

干旱和高温对油菜叶片光合作用和叶绿素荧光特性的影响

黄纯倩, 朱晓义, 张亮, 孙兴超, 华玮*

(中国农业科学院油料作物研究所/农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 湖北 武汉, 430062)

摘要:为研究干旱和高温胁迫对油菜光合作用的影响, 利用甘蓝型快生油菜 29005, 于植物生长箱中进行干旱(保持 6d 不浇水, 土壤相对含水量降至 15% 左右)和高温(处理 7d: 40℃, 16h 光照; 35℃, 8h 黑暗)胁迫处理, 分别测定了干旱和高温胁迫后油菜光合和叶绿素荧光特性以及光合作用关键酶的变化情况。结果表明: 干旱和高温均抑制油菜的生长和光合作用, 干旱胁迫下油菜叶片净光合速率、气孔导度、蒸腾速率等光合参数降低明显, 而光系统 II (PS II) 光化学效率 (Fv/Fm)、最大电子传递速率 (ETRmax) 等叶绿素荧光参数降低较慢, 经过 3d 的复水恢复后这些参数能够部分恢复; 高温胁迫后叶片净光合速率、气孔导度、蒸腾速率等光合参数降低较为缓慢, 而 Fv/Fm、ETRmax 等叶绿素荧光参数则迅速下降, 且在胁迫解除后这些参数进一步降低。干旱胁迫后 Rubisco 活性未表现出显著变化, 持续的高温对 Rubisco 有抑制作用。可见, 干旱胁迫首先影响了油菜叶片光合作用的碳同化过程, 对光反应系统破坏是可逆的, 胁迫解除后对后期的生长发育影响小于高温影响, 高温胁迫更容易造成油菜叶片 PS II 不可逆破坏, 进而对光合作用以及后期的生长发育产生难以恢复的影响。

关键词:甘蓝型油菜; 干旱; 高温; 光合作用; 叶绿素荧光

中图分类号:S565.403 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-9084(2017)03-0342-09

Effects of drought and high temperature on photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics of rapeseed leaves

HUANG Chun-qian, ZHU Xiao-yi, ZHANG Liang, SUN Xing-chao, HUA Wei*

(Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key

Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China)

Abstract: To better understand the effect of drought and high temperature on rapeseed (*Brassica napus* L.), photosynthesis of fast plant variety 29005 was stressed by drought (no irrigation for 6d till the relative soil water content reaching ~15%) and heat (for 7d, 40℃ for 16h at daylight, 35℃ for 8h in dark for each day) in growth chamber. Changes of photosynthetic and chlorophyll fluorescence parameters were investigated, and key enzymes of photosynthesis were detected. Results showed that plant growth and photosynthesis of 29005 were inhibited under two stresses. Net photosynthetic rate (Pn), stomatal conductance (Gs) and transpiration rate (Tr) were largely declined under progressive drought stress, while chlorophyll fluorescence parameters, including maximal photochemical efficiency of PS II (Fv/Fm) and maximal photosynthetic electron transport rate (ETRmax), showed relatively slow decrease. Meanwhile, these 2 parameters were considerably recovered after rewatering for 3 days. Comparing with those under drought stress, Pn, Gs and Tr were decreased slowly after heat stress, and Fv/Fm and ETRmax were sharply declined. Moreover, Fv/Fm and ETRmax were further decreased even after recovery from heat. Rubisco activity was not significantly changed under drought, but decreased obviously under sustained high temperature. The above results indicated that carbon assimilation part in rapeseed photosynthesis was mainly

收稿日期: 2017-02-23

基金项目: 湖北省自然科学基金(2015CFB348); 国家 863 计划(2013AA102602)

作者简介: 黄纯倩(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物生理学与分子生物学, E-mail: 15623254697@163.com

* 通讯作者: 华玮(1977-), 女, 研究员, 博士, 从事油菜功能基因组学研究, E-mail: huawei@oilcrops.cn

affected by drought, while the inhibition of rapeseed photosynthesis by drought stress was reversible, and the adverse effect on later growth and development was relatively weak after stress recovery. On the contrary, high temperature was more likely to cause irreversible damage to PS II in leaves, which further resulted in severe damages on photosynthesis, growth and development of plant.

Key words: *Brassica napus* L.; drought; high temperature; photosynthesis; chlorophyll fluorescence

随着全球变暖,高温干旱等极端气候事件的发生呈现增多加重的趋势^[1]。干旱是我国最为严重的农业气象灾害,在各种气象灾害中,旱灾造成的损失达62%^[2]。同时,当高温和干旱相伴发生时,高温胁迫发生的频率和范围很可能增大^[3]。这些气候变化对农业生产带来重要影响。油菜是我国重要的油料作物,种植面积和产量均居世界首位,在农业和农村经济中发挥着重要的作用^[4]。近年来的气候变化对我国油菜生产带来了一系列不利影响,如降水量分布不均引起严重干旱,初夏升温过快,引起高温逼熟、生育期缩短,导致油菜产量和品质下降等^[5]。

