

doi:10.11937/bfyy.20183026

番茄幼苗叶片光合作用、PSII 电子传递及活性氧对短期高温胁迫的响应

尹贻鹏^{1,2}, 鹿嘉智¹, 高振华¹, 齐明芳¹, 孟思达¹, 李天来¹

(1. 沈阳农业大学 园艺学院, 设施园艺省部共建教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110161;

2. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:以番茄幼苗为试验材料,研究了光合气体交换参数、叶绿素荧光参数及 PSII 反应中心、PSII 核心蛋白编码基因相对表达量和活性氧代谢对不同高温(25、30、35、40 °C)胁迫 12 h 的响应,以期番茄高温季节栽培提供参考依据。结果表明:随着温度的升高,番茄幼苗叶片光合碳同化能力受到抑制,30、35 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片光合作用减弱的原因主要为气孔因素,而 40 °C 时则为气孔和非气孔因素共同限制。高温胁迫下番茄幼苗叶片 PSII 反应中心活性降低,PSII 电子传递受阻,*PsbA* 和 *PsbP* 基因相对表达量降低,即高温对番茄幼苗叶片的主要作用位点为 PSII 供体侧放氧复合体(OEC)和 PSII 受体侧 Q_A 向 Q_B 的传递过程,其原因主要与 OEC 功能的破坏及 D1 蛋白的降解有关。高温胁迫下 *PsbP* 基因相对表达量降低幅度大于 *PsbA*,并且标准化 OJIP 曲线上 0.3 ms 处相对可变荧光(V_K)的增加幅度大于 2 ms 处相对可变荧光(V_J),说明高温胁迫对番茄幼苗 PSII 供体侧的伤害程度大于受体侧。番茄幼苗叶片在 30、35 °C 高温胁迫 12 h 并没有诱导过量的活性氧(ROS)产生,这与非光化学淬灭(NPQ)有效淬灭过剩光能有关,而在 40 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片 NPQ 显著降低,导致叶片中过剩光能($1-qP$)/NPQ 和 ROS 大量积累,这是导致光抑制加剧的重要原因。

关键词:番茄;高温胁迫;光合作用;光系统 II;基因表达;活性氧

中图分类号:S 641.201 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2019)05-0001-11

第一作者简介:尹贻鹏(1985-),女,博士,研究方向为设施蔬菜栽培与生理。E-mail:yinzepeng@hotmail.com.

责任作者:李天来(1955-),男,中国工程院院士,博士,教授,博士生导师,现主要从事设施园艺及蔬菜生理生态等研究工作。E-mail:tianlaili@126.com.

基金项目:国家自然科学基金青年资助项目(31801848);中国博士后科学基金资助项目(2018M631877);国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-25);辽宁省重大科技攻关资助项目(2011215003);沈阳市农业科技攻关资助专项资助项目(F11-092-3-00);沈阳市科技计划资助项目(17-143-3-00);辽宁省教育厅重点实验室资助项目(LZ2015064)。

收稿日期:2018-10-17

高温是影响植物生长发育和作物产量及品质的主要限定因子之一^[1],高温胁迫会使植物的光合作用减弱、生长受到抑制、活性氧(ROS)大量积累细胞膜完整性受损,细胞内酶促反应速率受到影响,从而导致植物体内代谢紊乱^[2]。高温胁迫下植物糖类和能量代谢过程^[3-4]、细胞周期^[5]以及信号转导过程^[6]均发生明显的改变。其中,植物光合作用是对高温胁迫极其敏感的过程之一,在其它表性症状还未出现时光合作用就被高温胁迫部分抑制甚至完全抑制。PS II 反应中心、 CO_2 同化以及 ATP 复合体均是易遭受高温胁迫伤害的主要位点^[7]。其中 PSII 反应中心是对高温胁迫最为敏感的位点之一^[8-9],高温胁迫下,有研究发

现,PSII 电子供体侧是高温胁迫的主要伤害位点之一^[10],PSII 电子供体 oxygen-evolving complex (OEC)活性受到抑制,如植物叶片中的 OEC 或 oxygen-evolving enhancer(OEE)表达下调^[11-12],高温胁迫还会影响植物的碳同化过程,如诱导气孔关闭或气孔导度降低^[13],抑制 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)和 RuBisCO activase(RA)的活性^[14],降低植物的光合速率^[15]。高温胁迫下植物叶片类囊体膜流动性改变,导致 PS II 复合物稳定性降低且易分解^[16]。另外,高温胁迫下植物叶片 PSII 功能受到抑制和电子传递受阻会导致活性氧(ROS)的爆发,而 ROS 会进一步抑制光合作用的正常进行^[17]。总之,植物叶片 PSII 反应中心是高温作用的主要靶点,深入研究高温胁迫下植物叶片的 PSII 功能,对提高植物的耐高温能力具有重要意义。

番茄是我国栽培面积最大的蔬菜作物之一,最适温度范围为 18~32 ℃。番茄在设施越夏栽培过程中往往会超过这一温度范围,达到 35 ℃以上,甚至超过 40 ℃,高温胁迫成为设施栽培番茄生产中产量和品质提高的主要限制因素之一^[18]。目前已有大量关于高温胁迫对番茄生理及光合功能方面的研究,但是关于不同高温胁迫对番茄幼苗叶片的伤害位点及在不同高温胁迫下番茄幼苗叶片的光破坏防御机制方面的研究较少。为此,该试验通过人工控温的方法,研究了番茄幼苗光合气体交换参数、PSII 功能以及编码 PSII 核心蛋白基因表达和活性氧代谢在不同高温胁迫下的响应,以期为设施番茄设施越夏栽培中的合理控温提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以在沈阳农业大学园艺学院蔬菜科研基地日光温室内培养的中国东北地区设施主要番茄品种 (*Solanum lycopersicum* L. ‘Liaoyuanduoli’) ‘辽园多丽’为材料。

1.2 试验方法

幼苗 2 叶 1 心时分苗至 9 cm×10 cm 营养钵中,生长的温度为 25 ℃/15 ℃(光/暗)、光照强度

400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光周期 12 h/12 h(光/暗)、相对湿度 65%的人工气候室中,至不同温度处理前在温室内统一温度管理,定量浇水。

待幼苗长至四叶一心时期,选取株高、长势一致的植株随机分成 4 组进行不同温度梯度处理(25、30、35、40 ℃)12 h 后进行光合气体交换和叶绿素荧光参数的测定。然后分别收取对照组与处理组的番茄叶片,其中部分叶片立即用于部分生理试验,剩余叶片用液氮速冻,然后置于-80 ℃冰箱保存备用,用于生理试验和分子生物学试验。

