迫之后,2种人参种质WUE均较对照组明显降低。具体数值见表1。

2.4 人参种质光合荧光参数分析 暗适应下PS II反应中心完全开放时的 F_v/F_m 是评价植物抗逆性的重要指标,正常生长条件下,该参数变化极小,不轻易受外界环境的影响。逆境下该参数变化明显, F_v/F_m 常用来检测植物光抑制^[13]。由表2可知,紫茎、绿茎种质在受到胁迫后 F_v/F_m 均显著降低,说明2种种质均出现不同程度的光抑制现象。紫茎人参实验组、对照组的 F_v/F_m 均优于绿茎人参。实验组紫茎人

参比绿茎人参高4.66%,对照组高4.98%,说明紫茎种质所受光抑制相对较小,对强光的耐受性强。人参不同种质试验组的有效光化学量子效率(F_v'/F_m')均显著低于对照组,紫茎、绿茎种质分别降低了389.15%,782.80%,说明强光下绿茎种质人参反应中心开放度比紫茎种质降低的多,PS II开放中心活性受到较大抑制,紫茎种质在强光下,光系统受损程度较低。强光照射导致2种人参种质ETR显著降低,光合机构2个状态间的电子传递量减少,但对照组和试验组紫茎人参种质ETR均高于绿茎人参,对照组紫茎人参比绿茎人参高21.96%,试验组高3.36%,表明紫茎人参无论在普通光照条件还是强光照射下,对光量子的传递效率均优于绿茎人参。 Φ_{psII} 比较结果显示,对照组紫茎人参高出绿茎人参21.49%,强光胁迫之后紫茎人参种质略高出绿茎3.23%,表明紫茎人参种质在正常光照条件下和强光照射下,均能保持较高光能转化效率。qP反映了PS II反应中心开放程度,比较发现紫茎人参在2种光照条件下qP均高于绿茎人参,说明紫茎人参在光合过程中电子传递活性更高。强光照射会刺激人参光系统非光化学猝灭,通过增加热耗散,释放过剩的激发能,以减轻光合机构受到的破坏。紫茎人参在遭受强光胁迫后,NPQ增长40.42%,绿茎人参增长33.35%,表明紫茎人参应对高光强胁迫的机动性更强。

表2 紫茎和绿茎人参正常组和试验组的叶绿素荧光参数

Table 2 Chlorophyll fluorescence parameters of normal and experimental groups of purple-stem and green-stem ginseng

种质	组别	F_v/F_m	F_v'/F_m'	ETR/ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	Φ_{psII}	qP	NPQ
紫茎	对照	0.780±0.019 ^a	0.341±0.129 ^a	18.597±4.378 ^a	0.147±0.035 ^a	0.205±0.015 ^a	1.979±0.317 ^a
	试验	0.427±0.192 ^b	-0.986±0.501 ^b	8.124±5.921 ^b	0.064±0.047 ^b	0.031±0.02 ^b	2.779±1.523 ^a
绿茎	对照	0.743±0.025 ^a	0.186±0.211 ^a	15.248±0.862 ^a	0.121±0.007 ^a	0.191±0.046 ^a	2.147±0.667 ^a
	试验	0.408±0.116 ^b	-1.270±0.329 ^b	7.86±0.466 ^b	0.062±0.004 ^b	0.028±0.021 ^b	2.863±0.253 ^a

2.5 人参光合作用参数相关性分析 紫茎人参对照组和试验组光合参数相关性分析见表3。结果显示,对照组、试验组的 P_n 与 E , G_s 均呈正相关;对照组中 C_i 与 P_n 呈明显正相关($P<0.05$),与 G_s 呈正相关,强光胁迫之后转为负相关, E , VPD_{leaf} 与 C_i 的相关性呈相同变化规律,这与 C_i 显著变化有关; G_s 与 E 在强光胁迫前后呈相同的显著正相关($P<0.01$); VPD_{leaf} 与 P_n , E , G_s 在强光胁迫前后呈现正相关;WUE与 P_n 在对照组呈明显负相关($P<0.05$),强光胁迫组转为正相关,WUE与 E , G_s , VPD_{leaf} 强光胁迫前后的变化同理;强光胁迫前后 C_i 和WUE均呈显著负相关($P<$