干旱高温等逆境条件下光合作用的改变通常认为是植物遭受逆境损伤的首要生理过程^[6]。赵丽英等研究表明,在轻度干旱条件下,油菜叶片光合速率和蒸腾速率会增加,而气孔导度则缓慢下降,当胁迫程度加重时,三者均出现明显下降^[7]。蒙祖庆等研究表明干旱胁迫造成油菜实际光化学效率、表观光合电子传递速率、光化学淬灭系数、净光合速率、气孔导度、胞间 CO₂ 浓度、蒸腾速率均下降^[8]。相对于其它作物,关于高温对油菜光合系统的破坏研究较少,一般认为植物遭受中度高温胁迫后,首先受影响的是光合碳同化过程,主要是 Rubisco 的活性降低,进而 PSI 细胞色素复合体和类囊体膜功能受到影响,光系统 II (PS II) 的功能一般不受影响^[9]。只有当温度继续升高,才会造成 PS II 的不可逆伤害,使类囊体膜结构破坏,电子传递紊乱,并可能导致细胞、叶片乃至植物的死亡^[10]。王日明等在黑麦草中的研究表明,高温胁迫条件下黑麦草生长减缓,叶绿素含量和光合作用显著下降^[11]。孙云飞等在丹参中的研究表明,随着高温胁迫时间的延长,丹参叶片净光合速率、气孔导度、胞间 CO₂ 浓度和蒸腾速率等光合参数呈下降趋势,最大光化学量子产量、PS II 潜在光化学活性、和表观光合电子传递速率等叶绿素荧光参数也呈下降趋势,且各指标均与胁迫时间呈负相关^[12]。

叶绿素荧光动力学技术是无损伤光合作用能量转化的探测技术,目前广泛应用于植物光合生理的测量中。由于 PS II 对于环境因素变化的敏感性,叶

绿素荧光动力学技术也同时被广泛应用于指示植物对环境胁迫的响应过程^[13]。番茄中的研究显示叶绿素荧光可很好地显示水分胁迫的程度,并可在大规模筛选中指示植株对干旱胁迫的抗性水平^[14]。Bresson 等在拟南芥中利用叶绿素荧光技术分析了拟南芥植株在水分胁迫下的生长及光合的时空异质性^[15]。叶绿素荧光技术在大豆中也被应用于检测高温对植株叶片特性和光合生理的影响^[16]。另外,叶绿素荧光动力学技术也在研究植株对高光和盐胁迫等逆境下的生理变化中有着大量的应用^[13,17]。

本研究通过人工模拟干旱和高温胁迫环境,同时测定了两种胁迫下油菜光合作用参数和叶绿素荧光参数的变化,分析这两种逆境胁迫对油菜光合作用和叶绿素荧光的影响。同时测定了不同胁迫时间下的光合作用关键酶的活性,以期比较同一发育时期,干旱和高温胁迫对油菜光合作用生理生化和形态产生的不同影响,从而深入和客观地认识高温与干旱对油菜造成伤害的生理生化机制。

1 材料与方法

1.1 材料与种植

甘蓝型油菜品种 29005,由本实验室收集保存,是一种快生油菜,其生长周期约 4 个月,抽薹期为 45d 左右。油菜种子先在滤纸上萌发后幼芽移栽至土壤中,在温度为 22℃,光源为 LED 钠灯,湿度约 50%~70% 的的温室中生长一个月后(苗期,5~6 叶期)选生长状况较为一致的 8 盆材料(每盆 2 株)转移至光照植物生长箱内适应 3d,光照培养箱的条件设置为:25℃,60% 湿度,16h 光照;22℃,70% 湿度,8h 黑暗,期间正常浇水。经过 3d 的适应后各选取 4 盆材料分别进行下一步干旱和高温胁迫处理。

1.2 干旱、高温胁迫处理

干旱和高温胁迫均在光照培养箱内进行。干旱胁迫^[8]的生长箱设置条件为:25℃,40% 湿度,16h 光照;22℃,50% 湿度,8h 黑暗,期间保持 6d 不浇水,土壤相对含水量降至 15% 左右,进行复水。高温胁迫^[9]的生长箱设置条件为:40℃,60% 湿度,16h 光照;35℃,70% 湿度,8h 黑暗,每天正常浇水,高温处理 7d 时植株的净光合速率降至 0 附近且不再继

续下降,然后移入 25℃ 下进行恢复生长。每盆选取一片完全展开的倒三叶进行标记(4 个重复)和相关指标的连续测定。由于干旱和高温胁迫下植株的生长发育会受到明显抑制,本实验选取胁迫即将起始的对应正常生长植株作为胁迫处理的对照材料。

1.3 光合和叶绿素荧光参数的测定

净光合速率、气孔导度、蒸腾速率和胞间二氧化碳浓度均利用 LI-6400XT 光合仪于每天上午 10:00 左右连续测定, F_0 、 F_m 、 ETR_{max} 等叶绿素荧光参数利用调制式叶绿素荧光仪于每天生长箱灯光亮起之前(7:00~8:00)在暗处连续测定。连续几天胁迫使净光合速率降至 0 附近后,将两培养箱设置为 25℃,60% 湿度,16h 光照;22℃,70% 湿度,8h 黑暗,期间正常浇水使材料恢复,恢复 3d 后再进行各项指标的测定,1 周后对生长状况进行拍照。

1.4 光合相关酶活的测定

1.4.1 取样 分别选取干旱、高温胁迫前,胁迫处理 2d、4d、6d 的叶片,迅速置于液氮中然后保存于 -80℃ 冰箱中,每个样品设置 3 个重复。

1.4.2 总蛋白抽提纯化 油菜叶片样品经液氮研磨后,称取 0.2g 粉末于 1mL 预冷(冰浴)的抽提缓冲液中进行蛋白提取。抽提缓冲液含 50mmol/L Tricine-KOH (pH 8.0)、5mmol/L $MgCl_2$ 、1mmol/L EDTA 和 5mmol/L DTT。提取液于 4℃ 下 20 000g 离心 15min。离心后上清过 Sephadex G-25 层析柱脱盐得到纯化的总蛋白,即可立即用于后续酶活测定。纯化后的蛋白用 Bradford 法测定浓度^[18]。