1.3 项目测定

光合气体交换参数的测定:选择各处理番茄幼苗植株上倒数第 2 片完全展开叶,利 CO₂ 钢瓶固定 CO₂ 浓度 400 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$,利用仪器内置光源将光强 PFD 设定为 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,分别测定不同处理下番茄叶片的净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、蒸腾速率(T_r)和胞间 CO₂ 浓度(C_i)等参数。重复 5 次。

叶绿素荧光参数的测定:采用便携式脉冲调制荧光仪 FMS-2(Hansatch 公司,英国)测定实际光化学效率(Φ_{PSII})、光化学淬灭系数(qP)、非光化学淬灭(NPQ)等,并计算过剩光能($1-qP$)/NPQ,各处理测定 3 次重复^[19]。

快速叶绿素荧光动力学曲线(OJIP)的测定:分别将不同处理下番茄幼苗完全展开功能叶进行 0.5 h 暗适应,利用 Mini 调制式掌上叶绿素荧光仪(FluorPen FP 100 max,捷克)测定展开叶片的 OJIP 曲线,OJIP 曲线由 3 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的脉冲红光诱导,荧光信号记录是从 10 μs 开始至 1 s 结束。每个处理测定 5 次重复,利用 5 次 OJIP 曲线各时间点荧光强度求平均值绘制 OJIP 曲线,曲线横坐标以对数形式表示。确定 J、I、K 和 L 4 个特征点的相对可变荧光分别为 V_J 、 V_I 、 V_K 和 V_L ,分别将 OJI 曲线进行 O—P、O—J 和 O—K 标准化^[20]。其中 O、L、K、J、I 和 P 点分别为 0.00、0.15、0.30、2.00、30.00、1 000.00 ms 对应的时刻,O—P 标准化时各点的相对可变荧光 $V_{O-P} = (F_t - F_o) / (F_m - F_o)$,O—J 标准化时各点的相对可变荧光 $V_{O-J} = (F_t - F_o) / (F_J - F_o)$,O—K 标准化时各点的相对可变荧光 $V_{O-K} = (F_t - F_o) / (F_K - F_o)$ 。式中, F_t 表示各时间点的

荧光强度, F_o 、 F_K 、 F_J 、 F_m 分别为 O、K、J 和 P 点的相对荧光强度。分别计算不同温度处理下番茄幼苗叶片标准化 O—P、O—J 和 O—K 曲线与 25 °C 时的曲线差值, 即 $\Delta V_{O-P} = V_{O-P(stress)} - V_{O-P(CK)}$, $\Delta V_{O-J} = V_{O-J(stress)} - V_{O-J(CK)}$, $\Delta V_{O-K} = V_{O-K(stress)} - V_{O-K(CK)}$ 。对 OJIP 曲线 JIP-test 分析得到: PS II 最大光化学效率 (F_v/F_m) 和以吸收光能为基础的光合性能指数 (PI_{ABS}), 其计算方法按照 STRASSER 等^[21] 的方法。

psbA 和 *psbP* 基因相对表达量的测定采用 RNA 提取及实时定量 PCR (qRT-PCR) 分析方法^[22]: 利用 RNAprep Pure Plant Kit (Tiangen Biotech) 提取番茄各处理叶片的总 RNA, 利用 RNase Mini Kit (Qiagen, Germany) 去除其中的残余 DNA。按照 ReverTra Ace Qpcr RT Kit (Toyobo, Osaka, Japan) 使用说明反转录 1 μ g 的总 RNA。使用 Roche LightCycler 480 实时 PCR 仪 (Roche, Switzerland) 及 SYBR Green RT-PCR Kit 荧光染料试剂盒 (Takara) 进行实时荧光定量 PCR。PCR 反应条件为 95 °C 下 3 min; 95 °C 下 30 s, 58 °C 下 30 s, 72 °C 下 1 min, 进行 40 个循环。番茄看家基因 *actin* 作为内参基因。基因特异性引物参见表 1。

活性氧含量的测定: 番茄叶片 O_2^- 生成速率的测定参照 ZHANG 等^[23] 的方法, H_2O_2 含量的测定参照 ALEXIEVA 等^[24] 的方法。活性氧染色: 参照 LU 等^[25] 方法分别通过 NBT (硝基蓝四氮唑) 和 DAB (二氨基联苯胺) 染色法对 O_2^- 和 H_2O_2 进行活体化学染色。

表 1 相关应答基因 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primers used for the quantitative real-time RT-PCR analysis

基因/蛋白	登录号	引物序列(5'-3')
Gene/protein	Accession No.	Primer sequences (5'-3')
<i>psbA</i> (D1)	ABC56280	F-GCCTGAGACACAATAGAACC
		R-TAAGTAAGCAAGGAGGGAAC
<i>psbP</i> (OEC)	Solycl1g008480	F-CAACAGTGGGAGGAAAAGAG
		R-GCAACTCATCTCAGCACCAT
<i>actin</i>	Q96483	F-TGTCCTCATTTACGAGGGTTATGC
		R-AGTTAAATCAGCACCAGCAAGAT

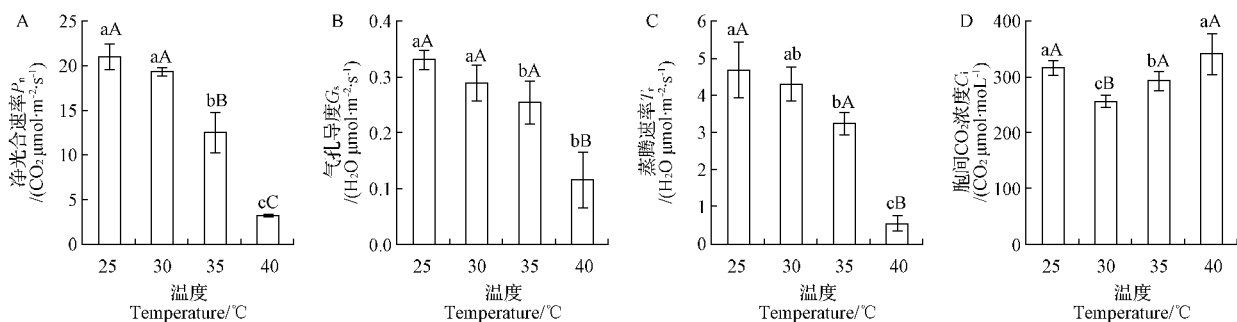
1.4 数据分析

图中数据为 5 次重复的平均值 \pm 标准差 (SE), 运用 Excel 和 DPS 软件对试验数据进行统计分析, 并采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和最小显著差异法 (LSD) 比较不同数据组间的差异。