0.01)。绿茎人参对照组和试验组光合参数相关性分析见表3。结果显示, C_i 与WUE强光胁迫前后均呈明显负相关($P<0.05$, $P<0.01$); E 与 G_s 强光胁迫前后均呈明显正相关($P<0.05$, $P<0.01$), P_n 与WUE强光胁迫前后均呈负相关,高光强胁迫之后,试验组和对照组中气体交换参数之间的相关性未发生差异具有统计学意义的变化。但绿茎人参强光胁迫前后,部分气体交换参数相关性之间显示出了正负之间的变化。其中, P_n 与 E , G_s , VPD_{leaf} 的相关性发生了正负之间变化,这可能与 P_n 显著下降有关; G_s 与 C_i ,WUE的相关性也发生了正负性变化, E 和

WUE, C_i 之间相关性正负变化同理,说明强光胁迫前后气体交换参数变化影响了各参数之间的相关性。2种人参种质试验组气体交换参数相关性比较发现,气体交换参数相关性存在种质差异性,强光胁迫会影响气体交换参数之间的相关性。对照组紫茎人参 VPD_{leaf} 与 C_i 呈正相关,与 WUE 呈负相关,而绿茎人参相关性则正好相反。试验组2种人参种质的 P_n 与 E , C_i , G_s , VPD_{leaf} , WUE 呈现出相反的规律。综上分析,气体交换参数之间的相关性正负差异,可能是2种人参种质叶片结构及强光胁迫之后叶片受损程度差异所致。

表3 紫茎和绿茎人参气体交换参数的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of gas exchange parameters of purple-stem and green-stem ginseng

种质	组别	气体交换参数	P_n	E	C_i	G_s	VPD_{leaf}	WUE		
紫茎	对照	P_n	1.000							
		E	0.989	1.000						
		C_i	0.999 ¹⁾	0.994	1.000					
		G_s	0.989	1.000 ²⁾	0.994	1.000				
		VPD_{leaf}	0.304	0.443	0.341	0.439	1.000			
		WUE	-0.999 ¹⁾	-0.995	-1.000 ²⁾	-0.996	-0.354	1.000		
		试验		P_n	1.000					
				E	0.062	1.000				
				C_i	-0.798	-0.651	1.000			
				G_s	0.056	1.000 ²⁾	-0.646	1.000		
VPD_{leaf}	0.969			0.307	-0.922	0.301	1.000			
WUE	0.799			0.649	-1.000 ²⁾	0.645	0.923	1.000		
绿茎	对照			P_n	1.000					
				E	0.716	1.000				
				C_i	0.011	0.706	1.000			
				G_s	0.703	1.000 ¹⁾	0.719	1.000		
		VPD_{leaf}	0.879	0.297	-0.466	0.280	1.000			
		WUE	-0.063	-0.742	-0.999 ¹⁾	-0.754	0.419	1.000		
		试验		P_n	1.000					
				E	-0.992	1.000				
				C_i	0.850	-0.910	1.000			
				G_s	-0.993	1.000 ²⁾	-0.907	1.000		
VPD_{leaf}	-0.450			0.560	-0.853	0.554	1.000			
WUE	-0.834			0.898	-1.000 ²⁾	0.895	0.868	1.000		

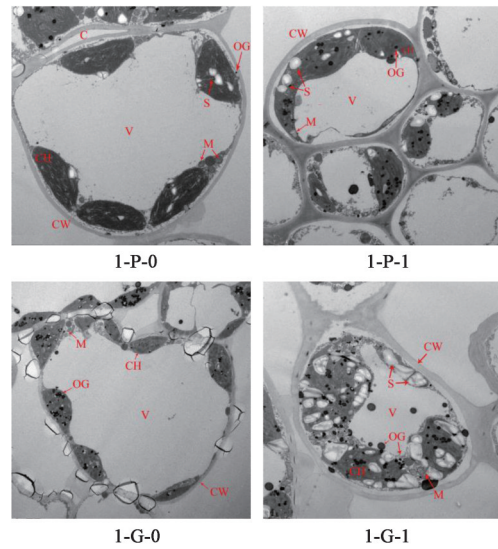
注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