1.4.3 酶活测定 Rubisco 酶活测定参考文献[19]并做了部分修改,反应体系中加入 20 μ L 纯化的总蛋白,加入 1mmol/L RuBP 启动反应,总体体系为 0.5mL;PEPC 活性测定参考文献[20]并做部分修改,反应体系中加入 2mmol/L PEP 启动反应,总体体系为 0.5mL。室温下利用紫外分光光度计 SPECORD 205 测定 340nm 处每分钟下 NADH 含量的变化;NADP-MDH 酶活测定参考文献[21]并做了部分修改,反应液总体体系为 0.5mL。反应前纯化的总蛋白中加入 25mmol/L DTT 在室温下预先放置 15min;NADP-ME 酶活测定参考文献[21]并做了部分修改,反应液体系中加入 20mmol/L $MgCl_2$ 启动反应,总体体系为 0.5mL。不加 $MgCl_2$ 的反应设置为空白对照。室温下利用紫外分光光度计 SPECORD 205 测定 340nm 处每分钟下 NADPH 含量的变化。

1.5 数据整理与统计分析

采用 Excel 和 SPSS 软件进行统计分析。数据

均为 3~4 次重复的平均值。

2 结果与分析

2.1 干旱、高温胁迫后的光合参数变化

2.1.1 干旱、高温胁迫对油菜叶片净光合速率的影响 干旱和高温胁迫都使得油菜叶片的净光合速率降低,但二者的降低趋势呈现不同的特点。高温胁迫下油菜净光合速率随着胁迫时间的延长逐渐降低,且降低趋势比较平缓,在连续胁迫的第 6d 净光合速率约为 6 μ mol·m⁻²·s⁻¹,第 7d 净光合速率约为 4 μ mol·m⁻²·s⁻¹;而干旱胁迫下,胁迫第 1d 和第 2d 净光合速率降低较缓慢,但在第 3d 之后下降迅速,在连续胁迫的第 6d 净光合速率已降至 0 附近。

经过 3d 的胁迫恢复处理后,油菜叶片的净光合速率呈现相反的变化趋势:干旱胁迫恢复处理后油菜叶片净光合速率从 0 附近升高至约 4 μ mol·m⁻²·s⁻¹,表现出一定的恢复能力;但高温胁迫恢复处理后净光合速率反而从原来的 4 μ mol·m⁻²·s⁻¹降低至 0 附近(图 1),并未表现出恢复。

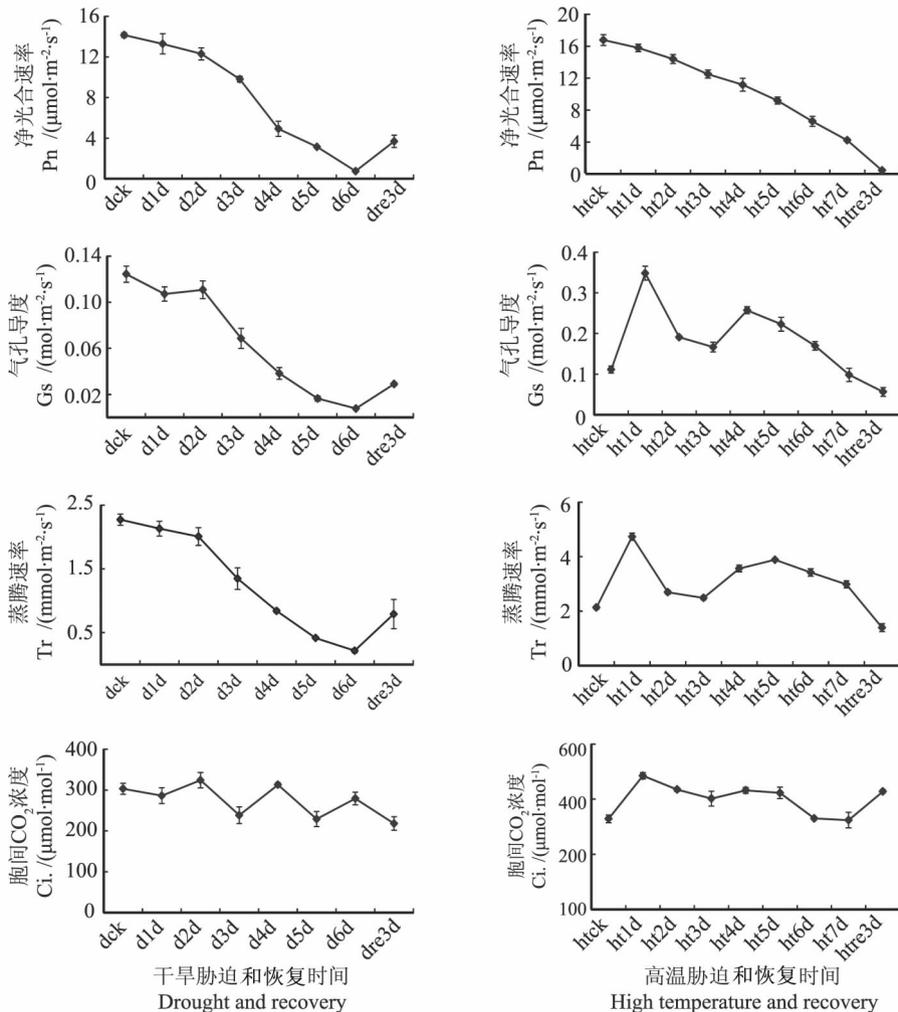
2.1.2 干旱、高温胁迫对油菜叶片气孔导度和蒸腾速率的影响 气孔通过调节气孔导度影响植物的光合速率和蒸腾速率。图 1 可以看出,干旱胁迫后气孔导度的变化与净光合速率和蒸腾速率的变化趋势非常相似,都在第 1d 和第 2d 降低缓慢,第 3d 之后迅速下降,直到降至 0 附近,且恢复正常 3d 后又有一定程度的上升;高温胁迫后,相比与净光合速率的变化,气孔导度与蒸腾速率的变化趋势更加一致,都在胁迫的第 1d 显著上升,然后又迅速下降,又在第 4d 小幅度上升后一直下降,且在 3d 的恢复正常后仍然保持下降趋势。