2 结果与分析

2.1 高温胁迫下番茄幼苗叶片光合气体交换参数

由图 1 可以看出, 不同高温处理下均不同程度地降低了番茄幼苗叶片的 P_n 、 G_s 和 T_r , 但 30 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片的 P_n 、 G_s 和 T_r 与 25 °C 相比均未达显著差异水平, 但随着温度的升高番茄幼苗叶片的 P_n 、 G_s 和 T_r 均大幅度降低。30、35 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片的 C_i 分别较 25 °C 时降低了 18.99% ($P < 0.05$) 和 26.27% ($P < 0.01$), 但当温度增加到 40 °C 时, 番茄幼苗叶片的

图 1 高温胁迫对番茄幼苗叶片净光合速率(A)、气孔导度(B)、蒸腾速率(C)和胞间 CO_2 浓度(D)的影响Fig. 1 Effects of high temperature stress on net photosynthetic rate (A), stomatal conductance (B), transpiration rate (C) and intercellular CO_2 concentration (D) in tomato seedling leaves

C_i 却较 25 °C 时稍有增加,但未达显著差异水平。

2.2 高温胁迫下番茄幼苗叶片叶绿素荧光参数

由图 2 可以看出,随着温度的增加,番茄幼苗叶片的 Φ_{PSII} 和 qP 变化趋势相似,均呈显著的降低趋势,并且 Φ_{PSII} 的降低幅度大于 qP 。30、35 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片 NPQ 分别由 25 °C 时的 0.57 增加到 2.21 和 2.38,均达极显著差异水平,

但温度增加到 40 °C 时,番茄幼苗叶片的 NPQ 却较 30、35 °C 时显著降低,但仍较 25 °C 时高 53.57% ($P > 0.05$),但二者差异不显著。30、35 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片 $(1-qP)/NPQ$ 较 25 °C 时均无显著差异,但当温度增加到 40 °C 时,番茄幼苗叶片的 $(1-qP)/NPQ$ 剧增(较 25 °C 时增加了 3.6 倍)。

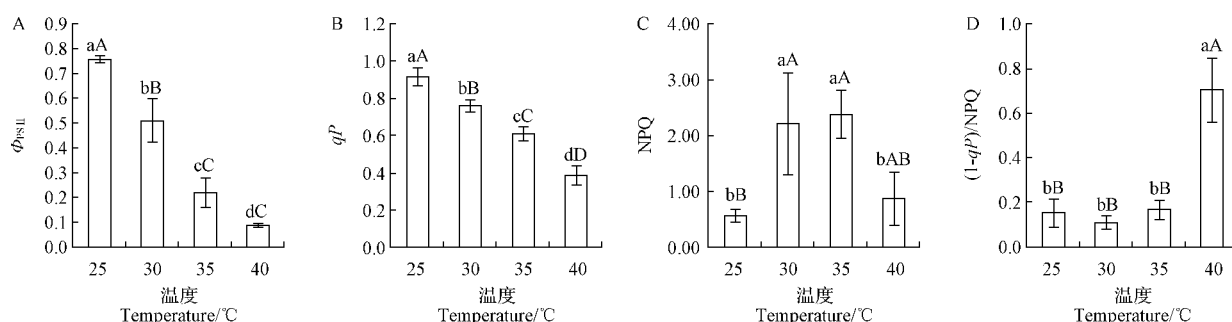


图 2 高温胁迫对番茄幼苗叶片荧光参数的影响

Fig. 2 Effects of high temperature stress on chlorophyll fluorescence parameters in tomato seedling leaves

2.3 高温胁迫下番茄幼苗叶片 OJIP 曲线

由图 3 可以看出,高温胁迫下番茄幼苗叶片 OJIP 曲线形态发生了明显的改变,但与 25 °C 相比,30 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片 OJIP 曲线变化幅度较小,而在 35、40 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片 O 点和 J 点相对荧光强度变化幅度较小,而 I 点和 P 点相对荧光强度则明显降低,特别是 40 °C 高温胁迫下的变化更为显著。图 4 中定量分析 O 点和 P 点相对荧光强度 F_o 和 F_m 的变化结果可以看出,30、35 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片的 F_o 和 F_m 与 25 °C 时均无显著差异,仅在 40 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片的 F_o 较 25 °C 时增加了 33.38% ($P < 0.05$), F_m 降低了 29.98% ($P < 0.01$)。

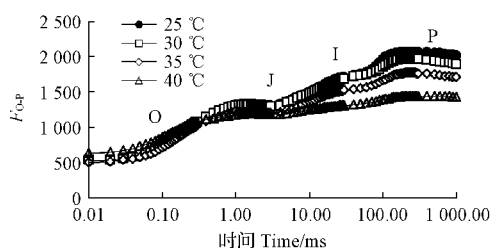


图 3 高温胁迫对番茄幼苗叶片 OJIP 曲线的影响

Fig. 3 Effects of high temperature stress on OJIP curves in tomato seedling leaves

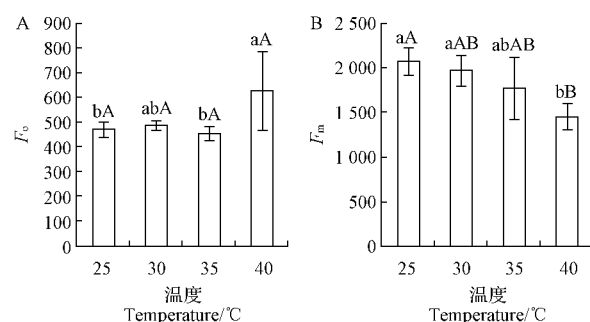


图 4 高温胁迫对番茄幼苗叶片 F_o (A) 和 F_m (B) 的影响

Fig. 4 Effects of high temperature stress on F_o (A) and F_m (B) in tomato seedling leaves

2.4 高温胁迫下番茄幼苗叶片 PSII 光化学效率

由图 5 可以看出,番茄幼苗叶片的 PI_{ABS} 在高温胁迫下的变化幅度明显大于 F_v/F_m 。30、35 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片的 F_v/F_m 较 25 °C 时均无显著变化,而 PI_{ABS} 虽然分别较 25 °C 时降低了 23.08% ($P > 0.05$) 和 34.48% ($P > 0.05$),但差异均不显著。但当温度增加到 40 °C 时,番茄幼苗叶片的 F_v/F_m 和 PI_{ABS} 均大幅度降低,分别较 25 °C 时降低了 26.16% ($P < 0.01$) 和 85.12% ($P < 0.01$),均达极显著差异水平。