2.6 人参种质叶片超微结构

2.6.1 叶肉细胞超微结构

正常遮荫下,2种人参种质叶肉细胞均生长正常,细胞壁和细胞质膜清晰

完整,大液泡占据较大空间,液泡内含物较少。叶绿体呈纺锤状,紧贴细胞壁周围分布。紫茎种质的叶绿体部位电子密度较绿茎种质高。强光胁迫下,2种种质叶肉细胞出现不同程度的质壁分离现象,但细胞壁结构完好。质壁分离是细胞内含水量下降所致,这一现象与 WUE 下降有关。绿茎种质叶肉细胞受损较严重,叶绿体脱离原有位置向细胞中部游离,细胞内部结构呈不规则团状,液泡边界不明显。紫茎种质各细胞器受损程度较轻,强光适应能力较强。见图4。



CH. 叶绿体;M. 线粒体;V. 液泡;CW. 细胞壁;OG. 嗜锶体;S. 淀粉粒;C. 细胞间隙(图5同);1-P-0. 紫茎对照组($\times 200$);1-P-1. 紫茎试验组($\times 200$);1-G-0. 绿茎对照组($\times 100$);1-G-1. 绿茎试验组($\times 200$)

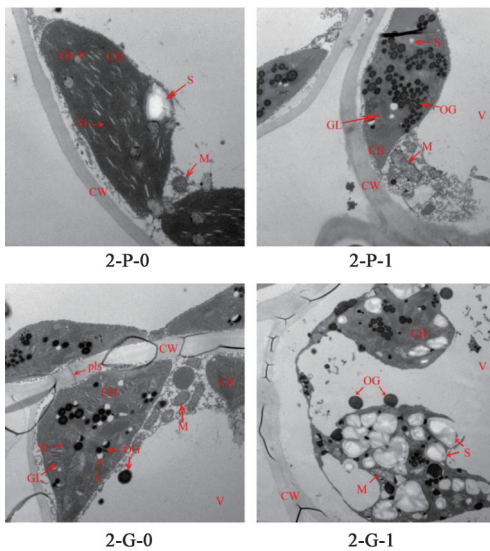
图4 紫茎人参和绿茎人参叶肉细胞的TEM

Fig. 4 TEM of mesophyll cells in purple-stem and green-stem ginseng

2.6.2 叶绿体超微结构

正常遮荫下,2种种质叶绿体膜结构完整清晰,基质片层和基粒片层堆垛整齐紧密,相比较而言,紫茎种质叶绿体内部结构层次更加清晰,这可能与叶肉细胞中紫茎种质电子密度较大有一定关系。2种种质线粒体呈类圆形分布在叶绿体周围,嵴结构清晰可见。观察叶绿体内含物发现,紫茎种质叶绿体内零散分布着极少量椭圆形淀粉粒和颗粒状嗜锶小体;绿茎种质嗜锶小体数目相对较多,电子密度较紫茎种质偏大,极少部分嗜锶小体出现外溢,进入液泡中。在强光胁迫下叶绿体膜结构遭到破坏,绿茎种质叶绿体膜不平滑,被膜破裂,叶绿体内部受损严重,内含物外渗,电子密度减小,结构模糊不清,基粒片层与基质片层断裂,游离在细胞质中,少量基粒片层堆垛结构明显

紧密,基质片层变形,间隙较大。不同种质之间叶绿体内含物有较明显差异,紫茎种质嗜饿小体数目显著增加,电子密度增加。绿茎种质嗜饿小体集结,体积变大,电子密度较高,呈黑色,且从破裂的叶绿体中溢出,进入液泡中。嗜饿体的体积、数目与叶肉细胞的脂膜过氧化程度有关。不同光强处理下,紫茎种质的嗜饿体含量均少于绿茎种质,表明紫茎种质有更好的强光适应性。淀粉粒是光合同化产物累积的表现,淀粉粒的多少可间接反应植物的光合作用强弱。绿茎种质中淀粉粒数目、大小明显多于紫茎种质,这与紫茎、绿茎种质的 P_n 大小结果一致。但过多淀粉粒的堆砌会堵塞维管束,对叶肉细胞造成损害,这与紫茎、绿茎种质的WUE大小结果一致。正常遮荫下,绿茎种质有较强的光合能力,在强光胁迫下,紫茎种质有更好的自我调节能力。见图5。