净光合速率、气孔导度和蒸腾速率之间相关性分析结果表明,干旱胁迫后叶片的气孔导度与净光合速率的相关系数为 0.988 6,气孔导度与蒸腾速率的相关系数为 0.995 2;高温胁迫后叶片的气孔导度与净光合速率的相关系数为 0.578 2,气孔导度与蒸腾速率的相关系数为 0.890 2,因此叶片蒸腾速率与气孔导度正相关。

2.1.3 干旱、高温胁迫对油菜叶片胞间 CO₂ 浓度的影响 胞间 CO₂ 浓度可作为判断光合作用潜在能力的一项指标。由图 1 可以看到,干旱和高温胁迫后胞间 CO₂ 浓度有升有降,未表现出明显的规律性,但干旱胁迫后胞间 CO₂ 浓度一般维持在约 230~300 μ mol·mol⁻¹之间,恢复正常 3d 后叶片胞间 CO₂ 浓度降至 218 μ mol·mol⁻¹;而高温胁迫后胞间

CO₂ 浓度一般维持在约 300 ~ 480 μmol · mol⁻¹ 之间,恢复正常 3d 后胞间 CO₂ 浓度升至 428 μmol · mol⁻¹(图 1),由此可以看出干旱胁迫后胞间 CO₂ 浓

度一般维持在较低的水平,而高温胁迫后胞间 CO₂ 浓度维持在相对较高的水平。



注:dck:干旱胁迫对照;dnd:干旱胁迫n天;dre3d:干旱胁迫后恢复3d;htck:高温胁迫对照;htnd:高温胁迫n天;htre3d:高温胁迫后恢复3d。下同

Note:dck;drought stress control; dnd;drought stress for n days; dre3d;recovery for 3 days after drought stress; htck;high temperature stress control; ht1d;high temperature stress for n days; htre3d;recovery for 3 days after high temperature stress. Same as below

图 1 干旱、高温胁迫及恢复后叶片净光合速率、气孔导度、蒸腾速率和胞间 CO₂ 浓度的变化

Fig.1 Changes of net photosynthetic rate, stomatal conductance, transpiration rate and intercellular CO₂ concentration under drought, high temperature and recovered conditions

2.2 干旱、高温胁迫后的叶绿素荧光参数变化

2.2.1 初始荧光和最大荧光的变化 通过测定的数据作图发现,随干旱胁迫时间的延长,F₀ 呈现缓慢上升的趋势,F_m 却有缓慢下降的趋势,但变化相对比较稳定,F₀ 维持在 0.06 ~ 0.08 之间,F_m 维持在 0.20 ~ 0.26 之间;但在高温胁迫下,F₀ 和 F_m 均随着高温胁迫时间的延长而逐渐升高,在高温胁迫第 7d,F₀ 升高至约 0.23,F_m 升高至约 0.37。因此相对于干旱胁迫,高温胁迫更容易使 PS II 反应中心受

到破坏。恢复正常 3d 后,干旱处理后的 F₀ 又上升至 0.12,但仍小于高温胁迫恢复后的 F₀(0.2),但两者的 F_m 都在 0.3 左右。

2.2.2 PS II 光化学效率(F_v/F_m) 干旱和高温胁迫后 F_v/F_m 均呈现降低趋势,干旱胁迫后从 0.77 降至 0.66,降幅较小,且在胁迫第 5d 后及恢复正常 3d 后一直保持在 0.66 左右;但高温胁迫后从 0.76 降至 0.27,降幅较大,且随胁迫时间的延长持续降低,恢复正常 3d 后仍呈下降趋势(图 2)。