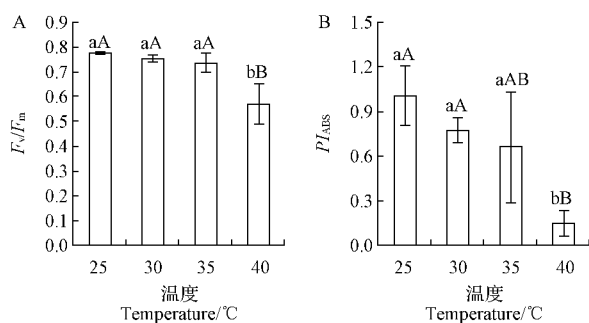


图5 高温胁迫对番茄幼苗叶片 F_v/F_m (A) 和 PI_{ABS} (B) 的影响

Fig. 5 Effects of high temperature stress on F_v/F_m (A) and PI_{ABS} (B) in tomato seedling leaves

2.5 高温胁迫下番茄幼苗叶片标准化 O—P、O—J 和 O—K 曲线及其特征点相对可变荧光

由图6可以看出,与25 °C相比,不同高温胁迫下番茄幼苗叶片标准化 O—P、O—J 和 O—K 曲线 J 点、K 点和 L 点相对可变荧光均表现为不同程度的增加,并且随着温度的增加,其增加幅度变大。定量分析各特征点的相对可变荧光变化可以看出,30 和 35 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片的 V_J 和 V_L 与 25 °C 相比均无显著变化,仅在温度增加到 40 °C 时,番茄幼苗叶片的 V_J 和 V_L 分别较 25 °C 时分别增加了 29.09% ($P < 0.01$) 和 20.23% ($P < 0.01$) (图 7-A 和 7-C)。高温胁迫下番茄幼苗叶片的 V_K 变化幅度明显大于 V_J 和 V_L 。

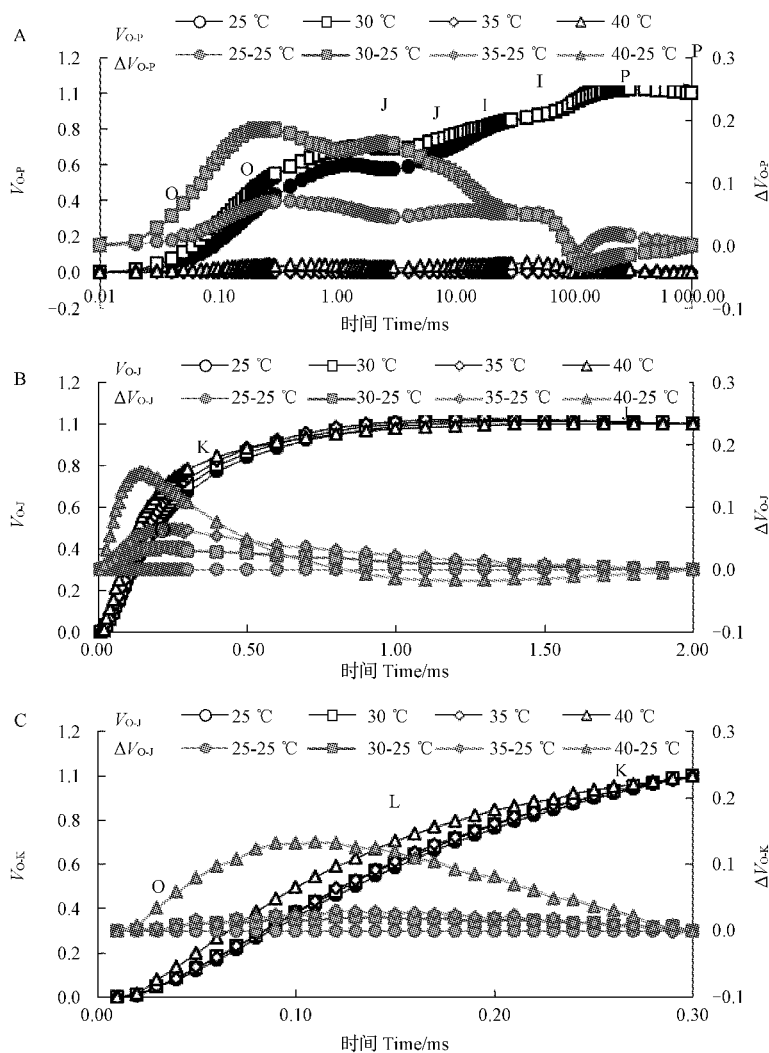


图6 高温胁迫对番茄幼苗叶片 O—P(A)、O—J(B) 和 O—K(C) 曲线标准化的影响

Fig. 6 Effects of high temperature stress on standardization of O—P (A), O—J (B) and O—K (C) curve in tomato seedling leaves

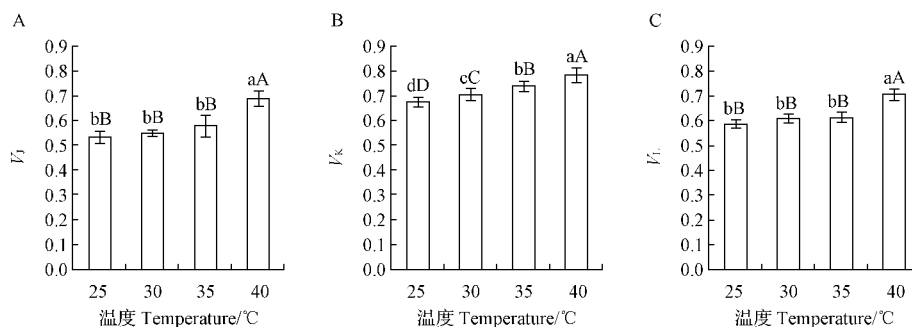


图7 高温胁迫对番茄幼苗叶片 V_j (A)、 V_k (B)和 V_l (C)的影响

Fig. 7 Effects of high temperature stress on V_j (A), V_k (B) and V_l (C) in tomato seedling leaves

(图7-B),并且在35 °C高温胁迫下番茄幼苗叶片的 V_k 较25 °C时相比的增加幅度就达极显著差异水平,并且随着温度的增加,番茄幼苗叶片的 V_k 进一步增加。

2.6 高温胁迫下番茄幼苗叶片 PSII 核心蛋白编码基因相对表达量

由图8可以看出,随着温度的增加,番茄幼苗叶片的 *PsbA* 和 *PsbP* 基因相对表达量迅速降低(图8-A和8-B),但是在30 °C时,番茄幼苗叶片 *PsbA* 基因相对表达量与25 °C时差异不显著,相比较而言,番茄幼苗叶片 *PsbP* 基因相对表达量的降低幅度大于 *PsbA* 基因。