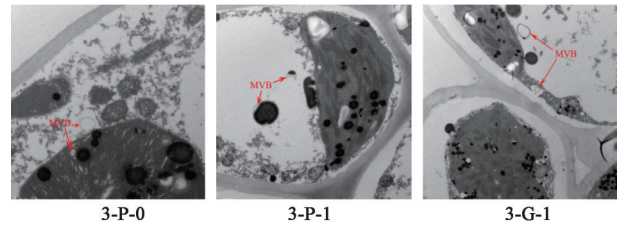
GL. 基粒片层; pls. 胞间连丝; SL. 基质片层; 2-P-0. 紫茎对照组($\times 6\ 500$); 2-P-1. 紫茎试验组($\times 4\ 400$); 2-G-0. 绿茎对照组($\times 4\ 400$); 2-G-1. 绿茎试验组($\times 3\ 200$)

图5 紫茎人参和绿茎人参叶绿体的TEM

Fig. 5 TEM of chloroplast in purple-stem and green-stem ginseng

2.6.3 多泡体超微结构 绿茎种质对照组观察视野中没有发现多泡体,故没有其超微结构图片,推测是含量较少所致。正常遮荫下,紫茎种质多泡体呈环状,集中分布于叶绿体周围,数量较少,无内含物。强光胁迫后,紫茎种质多泡体膜出现弯曲,呈不规则形状,吞噬了一些液泡内的黑色致密物质;绿茎种质多泡体正通过类似“胞吞”的方式,将液泡内嗜饿小体吞噬。2种种质细胞内的多泡体,在抵御外界环境对细胞造成的伤害时,均起到清除胞内

垃圾的积极作用。但紫茎种质相比绿茎种质多泡体含量较多,可吞噬掉较大体积的胞间多余内容物,自身防御系统较发达,可更好地对抗强光带来的影响。见图6。



MVB. 多泡体; 3-P-0. 紫茎对照组($\times 11\ 000$); 3-P-1. 紫茎试验组($\times 6\ 500$); 3-G-1. 绿茎试验组($\times 4\ 400$)

图6 紫茎人参和绿茎人参多泡体的TEM

Fig. 6 TEM of multivesicular bodies in purple-stem and green-stem ginseng

3 讨论

药用植物种质资源混杂一直是制约中药材品质和产量的重要因素。人参作为名贵中药材,其产业发展一直受到人工种植环境适应性较差、连作障碍严重等的影响。随着伐林栽参的开展,选育抗逆性人参种质以解决人参产量和质量问题迫在眉睫,但目前尚无针对人参茎色为表型性状的抗性种质评价报道。

叶绿素荧光参数是叶绿素荧光动力学研究的关键表征,可实现在现场或自然条件下,以完整的植物材料测定光合作用的动态变化;同时,可以灵敏检测到外界环境因子对研究植物光合作用的影响,已广泛应用于植物抗逆性种质评价。草麻黄 *Ephedra sinica* 和中麻黄 *E. intermedia* 光合分析结果揭示,中麻黄通过较低的蒸腾强度和较高的光合速率适应干旱荒漠环境,抗干旱性能更强^[14]。不同甘薯 *Ipomoea batatas* 种质资源光合性状测定结果显示, P_n 可以作为筛选高光效甘薯种质资源的重要指标^[15]。此外,利用叶绿素荧光动力学技术分析叶片在光合作用过程中光系统对光能的接收、传递、消耗等具有快速无损的优势,在探究烟叶的生理生态学及逆境胁迫方面具有独特优势^[16]。不同小麦种质的光合能力差异结合基因表达分析表明,六倍体小黑麦和八倍体小黑麦光合效率较高,可以作为小黑麦的优质种源进行推广种植^[9]。2种农田人参种质资源光合参数存在明显差异,在种质间存在可遗传光合性状,可以作为筛选抗强光照的育种材料^[15]。

人参为典型的多年生草本阴生植物,较低的

LSP($<300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)及LCP均显示出该阴生植物的特性^[17]。人参特殊的生长条件保证了植株正常的叶片功能和稳定的冠层结构,可作为研究叶片光合作用的理想材料^[18]。人参种植多采用遮荫网或者有色塑料膜进行处理,李晨曦等^[19]比较了不同遮荫棚处理对农田人参叶片光合代谢的影响,提示覆盖蓝色棚膜条件下人参叶片 P_n 最好,WUE最好。同时,光强会影响人参地下部分的生物量及人参皂苷的含量^[20-22]。在强光胁迫下,部分叶绿素荧光参数表现出显著的下降趋势,原因可能是人参应对不良环境开启了自身防御机制,通过胞间质中相关蛋白的表达和分泌减少光氧化损伤^[11]。不同表型人参对照组实验数据显示,常规遮荫环境下紫茎和绿茎人参光合参数无显著差异;强光下紫茎人参优势明显,与光合作用密切相关的 C_i 及WUE较高,紫茎种质通过提高非光化学猝灭以耗散过多热能,减少逆境对光合机构的影响,自我保护能力较绿茎强。