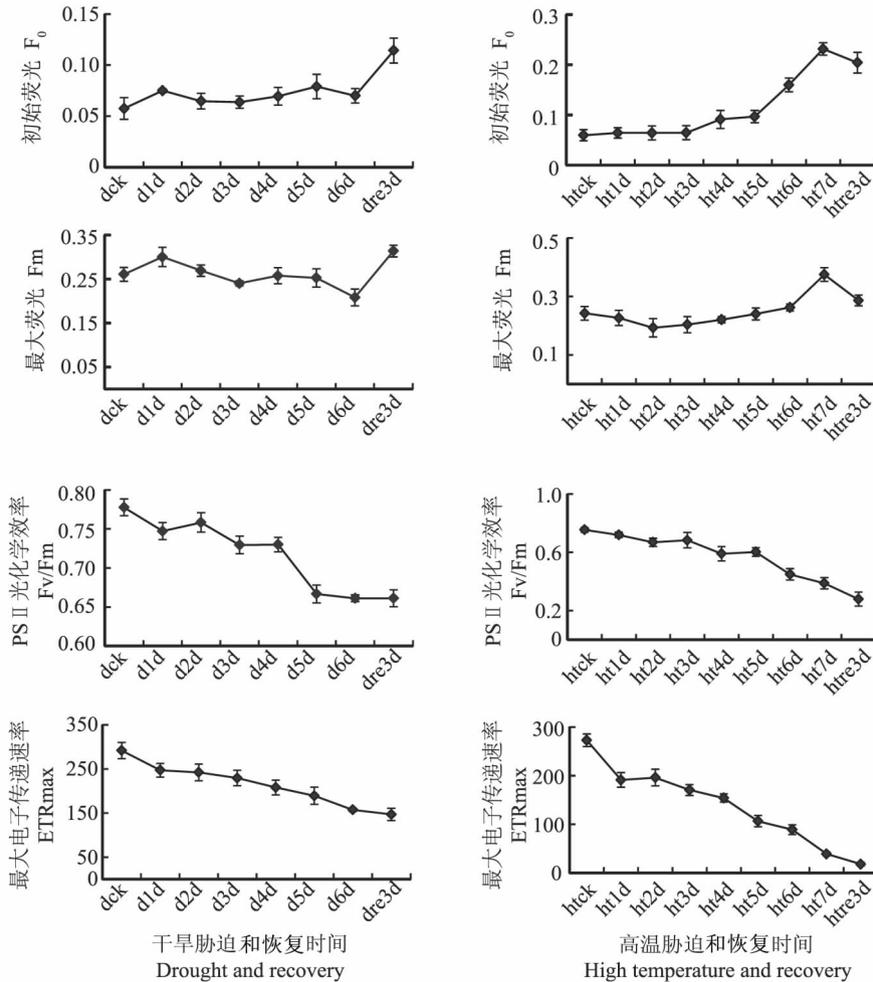


图2 干旱、高温胁迫及恢复后的叶绿素荧光参数变化

Fig. 2 Changes of chlorophyll fluorescence under drought, high temperature and recovered conditions

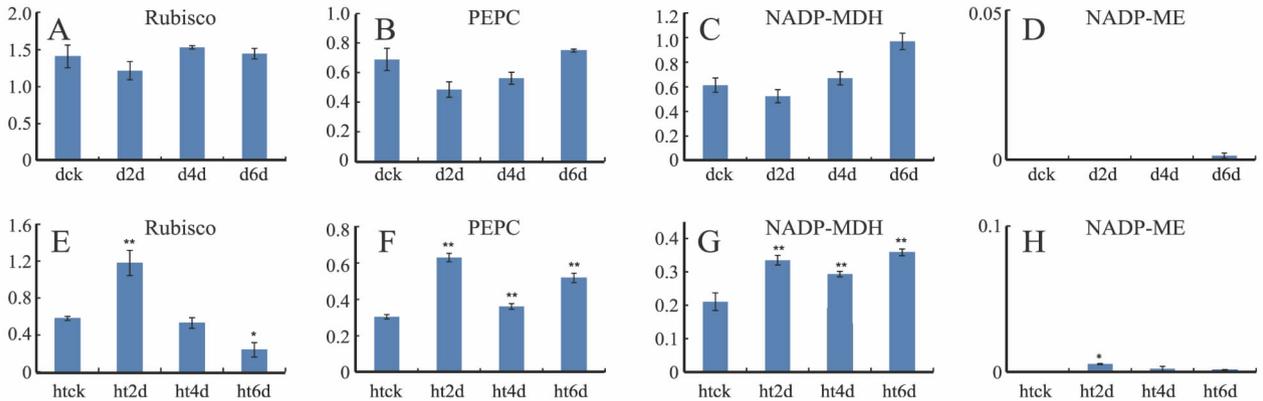
2.2.3 最大电子传递速率 ETR_{max} 的变化 ETR_{max} 为无光抑制时的最大潜在相对电子传递速率。随着干旱和高温胁迫时间的延长, ETR_{max} 逐渐降低, 但高温胁迫后的降幅明显, 从 300 降至 20, 干旱胁迫后仍保持 150 左右的电子传递速率(图 2), 说明高温胁迫对光反应的电子传递速率的影响更大, 严重阻碍了光合电子的传递。

2.3 干旱、高温胁迫后的光合相关酶活变化

2.3.1 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 活性 Rubisco 是光合作用 C3 关键酶, 干旱胁迫后, Rubisco 酶活性与对照未表现出显著差异, 因此可以认为干旱胁迫对 Rubisco 酶活无显著影响。但高温胁迫后, Rubisco 先在高温胁迫 2d 后显著升高, 然后随着胁迫时间的延长又逐渐降低, 说明持续的高温对 Rubisco 酶活有抑制作用(图 3A、E)。

2.3.2 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 活性 PEPC 是光合作用 C4 关键酶, 干旱胁迫 2d 和 4d 时 PEPC 活性表现出显著降低, 但干旱胁迫 6d 后又升高至对照水平。高温胁迫后 PEPC 活性与对照相比均表现出显著升高, 在高温胁迫 2d 时活性最高(图 3B、F), 说明短期的干旱胁迫对 PEPC 活性有抑制作用, 但短期的高温有利于提高 PEPC 活性。