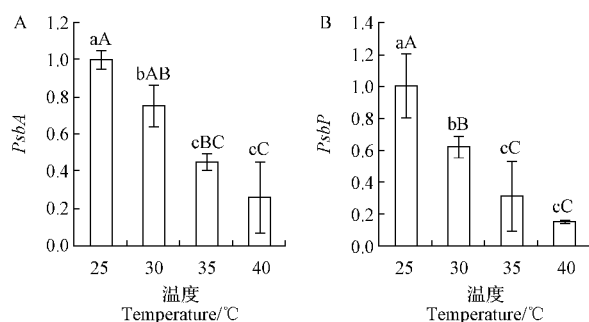


图8 高温胁迫对番茄幼苗叶片 *PsbA* (A)和 *PsbP* (B)基因表达的影响

Fig. 8 Effects of high temperature stress on genes expression of *PsbA* (A) and *PsbP* (B) in tomato seedling leaves

2.7 高温胁迫下番茄幼苗叶片 O_2^- 和 H_2O_2 含量

由图9可以看出,随着温度的增加,番茄幼苗叶片的 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量整体表现为增加趋势,但在30、35 °C高温胁迫下番茄幼苗叶片

的 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量与25 °C相比均无显著差异,但当温度增加到40 °C时,番茄幼苗叶片的 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量大幅度增加,分别较25 °C时增加了100.84% ($P < 0.01$) 和161.03% ($P < 0.01$),均达极显著差异水平。

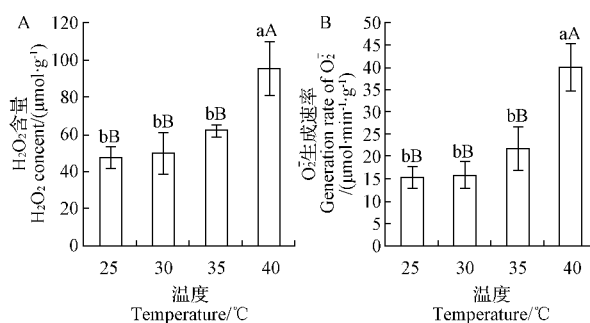


图9 高温胁迫对番茄幼苗叶片 O_2^- (A)生成速率和 H_2O_2 (B)含量的影响

Fig. 9 Effects of high temperature stress on the generation rate of O_2^- (A) and H_2O_2 content (B) in tomato seedling leaves

对番茄幼苗叶片 O_2^- 和 H_2O_2 进行原位染色,由图10可以看出,随着温度的增加,番茄幼苗叶片上棕黄色和蓝色的染色点增多,并且颜色加深,但是在30、35 °C高温胁迫下番茄幼苗叶片 O_2^- 和 H_2O_2 的棕黄色和蓝色的染色点与25 °C时差异较小,而温度增加到40 °C时,染色部位增加,并且颜色进一步加深。这与图9中 O_2^- 和 H_2O_2 含量结果相符。

3 讨论

高温胁迫会抑制植物的光合作用^[26],但植物

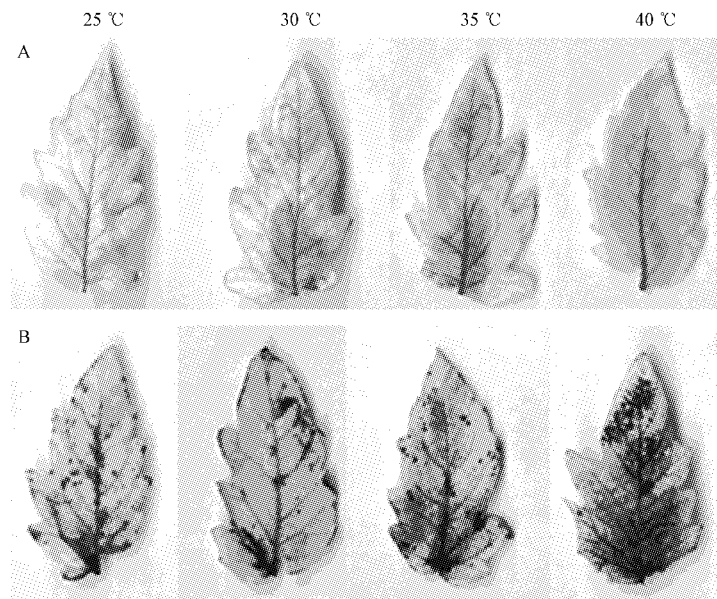


图 10 高温胁迫对番茄幼苗叶片 DAB 染色 H_2O_2 (A) 和 NBT 染色 O_2^- (B) 水平的影响

Fig. 10 Effects of high temperature stress on DAB-stained H_2O_2 (A) and NBT-stained O_2^- (B) levels of tomato leaves in tomato seedling leaves

常常以气孔关闭的方式来减少水分的蒸腾^[27],但在气孔关闭的同时,也降低了碳同化原料- CO_2 的供应,导致净光合速率的降低。该试验结果表明,随着温度的增加,番茄幼苗叶片的 P_n 、 G_s 和 T_r 均有不同程度的降低,但在 30 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片的 P_n 、 G_s 和 T_r 与 25 °C 相比均未达显著差异水平,说明番茄具有一定的耐高温能力。但随着温度的进一步升高,番茄幼苗叶片的 P_n 、 G_s 和 T_r 开始大幅度降低,30、35 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片的 C_i 分别较 25 °C 时有不同程度的降低,但当温度增加到 40 °C 时,番茄幼苗叶片的 C_i 却较 25 °C 时稍有增加。如果 P_n 的降低伴随 C_i 的提高,则 P_n 降低的主要原因是非气孔因素,即由叶肉细胞光合活性的下降所导致^[28]。因此,该试验结果表明,在 30 °C 高温对番茄幼苗叶片光合碳同化能力影响较小,而 35 °C 高温胁迫下则主要受气孔因素限制导致碳同化能力降低,而在 40 °C 时,则是气孔因素和非气孔因素的共同限制。其原因可能与高温胁迫还会影响植物的碳同化过程中主要酶的活性,如 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) 和 RuBisCO activase(RA)等有关^[29]。