植物器官的各个形态特征与外界环境密切相关,在其生物进化的过程中,演化出适应不同环境因子的组织和器官,叶片是最重要的光合系统器官。叶片的外部形态、叶绿体超微结构常用来分析鉴定植物的抗逆程度^[23]。叶绿体对温度、光照比较敏感,在强光、高温等非生物胁迫下,光合电子传递过程中会产生较多的活性氧(ROS),如不能尽快控制或清除,会对植物细胞,尤其是光合机构造成伤害,导致叶绿体膜及类囊体膜的解体^[24]。紫茎种质与绿茎种质相比,在相同遮荫条件下,叶绿体膜结构更加完整清晰,类囊体排列较整齐。说明紫茎种质在长期进化中,形成了类似于抗氧化酶清除、热耗散消耗过量光能和ROS激素信号网等多种减轻ROS伤害的作用机制^[25],能较快清除体内多余的ROS,耐光性更强。在正常情况下,叶绿体内嗜饿小体数目属于平衡状态。在胁迫条件下,叶绿体或类囊体的膜脂被ROS氧化成嗜饿颗粒,故嗜饿小体的体积、多少可以反映叶绿体膜脂氧化的程度^[26]。绿茎种质与紫茎种质相比,相同遮荫条件下,嗜饿小体数目较多,脂膜过氧化程度高。说明紫茎种质对中强光有更好的耐受性。液泡具有与溶酶体类似的消化功能,起到调节植物细胞内环境的重要作用。在受到外界强光胁迫后,细胞内容物明显增多,而多泡体作为溶酶体的一种,在维持正常代谢活动及防御方面起着重要作用。紫茎种质与绿茎种质相比,多泡体体积、数目明显较大,在抵抗强光刺激对细胞的伤害方面更占据优势。光合同化产

物以淀粉的形式在体内积累,淀粉粒的多少可以直接反映植物光合作用的强弱。胼胝质是围绕每个筛孔的边缘积累的碳水化合物。植物受到外界胁迫后,胼胝质在筛管端壁上累积形成垫状物——胼胝体,堵塞维管束,影响筛管的输导作用,导致淀粉粒过多积累,对植物叶肉细胞有着不可逆的影响。紫茎人参在遭到强光胁迫后,淀粉粒数量有少许增加,绿茎种质淀粉粒体积、数目增加明显,该结果与WUE结果相符。说明2个种质光合作用有所增强,但强光没有对紫茎种质叶肉细胞造成较大的伤害。

本研究通过叶绿素荧光参数等指标的测定和植株形态、叶绿体超微结构的比较,以及对2种种质光胁迫下的评价,初步表明紫茎种质有更好的光耐受性,可培育为农田参高光抗逆新品种,同时,该研究为后期农田参生产改良遮荫提供科学依据,有利于探究新的农田种参精细化管理模式。近5年来多种药用植物基因组测序推动复杂天然产物生物合成途径解析^[27],人参全基因组测序的完成^[28]也将加速人参表型组学研究的全面开展。本研究为人参的基因组选择育种或分子辅助抗逆育种提供了切实的种质评价参考数据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 王利群. 中国人参栽培史考[J]. 人参研究, 2001, 13(4): 46-48.
- [2] 任跃英, 张益胜, 李国君, 等. 非林地人参种植基地建设的优势分析[J]. 人参研究, 2011, 23(2): 34-37.
- [3] LIU L, XU F R, WANG Y Z. Traditional uses, chemical diversity and biological activities of *Panax L.* (Araliaceae): a review [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 263: 112792.
- [4] 陈东亮, 钟楚, 简少芬, 等. 人参种质资源及育种研究进展[J]. 贵州农业科学, 2020, 48(10): 111-116.
- [5] 牛玮浩, 徐江, 董林林, 等. 农田栽参的研究进展及优势分析[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(11): 1981-1987.
- [6] 董林林, 徐江, 牛玮浩, 等. 改良措施对农田土壤微生态及人参存苗率的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(23): 4334-4339.
- [7] 常思佳, 宁雪, 王日明, 等. 日光温室栽培模式下不同种质来源人参单体皂苷及氨基酸对比分析[J]. 人参研究, 2019, 31(3): 18-24.
- [8] 任跃英. 人参育种的种质资源及生物学基础的研究[J]. 人参研究, 2012, 24(1): 24-29.
- [9] SONG Q H, SU R N, CHAI Y M, et al. High