2.3.3 苹果酸脱氢酶 (NADP-MDH) 活性 在 C3 植物的叶绿体中, NADP-MDH 催化草酰乙酸生成苹果酸转运到细胞质中, 在 C4 植物中 NADP-MDH 存在于叶肉细胞中, 是光合 C4 途径中的关键酶之一^[22]。干旱胁迫后, NADP-MDH 活性在胁迫 2d 时降低, 然后在胁迫 4d 和 6d 时逐渐升高, 干旱胁迫 6d 时 NADP-MDH 活性显著高于对照。高温胁迫后, NADP-MDH 活性随胁迫时间的延长显著升高(图 3C、G)。



注:酶活单位 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。A~D:干旱处理;E~H:高温处理;t-测验 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: Activity of the enzymes was in $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. A~D:drought stress;E~H:high temperature stress;t-test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图3 干旱、高温胁迫下的光合相关酶活变化

Fig.3 Activity changes of photosynthesis related enzymes under drought and high temperature stress

2.3.4 苹果酸酶(NADP-ME)活性 NADP-ME是调控苹果酸代谢的关键酶,是C₄光合途径中的另一个关键酶。从酶活测定的结果来看,NADP-ME在油菜中的活性非常低,几乎检测不到,干旱和高温胁迫后可以检测到较低的酶活性,但与对照相比差别不显著(图3D、H),因此认为高温和干旱胁迫对NADP-ME的活性没有显著作用。

2.4 干旱、高温胁迫后恢复正常时油菜生长状况的变化

干旱胁迫经过恢复后油菜基本可以恢复生长;高温胁迫后油菜叶片失绿变白,叶片卷曲并皱缩严重,油菜的生长受阻。高温胁迫经过1周恢复正常后油菜叶片进一步皱缩,由叶缘枯黄萎蔫,基部叶片枯死凋落,茎节伸长受阻。油菜的抽薹及开花也受到严重影响,有些不能正常开花,有些开花后花色变白色或紫色,无角果或角果发育不全(图4)。

3 结论与讨论

初始荧光(F_0)是PS II反应中心处于完全开放时的荧光产量, F_0 的减少表明天线色素的热耗散增加, F_0 的增加则表明PS II反应中心受到破坏或可逆性失活^[13]。最大荧光(F_m)是PS II反应中心处于完全关闭时的荧光产量,反映通过PS II的电子传递情况^[15]。本研究发现,干旱胁迫后,油菜叶片 F_0 和 F_m 升高幅度不明显,说明干旱胁迫对PS II反应中心的破坏较小。 F_v/F_m 为PS II最大光化学效率,反映PS II反应中心原初光能转化效率,植物在胁迫下PS II受到伤害时该值降低^[17]。胁迫后油菜叶片 F_v/F_m 和最大电子传递速率 ETR_{max} 虽有所下降,但均维持在相对较高的水平,说明干旱胁迫对油菜叶片的伤害程度较小,并未严重影响叶片的光能利

用率和电子传递功能,这与蒙祖庆等人的研究结果相似^[8]。在干旱胁迫第6d叶片净光合速率已降低至0附近,除了胞间CO₂浓度变化不明显以外,气孔导度和蒸腾速率也都显著下降,此时光合作用的碳同化过程已受到明显抑制。胁迫解除后,叶片净光合速率、气孔导度和蒸腾速率都明显得到部分恢复, F_v/F_m 和 ETR_{max} 没有明显变化,从植株的生长状况来看,植株能继续开花和结角,基本上能恢复正常生长,由此我们认为,干旱胁迫首先影响了油菜叶片光合作用的碳同化过程,而其光能利用率和电子传递等光反应过程依然可以保持功能状态。Lawlor等人认为,干旱胁迫后即使叶片的相对含水量(RWC)很低,叶片仍有持续的氧气释放,而此时净CO₂同化被完全抑制且不能被增高的外界CO₂所恢复,但光合电子可以通过光呼吸或Mehler反应被传递到CO₂之外的其他受体,因此高等植物中水的光解和电子传递等光反应过程受干旱胁迫的影响较小^[23],也即意味着PS II、PS I及其电子传递的功能对一定程度的干旱胁迫并不敏感。

高温胁迫后油菜净光合速率、气孔导度和蒸腾速率下降比较平缓,而初始荧光 F_0 和最大荧光 F_m 明显升高,说明高温胁迫破坏PS II反应中心,而且在胁迫后油菜叶片 F_v/F_m 和 ETR_{max} 迅速下降,说明高温胁迫后PS II受到了明显的光抑制,并影响了电子传递功能。胁迫解除后,油菜叶片的净光合速率进一步降低,植株开花、结角也受到了严重抑制,因此我们认为,高温胁迫首先影响了油菜叶片光合作用的光能利用和电子传递等的光反应过程,进而影响光合碳同化过程抑制了净光合速率。植物在高温胁迫下常伴随着 F_0 上升,但在25~40℃时 F_0 增幅不大,只有在45~50℃高温下, F_0 的升高才使PS



注:A:胁迫起始后7d的正常对照;B:干旱胁迫6d;C:高温胁迫7d;D:胁迫恢复10d同时期正常生长对照;E:干旱胁迫恢复9d;F:高温胁迫恢复10d

Note:A:Normal plant (control) of 7 days after stress started; B:Drought stress for 6 days; C:High temperature stress for 7 days; D:Normal plant (control) after 10 days recovery; E:9 days recovery from drought stress; F:10 days recovery from high temperature stress