PSII 是对高温胁迫较为敏感的部位之一,叶

绿素荧光技术作为分析植物光合功能,特别是 PSII 光化学活性、电子传递能力及光能利用方面发挥着重要的作用^[30]。该试验结果表明,随着温度的升高,番茄幼苗叶片的 Φ_{PSII} 、 ETR 、 F_v/F_m 和 PI_{ABS} 均有不同程度的降低,但 Φ_{PSII} 和 ETR 的降低幅度显著大于 F_v/F_m 和 PI_{ABS} ,并且 F_v/F_m 和 PI_{ABS} 仅在温度增加到 40 °C 时才显著降低。 F_v/F_m 和 PI_{ABS} 均是反映植物逆境下光抑制的重要指标。因此,该试验结果说明高温胁迫下首先会引起番茄幼苗叶片电子传递过程受阻,光化学能力降低,但温度增加到 40 °C 时则会引起番茄幼苗叶片显著的光抑制。逆境下当植物叶片中存在过剩光能时,受光激发产生的三线激发态的叶绿素分子可以与基态的 O_2 分子反应生成单线态氧,叶黄素循环则可以有效淬灭单线态氧,而 NPQ 与依赖叶黄素循环的热耗散呈正相关关系^[31]。该试验结果表明,在 30、35 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片 NPQ 较 25 °C 时大幅度增加,这对于降低番茄幼苗叶片中过剩光能发挥了重要的作用,从而导致番茄幼苗叶片虽然光化学活性降低,但没有发生显著的光抑制。但当温度增加到 40 °C 时,番茄幼苗叶片的 NPQ 却较 30、35 °C 时显著降低,从而导致叶片中过剩光能 $(1-qP)/NPQ$ 大量积

累,这也是导致 40 °C 时番茄幼苗叶片 F_v/F_m 和 PI_{ABS} 大幅度降低的重要原因。

利用快相叶绿素荧光动力学技术和 qRT-PCR 技术进一步分析了高温胁迫下导致番茄幼苗叶片 PSII 光化学活性降低及电子传递受阻的内在原因。结果表明,随着温度的升高,番茄幼苗叶片标准化 O—P 曲线上 J 点和标准化 O—J 曲线上 K 点的相对可变荧光 V_J 和 V_K 均有不同程度的增加,但是增加幅度不同,其中 30、35 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片的 V_J 与 25 °C 相比均无显著变化,仅在温度增加到 40 °C 时显著增加,但 V_K 却在 30 °C 时就显著增加,并且随着温度的升高 V_K 继续增加。 V_K 的增加被认为是 PS II 电子供体侧放氧复合体 OEC 活性受到伤害的特异性标志^[32-33],而 V_J 上升说明光合电子传递链中 Q_A 到 Q_B 的电子传递受阻,还原态 Q_A 积累量逐渐增多^[34]。因此,该试验结果表明,高温胁迫下番茄幼苗叶片 PSII 供体侧对高温的敏感程度大于受体侧。PSII 供体侧 OEC 受 *PsbP* 基因的编码,而 PSII 受体侧 Q_A 到 Q_B 的电子传递过程的关键蛋白 D1 蛋白则受 *PsbA* 基因的编码志^[35-36]。该试验中 qRT-PCR 的结果表明,除 30 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片 *PsbA* 基因表达量与 25 °C 时差异不显著外,其它温度下番茄幼苗叶片 *PsbP* 和 *PsbA* 基因表达量均显著降低,这进一步验证了番茄幼苗叶片 PSII 电子传递速率降低的原因与供体侧 OEC 活性降低及 D1 蛋白的降解有关,特别是 *PsbP* 基因表达量在高温胁迫下的降低幅度更大,即番茄幼苗叶片 PSII 供体侧较受体侧伤害程度更大,这与 V_J 和 V_K 的变化结果相吻合,BAR-RA 等^[37]的研究也发现,高温导致植物光合作用受到抑制的主要原因为 OEC 的失活。

PS II 电子传递链上电子传递受阻,积累过多的电子会导致电子泄露,泄露的电子会攻击细胞中游离的 O_2 ,导致 O_2^- 等 ROS 的产生^[38], O_2^- 可在 SOD 歧化的作用下产生 H_2O_2 ,并且逆境下 OEC 功能的障碍也会导致水的不完全裂解产生 H_2O_2 ^[39],因此 O_2^- 和 H_2O_2 主要由光合作用介导产生,并且还会反馈抑制光合作用的正常进行^[40]。该试验中,随着温度的增加,番茄幼苗叶片 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量整体表现为增加趋势,但在 30、35 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片的

O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量与 25 °C 相比均无显著差异,这可能与此时番茄幼苗叶片启动了酶促和非酶促相关的活性氧清除系统有关。但在温度增加到 40 °C 时,番茄幼苗叶片的 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量大幅度增加,过高的温度胁迫会抑制植物体内酶的活性^[41],使活性氧不能有效清除,导致番茄幼苗叶片受到了过量活性氧的氧化伤害。光合作用介导的 ROS 首先会攻击类囊体膜使其过氧化程度的增加,光合作用相关蛋白的降解^[42],而类囊体膜过氧化又会导致 PS II 活性的降低,电子传递受阻,诱导更多的 ROS 产生,造成恶性循环^[43]。L 点相对可变荧光(V_L)的增加被认为是类囊体膜流动性发生改变,其功能和结构完整性受到了破坏的重要标志^[44-45],而光合作用相关蛋白主要附着在类囊体膜发挥电子传递等功能,因此,该试验中 40 °C 高温胁迫下番茄幼苗叶片光抑制程度加剧的原因还与 ROS 的爆发有关。

4 结论

与 25 °C 相比,30、35 °C 高温胁迫下导致番茄幼苗叶片光合能力降低的主要原因与气孔因素的限制有关,并且此时番茄幼苗均可以通过增加 NPQ 的方式来缓解高温胁迫下的光抑制。而 40 °C 高温胁迫下则发生了显著的非气孔因素。高温导致番茄幼苗叶片 PSII 光化活性降低的原因主要与 PSII 供体侧 OEC 的功能及 PSII 受体侧 Q_A 向 Q_B 的电子传递受阻有关,特别是供体侧更为敏感。高温下光合作用减弱,过剩光能积累及 PSII 光化学活性降低导致 ROS 的爆发,进一步加剧了高温胁迫下番茄幼苗叶片的光抑制程度。

参考文献

- [1] LOBELL D B, SCHLENKER W, COSTA ROBERTS J. Climate trends and global crop production since 1980[J]. Science, 2005, 333(6042): 616-620.
- [2] MITTLER R. ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress[J]. Plant Cell & Environment, 2012, 35(2): 259-270.
- [3] XU C, HUANG B. Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis* grass species contrasting in heat tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(15): 4183-4194.
- [4] LIU G T, LING M, WEI D, et al. Differential proteomic analysis of grapevine leaves by iTRAQ reveals responses to heat