- photosynthetic capability observed in the wheat germplasm with rye chromosomes[J]. *J Plant Physiol*, 2017, 216:202-211.
- [10] JUNG J H, KIM H Y, KIM H S, et al. Transcriptome analysis of *Panax ginseng* response to high light stress [J]. *J Ginseng Res*, 2020, 44(2):312-320.
- [11] NAM M H, HEO E J, KIM J Y, et al. Proteome analysis of the responses of *Panax ginseng* C. A. Meyer leaves to high light: use of electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry and expressed sequence tag data[J]. *Proteomics*, 2003, 3(12):2351-2367.
- [12] 岑海燕,姚洁妮,翁海勇,等. 叶绿素荧光技术在植物表型分析的研究进展[J]. *光谱学与光谱分析*, 2018, 38(12):3773-3779.
- [13] 刘彤,徐浩玉,金慧颖,等. 不同光照条件下东北红豆杉幼苗叶绿素荧光特性日变化[J]. *植物研究*, 2015, 35(6):848-853.
- [14] 张昞明,杨自辉,王继和,等. 2种麻黄光合及其耐逆性分析[J]. *西北植物学报*, 2007, 27(7):1473-1478.
- [15] 苏春桃,杨浩,高秀梅,等. 高光效甘薯种质筛选及光合特性分析[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(12):2462-2466.
- [16] 刘志辉,朱旭东. 叶绿素荧光分析技术在烟草研究中的应用[J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(3):10-11.
- [17] 吴廷娟,田梦平,谢小龙. 不同地黄品种光合特性的比较研究[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2020, 22(8):2899-2906.
- [18] 徐克章,张美善,武志海,等. 人参不同生育期叶片光合作用变化的研究[J]. *作物学报*, 2006, 32(10):1519-1524.
- [19] 李晨曦,何章,许永华,等. 不同遮荫棚下农田人参叶片光合特性的生育期变化[J]. *吉林农业大学学报*, 2017, 39(1):32-37, 48.
- [20] YU K W, MURTHY H N, HAHN E, et al. Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality[J]. *Biochem Eng J*, 2005, 23(1):53-56.
- [21] CHENO S K, LEE T S, YOON J H, et al. Effect of light transmittance control on the root yield and quality during the growing season of *Panax ginseng* [J]. *J Ginseng Res*, 2004, 28(4):196-200.
- [22] CHENO S K, LEE T S, YOON J H, et al. Effect of light transmittance control on the growth status of aerial parts during the growing season of *Panax ginseng*[J]. *J Ginseng Res*, 2003, 27(4):202-206.
- [23] 姜建福,张颖,田智硕,等. 葡萄属植物叶片显微和超微结构观察[J]. *西北植物学报*, 2012, 32(7):1365-1371.
- [24] SONG X H, WANG K, GUO L L, et al. Effects of catalase and ascorbate peroxidase on the root growth of rice under cadmium stress[J]. *农业科学与技术:英文版*, 2011, 12(9):1256-1259.
- [25] 朱素琴,何玲艳,张千千,等. 植物细胞内 ROS 的种类及其产生部位[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(34):16536-16540.
- [26] ZHANG R, WISE R R, STRUCK K R, et al. Moderate heat stress of *Arabidopsis thaliana* leaves causes chloroplast swelling and plastoglobule formation [J]. *Photosynth Res*, 2010, 105(2):123-134.
- [27] 陈士林,孙奕,万会花,等. 中药与天然药物 2015~2020 年研究亮点评述[J]. *药学学报*, 2020, 55(12):2751-2776.
- [28] XU J, CHU Y, LIAO B S, et al. *Panax ginseng* genome examination for ginsenoside biosynthesis [J]. *GigaScience*, 2017, 6(11):1-15.

[责任编辑 刘德文]