图4 干旱、高温胁迫恢复后油菜生长状况的变化

Fig. 4 Phenotypic changes of rapeseed growth status after recovered from drought and high temperature stress

II 反应中心发生可逆失活^[24],这种中度高温胁迫抑制净光合速率曾一度归因于高温对光合电子传递的影响,特别是对 PS II 供体水光解反应的抑制^[25]。但严重的高温胁迫可以导致外周天线色素的构象变化以及天线色素与 PS II 反应中心脱离,使 PS II 的放氧复合物失活、脱落,从 QA 到 QB 的电子传递也明显受阻^[26],从而使 PS II 受到不可逆伤害。本研究结果表明,40℃的高温使油菜光合作用受到了不可逆伤害,说明油菜叶片光合作用中 PS II 对高温更加敏感,这可能是油菜不耐高温的原因之一。

从光合相关酶活的变化来看,干旱胁迫对 C3 关键酶 Rubisco 活性未表现出显著影响,而持续的高温对 Rubisco 酶活有显著抑制。有研究表明在

RWC90% 至 70% 或更低范围内,Rubisco 的蛋白量和活性(包括原初活性、总活性和最大活性)不会大幅改变,只有在严重干旱胁迫下,Rubisco 活性才会下降^[27]。但高温胁迫后,在叶内生化环境下 Rubisco 使惰性产物或底物类似物(如木酮糖二磷酸、3-酮基阿拉伯糖醇-二磷酸)生成加快而逐渐失活^[10],而 Rubisco 活化状态下降也是光合作用在高温胁迫下受抑的主要原因^[28]。另外,油菜作为典型的 C3 类作物,检测发现其叶片中存在 C4 关键酶 PEPC 和 NADP-MDH;Singal 等^[29]在白菜型油菜的角果中也发现了含量相对较高的 PEPC、NADP-MDH 和 NADP-ME 等 C4 相关酶活性。但我们在油菜的叶片中几乎没有检测到 NADP-ME 的活性,

且在不同时间的干旱和高温胁迫后,NADP - ME 活性几乎没有变化,不过,PEPC 活性在短期高温胁迫下显著增加,NADP - MDH 活性在干旱和高温胁迫下均有显著增加。目前,C3 作物光合作用 C4 化改良被认为是提高作物光合作用的重要途径之一^[30],适度的干旱和高温胁迫也被认为是 C4 光合作用进化的有利条件^[31],在不影响油菜正常生长的情况下进行适度干旱和高温处理,使其潜在的 C4 相关酶活得到一定程度的发挥,或可为油菜光合作用遗传改良提供理论和技术支持。

干旱胁迫导致植物机体出现严重的氧化伤害,显著降低了生长速率,使生长发育受阻,产量下降^[32]。我们的研究结果也表明,干旱胁迫使油菜的叶片萎蔫,衰老加快,并抑制了油菜的生长,但干旱后复水显著刺激了油菜生长,使其茎节伸长迅速,开花和结果也提前。Siopongco 等人在水稻中的研究表明干旱后复水明显刺激了水稻的生长^[33],卜令铎等人^[34]也在玉米的研究中得到了相同的结果。高温胁迫影响植物的内稳态,使植物生长发育出现阻滞。油菜在遭受 40℃ 连续 7d 的高温胁迫后,叶片失绿皱缩,生长停滞;温度恢复正常后油菜后期的生长发育也受到严重影响,茎节未能继续伸长,开花和结角也受到严重影响,并未同干旱胁迫一样得到较好的恢复,这与孙宪芝等人在菊花中的研究结果一致^[35]。

综上所述,干旱和高温胁迫均使油菜的生长和光合作用受到抑制,本试验设计的干旱胁迫处理对油菜光合作用的抑制是可逆的,如果能及时复水,可以减弱甚至消除胁迫影响。而高温胁迫使油菜叶片 PS II 引起不可逆破坏,进而对光合作用产生难以恢复的影响,这可能与油菜不耐高温的生长习性有关,研究表明油菜喜冷凉或较温暖的气候,在日平均气温 22℃ 以下完成整个生育期^[36],因此面对气候变暖和极端天气频发的变化,需要重视油菜耐热能力的遗传改良,加大耐高温油菜品种的培育和推广。

参考文献:

- [1] 陈怀亮,张红卫,薛昌颖. 中国极端天气事件与农业气象服务[J]. 气象与环境科学,2010,33(3):67-77.
- [2] 刘玲,沙奕卓,白月明. 中国主要农业气象灾害区域分布与减灾对策[J]. 自然灾害学报,2003,12(2):91-97.
- [3] Salvucci M E, Crafts - Brandner S J. Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis[J]. Physiologia Plantarum,2004,120(2):179-186.
- [4] 殷艳,王汉中,廖星. 2009 年我国油菜产业发展形势分析及对策建议[J]. 中国油料作物学报,2009,31(2):259-262.
- [5] 张树杰,王汉中. 我国油菜生产应对气候变化的对策和措施分析[J]. 中国油料作物学报,2012,34(1):114-122.
- [6] Chakhchar A, Lamaoui M, Aissam S, et al. Differential physiological and antioxidative responses to drought stress and recovery among four contrasting *Argania spinosa* ecotypes[J]. Journal of Plant Interactions,2016,11(1):30-40.
- [7] 赵丽英,王伟,宋玉伟. 土壤水分胁迫下油菜光合特性变化和膜伤害研究[J]. 河南农业科学,2010,39(8):33-35.
- [8] 蒙祖庆,宋丰萍,刘振兴,等. 干旱及复水对油菜苗期光合及叶绿素荧光特性的影响[J]. 中国油料作物学报,2012,34(1):40-47.
- [9] Sharkey T D. Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermos tolerance provided by isoprene [J]. Plant, Cell & Environment, 2005,28(3):269-277.
- [10] 云建英,杨甲定,赵哈林. 干旱和高温对植物光合作用的影响机制研究进展[J]. 西北植物学报,2006,26(3):641-648.
- [11] 王日明,熊兴耀. 高温胁迫对黑麦草生长及生理代谢的影响[J]. 草业学报,2016,25(8):81-90.
- [12] 孙云飞,巢建国,谷巍,等. 高温胁迫对丹参光合生理指标及叶绿素荧光特性的影响[J]. 北方园艺,2016(6):142-147.
- [13] Murchie E H, Lawson T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications [J]. Journal of Experimental Botany, 2013,64(13):3 983-3 998.
- [14] Mishra K B, Iannacone R, Petrozza A, et al. Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission [J]. Plant Science, 2012,182(182):79-86.
- [15] Bresson J, Vasseur F, Dauzat M, et al. Quantifying spatial heterogeneity of chlorophyll fluorescence during plant growth and in response to water stress [J]. Plant Methods,2015,11(1):1-15.
- [16] Jumrani K, Bhatia V S, Pandey G P. Impact of elevated temperatures on specific leaf weight, stomatal density, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in soybean [J]. Photosynthesis Research,2016,131:333-350.
- [17] Jin H, Liu B, Luo L, et al. HYPERSENSITIVE TO HIGH LIGHT1 interacts with LOW QUANTUM YIELD OF PHOTOSYSTEM III and functions in protection of

- photosystem II from photodamage in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*,2014,26(3):1 213 – 1 229.
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*,1976,72(1 – 2):248 – 254.
- [19] Lilley R M C, Walker D A. An improved spectrophotometric assay for ribulosebisphosphate carboxylase [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*,1974,358(1):226 – 229.
- [20] Ku M S B, Agarie S, Nomura M, et al. High – level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants[J]. *Nature Biotechnology*,1999,17(1):76 – 80.
- [21] Kanai R, Edwards G E. Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies[J]. *Plant Physiology*,1973,51(6):1 133 – 1 137.
- [22] Hatch M D, Slack C R. Photosynthetic CO₂ – fixation pathways[J]. *Annual Review of Plant Physiology*,1970,21(1):141 – 162.
- [23] Lawlor D W, Cornic G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants [J]. *Plant, Cell & Environment*,2002,25(2):275 – 294.
- [24] Crafts – Brandner S J, Law R D. Effect of heat stress on the inhibition and recovery of the ribulose – 1,5 – bisphosphate carboxylase/oxygenase activation state [J]. *Planta*,2000,212(1):67 – 74.
- [25] Enami I, Kitamura M, Tomo T, et al. Is the primary cause of thermal inactivation of oxygen evolution in spinach PS II membranes release of the extrinsic 33 kDa protein or of Mn [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*,1994,1 186(1 – 2):52 – 58.
- [26] Bukhov N G, Sabat S C, Mohanty P. Analysis of chlorophyll a fluorescence changes in weak light in heat treated *Amaranthus* chloroplasts [J]. *Photosynthesis Research*,1990,23(1):81 – 87.
- [27] Gunasekera D, Berkowitz G A. Use of transgenic plants with ribulose – 1,5 – bisphosphate carboxylase/oxygenase antisense DNA to evaluate the rate limitation of photosynthesis under water stress [J]. *Plant Physiology*,1993,103(2):629 – 635.
- [28] Tezara W, Mitchell V J, Driscoll S D, et al. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP [J]. *Nature*,1999,401(6 756):914 – 917.
- [29] Singal H R, Sheoran I S, Singh R. Photosynthetic carbon fixation characteristics of fruiting structures of *Brassica campestris* L. [J]. *Plant Physiology*,1987,83:1 043 – 1 047.
- [30] Xu D Q. Progress in photosynthesis research: from molecular mechanisms to green revolution [J]. *Acta Physiologica Sinica*,2001,27(2):97 – 108.
- [31] Christin P A, Osborne C P. The recurrent assembly of C4 photosynthesis, an evolutionary tale [J]. *Photosynthesis Research*,2013,117(1 – 3):163 – 175.
- [32] 鲁松. 干旱胁迫对植物生长及其生理的影响[J]. *江苏林业科技*,2012(4):51 – 54.
- [33] Siopongco J D L C, Yamauchi A, Salekdeh H, et al. Root growth and water extraction response of doubled – haploid rice lines to drought and rewatering during the vegetative stage [J]. *Plant Production Science*,2006,9(2):141 – 151.
- [34] 卜令铎, 张仁和, 韩苗苗, 等. 干旱复水激发玉米叶片补偿效应的生理机制 [J]. *西北农业学报*,2009,18(2):88 – 92.
- [35] 孙宪芝, 郭俊娥, 郑成淑. 菊花的高温伤害及生长恢复研究 [J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*,2013(1):6 – 11.
- [36] 王建. 油菜生长习性 & 直播栽培技术 [J]. *农业与技术*,2015(24):119.

(责任编辑:郭学兰)