- stress and subsequent recovery[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14 (1):110.
- [5] YANG Y, CHEN J, LIU Q, et al. Comparative proteomic analysis of the thermotolerant plant *Portulaca oleracea* acclimation to combined high temperature and humidity stress[J]. Journal of Proteome Research, 2012, 11(7):3605.
- [6] REDDY A S N, ALI G S, CELESNIK H, et al. Coping with stresses: Roles of calcium-and calcium/calmodulin-regulated gene expression[J]. Plant Cell, 2011, 23(6):2010.
- [7] ALLAKHVERDIEV S I, KRESLAVSKI V D, KLIMOV V V, et al. Heat stress: An overview of molecular responses in photosynthesis[J]. Photosynthesis Research, 2008, 98(1-3):541.
- [8] MEHTA P, JAJOO A, MATHUR S, et al. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on photosystem II in wheat leaves[J]. Plant Physiol Biochem, 2010, 48 (1):16-20.
- [9] BRESTIC M, ZIVCAK M, KALAJI H M, et al. Photosystem II thermostability *in situ*: Environmentally induced acclimation and genotype-specific reactions in *Triticum aestivum* L.[J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2012, 57(8):93-105.
- [10] OUKARROUM A, EL M S, STRASSER R J. Differential heat sensitivity index in barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) monitored by chlorophyll a fluorescence OKJIP[J]. Plant Physiol Biochem, 2016, 105:102-108.
- [11] ROCCO M, ARENA S, RENZONE G, et al. Proteomic analysis of temperature stress-responsive proteins in *Arabidopsis thaliana* rosette leaves[J]. Molecular Biosystems, 2013, 9(6):1257-1267.
- [12] ZHANG M, LI G, HUANG W, et al. Erratum: Proteomic study of *Carissa spinarum* in response to combined heat and drought stress[J]. Proteomics, 2010, 11(8):1555.
- [13] URBAN O, HLAVÁČOVÁ M, KLEM K, et al. Combined effects of drought and high temperature on photosynthetic characteristics in four winter wheat genotypes[J]. Field Crops Research, 2018, 223:137-149.
- [14] JAGTAP V, BHARGAVA S, STREB P, et al. Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench[J]. Journal of Experimental Botany, 1998, 49(327):1715-1721.
- [15] HALDIMANN P, FELLER U. Growth at moderately elevated temperature alters the physiological response of the photosynthetic apparatus to heat stress in pea (*Pisum sativum* L.) leaves[J]. Plant Cell & Environment, 2005(28):302-317.
- [16] ESSEMINÉ J, GOVINDACHARY S, AMMAR S, et al. Enhanced sensitivity of the photosynthetic apparatus to heat stress in digalactosyl-diacylglycerol deficient *Arabidopsis* [J]. Environmental & Experimental Botany, 2012, 80(3):16-26.
- [17] NISHIYAMA Y, ALLAKHVERDIEV S I, MURATA N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II[J]. Physiologia Plantarum, 2011, 142(1):35-46.
- [18] RÖTH S, MIRUS O, BUBLAK D, et al. DNA-binding and repressor function are prerequisite for the turnover of the tomato heat stress transcription factor HsfB1[J]. Plant Journal, 2016, 89 (1):31-44.
- [19] XU N, ZHANG H H, ZHONG H X, et al. The response of photosynthetic functions of F₁ cutting seedlings from *Physocarpus amurensis* Maxim (♀) × *Physocarpus opulifolius* “Diabolo” (♂) and the parental leaves to salt stress[J]. Frontiers in Plant Science, 2018(9):714.
- [20] ZHANG L T, GAO H Y, ZHANG Z S, et al. Multiple effects of inhibition of mitochondrial alternative oxidase pathway on photosynthetic apparatus in *Rumex K-1* leaves[J]. Biologia Plantarum, 2012, 56:365-368.
- [21] STRASSER R J, SRIVASTAVA A, GOVINDJEE. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria[J]. Photochemistry and Photobiology, 1995, 61(1):32-42.
- [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. Methods, 2001(25):402-408.
- [23] ZHANG C G, LEUNG K K, WONG Y S, et al. Germination, growth and physiological responses of mangrove plant (*Bruquiera gymnorhiza*) to lubricating oil pollution[J]. Environmental and Experimental Botany, 2007, 60:127-136.
- [24] ALEXIEVA V, SERGIEV I, MAPELLI S, et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat[J]. Plant, Cell & Environment, 2001(24):1337-1344.
- [25] LU T, MENG Z, ZHANG G, et al. Sub-high temperature and high light intensity induced irreversible inhibition on photosynthesis system of tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. Frontiers in Plant Science, 2017(18):365.
- [26] SUN X, DU Z, REN J, et al. Association of SSR markers with functional traits from heat stress in diverse tall fescue accessions[J]. BMC Plant Biology, 2015, 15(1):116.
- [27] DING H, HE J, WU Y, et al. The tomato mitogen-activated protein kinase SlMPK1 is as a negative regulator of the high temperature stress response[J]. Plant Physiology, 2018, 177(2):663-651.
- [28] SHARKEY T D, BERNACCHI C J, FARQUHAR G D, et al. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves[J]. Plant Cell Environ, 2007(30):1035-1040.
- [29] JAGTAP V, BHARGAVA S, STREB P, et al. Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench[J]. Journal of Experimental Botany, 1998, 49(327):1715-1721.
- [30] STRASSER R J, SRIVASTAVA A, GOVINDJE E. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria[J]. Photochemistry & Photobiology, 1995, 61(1):

32-42.

[31] LI X P, BJORKMAN O, SHI C, et al. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting[J]. *Nature*, 2000, 403: 391-395.

[32] ZHANG Z S, LI G, GAO H Y, et al. Characterization of photosynthetic performance during senescence in stay-green and quick-leaf-senescence *Zea mays* L. inbred lines[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42936.

[33] CHEN K, ZHANG M, ZHU H, et al. Ascorbic acid alleviates damage from heat stress in the photosystem II of tall fescue in both the photochemical and thermal phases[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017(8): 1373.

[34] ZHANG HH, XU N, SUI X, et al. Photosynthesis response to drought stress in leaves of two alfalfa (*Medicago sativa*) varieties[J]. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2018, 20(5): 1012-1020.

[35] ERINLE K O, JIANG Z, MA B, et al. Exogenous calcium induces tolerance to atrazine stress in *Pennisetum* seedlings and promotes photosynthetic activity, antioxidant enzymes and *psbA* gene transcripts[J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2016, 132: 403-412.

[36] ASADA M, NISHIMURA T, IFUKU K, et al. Location of the extrinsic subunit PsbP in photosystem II studied by pulsed electron-electron double resonance[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1859(5): 394-399.

[37] BARRA M, HAUMANN M, DAU H. Specific loss of the extrinsic 18 KDa protein from photosystem II upon heating to 47 degrees C causes inactivation of oxygen evolution likely due to Ca release from the Mn-complex[J]. *Photosynthesis Research*, 2005, 84(1-3): 231-237.

[38] JASPERS P, KANGASJÄRVI J. Reactive oxygen species in

abiotic stress signaling[J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, 138(4): 405.

[39] POSPIŠIL P. Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1817(1): 218-231.

[40] BIALASEK M, GÓRECKA M, MITTLER R, et al. Evidence for the involvement of electrical, calcium and ROS signaling in the systemic regulation of non-photochemical quenching and photosynthesis[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2017, 58(2): 207-215.

[41] DJANAGUIRAMAN M, BOYLE D L, WELTI R, et al. Decreased photosynthetic rate under high temperature in wheat is due to lipid desaturation, oxidation, acylation, and damage of organelles[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 55.

[42] TAKAHASHI S, NAKAMURA T, SAKAMIZU M, et al. Repair machinery of symbiotic photosynthesis as the primary target of heat stress for reef-building corals[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2004, 45(2): 251-255.

[43] NISHIYAMA Y, ALLAKHVERDIEV S I, MURATA N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II[J]. *Physiologia Plantarum*, 2011, 142(1): 35-46.

[44] ESSEMINÉ J, GOVINDACHARY S, AMMAR S, et al. Enhanced sensitivity of the photosynthetic apparatus to heat stress in digalactosyl-diacylglycerol deficient *Arabidopsis* [J]. *Environmental & Experimental Botany*, 2012, 80(80): 16-26.

[45] TÓTH S Z, SCHANSKER G, KISSIMON J, et al. Biophysical studies of photosystem II-related recovery processes after a heat pulse in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162(2): 181-194.

Effects of Photosynthetic, PSII Electron Transport and Reactive Oxygen Species on Short-term High Temperature Stress in Tomato Seedlings

YIN Zepeng^{1,2}, LU Jiazhi¹, GAO Zhenhua¹, QI Mingfang¹, MENG Sida¹, LI Tianlai¹

(1. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University/Key Laboratory of Protected Horticulture of Ministry of Education, Shenyang, Liaoning 110161; 2. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: In this study, the photosynthetic gas exchange parameters, chlorophyll fluorescence parameters, the gene relative expression of PSII core protein and the reactive oxygen species (ROS) metabolism in response to high temperature stress at different high temperature (25 °C, 30 °C, 35 °C and 40 °C) for 12 hours were studied. The results showed that photosynthetic carbon assimilation ability was inhibited with the increase of temperature in tomato seedlings. The inhibited reason for photosynthesis in tomato seedlings under 30 °C and 35 °C high temperature stress was stomatal factor, while stomatal and non-stomatal factors were limited collectively at 40 °C. Under high temperature

stress, the activity of PSII reaction center in tomato seedling leaves decreased, PSII electron transport was blocked, and the relative expression of *PsbA* and *PsbP* genes decreased, which implied that the main action site in response to high temperature was PSII donor side oxygen release complex (OEC) and the transmission process from Q_A to Q_B on the PSII receptor side in tomato seedling leaves. The relative expression of *PsbP* gene was significantly higher than that of *PsbA* under high temperature stress, and the relative variable fluorescence (V_K) at 0.3 ms on the standardized OJIP curve was greater than the relative variable fluorescence (V_I) at 2 ms, indicating that the damage caused by high temperature stress on the donor side was greater than the receptor side on tomato seedlings. Tomato seedling leaves did not induce excessive production of reactive oxygen species (ROS) at high temperature stress of 30 °C and 35 °C for 12 hours, which was related to the non-photochemical quenching (NPQ) effective quenching of excess light energy, while NPQ was significantly reduced under 40 °C stress, which resulted in excessive accumulation of excess light energy $(1-qP)/NPQ$ and ROS in the leaves. This was an important reason caused further photoinhibition.

Keywords: tomato; high temperature stress; photosynthesis; PSII; gene expression; reactive oxygen species

怎样防止番茄落花落果

信息广角

番茄生长发育进入开花结果期后,常常不同程度地发生花果脱落现象,给番茄产量和品质的提高带来不利。

一、番茄落花落果的原因。1)低温阴雨。番茄开花期的最适宜温度为 25~28 °C,当温度下降到 15 °C 以下时,花粉就发芽不良,下降至 10 °C 以下时,导致受精不良,花体生长激素缺乏而大量落花。同时,番茄开花期如果遇上长低温阴雨,日照不足,一方面因雨水对花朵的冲淋,有机物无法通过正常的光合作用产生,花朵发育不良而出现落花落果。另一方面,低温阴雨时空气湿度较大,花粉粒膨胀过度而破裂,失去授粉能力而造成落花。2)高温干旱。番茄开花结果期对水分十分敏感,土壤过干,特别是由湿润转干或植株短时间内失水过多,生长不良,花粉失水不育而引起落花落果。此外,番茄开花结果正值夏秋高温天气,有时中午气温高达 30~40 °C,甚至超过 40 °C,这时尤其易造成高温灼伤,花粉败育,花朵萎缩而落花。3)养分不足。番茄进入花果期后,开花、花蕾形成、坐果和果实生长发育等各种养分的需求达高峰期。此时若养分供应不足会出现落花落果。营养不良还会影响到花器官及果实的正常发育,如出现花粉小、花柱细长不均,致使不能正常授粉而脱落。

二、防止番茄落花落果措施。防止番茄落花落果要在适时播种、培育壮苗、合理密植、科学施肥、增强植株的抗逆能力的基础上,针对性地做好以下工作。1)改善番茄花果期的温湿条件。春季防低温,夏秋季防高温或干旱,适时灌水排水,保持地面干爽,高温时进行叶面喷水雾以降温护花保果。2)保证番茄花果期的养分供应。番茄中、后施肥以叶面喷肥为好,如坐果期喷施 0.2%~0.3% 的磷酸二氢钾。对有明显缺肥早衰症状的,要及时补施速效性肥料。3)及时进行化学调控。生产应用较多且有效的药剂是番茄灵和 2,4-D。番茄灵的使用浓度为 20~40 mg·kg⁻¹,一般喷、浸蘸花朵用 25~30 mg·kg⁻¹,蘸花梗用 30~35 mg·kg⁻¹,春季防低温落花用 35~40 mg·kg⁻¹,夏季防高温落花用 25 mg·kg⁻¹。2,4-D 使用浓度为 10~20 mg·kg⁻¹,高温季节或浸花或喷花浓度稍低,反之稍高,但要注意防止药害。

(摘自:中国农业科技信息网)