

研究报告 Original Papers

转酮醇酶基因沉默对高温胁迫下黄瓜幼苗光合作用的影响

毕焕改, 李福德, 董绪兵, 艾希珍*

山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 农业部黄淮地区园艺作物生物学与种质创制重点开放实验室, 山东泰安271018

摘要: 以2个反义转酮醇酶基因(*CsTK*)黄瓜株系T2'-2和T2'-4以及野生型黄瓜'08-1'为试材, 研究*CsTK*沉默对高温(40°C)下黄瓜幼苗净光合速率(P_n)、核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶(Rubisco)活性及其mRNA表达量和叶绿素荧光参数的影响。结果表明, 与野生型相比, 2个反义株系的转酮醇酶(TK)活性和*CsTK* mRNA的表达量显著降低。高温胁迫2 h后, 黄瓜幼苗叶片的 P_n 、气孔导度(G_s)以及以吸收光能为基础的光化学性能指数(PI_{ABS})、Rubisco活性及其mRNA表达量和光系统(PSII)活性均显著降低, 而*CsTK*的mRNA表达量和TK活性及胞间 CO_2 (C_i)浓度明显升高, 但2个反义株系各指标始终低于野生型植株, 尤其'T2'-4'最低。*CsTK*沉默加剧了高温条件下黄瓜幼苗Rubisco和PSII活性的降低, 从而导致转反义*CsTK*黄瓜幼苗的光合作用降低幅度较大, 对高温耐性下降。

关键词: *CsTK*; 反义植株; 高温; 光合速率; 黄瓜

黄瓜是北方日光温室的主栽设施蔬菜之一, 在栽培过程中经常会遭遇高温(>35°C)、低温和亚适温等非生物胁迫, 导致黄瓜叶片的光合能力明显下降(张丽红等2015; 刘伟等2009; 艾希珍等2004), 黄瓜的生长受到明显抑制, 致使其产量和品质大幅降低。因此, 研究高温下黄瓜的光合特性, 并探明其调控机理对夏季黄瓜的高产优质栽培具有一定的指导意义。

前人研究指出, 黄瓜叶片卡尔文-本森循环的多种光合酶活性和基因表达显著下降是温度胁迫下光合速率下降的主要因素(梁文娟等2008; 毕焕改等2011)。转酮醇酶(transketolase, TK)是一种焦磷酸硫胺素依赖性酶, 在异养生物中作为糖酵解和戊糖磷酸途径的纽带, 为核苷酸、氨基酸和维生素的生物合成提供底物(Kochetov 2001); 在高等植物中参与Calvin循环, 可逆地催化甘油醛-3-磷酸和果糖-6-磷酸反应产生木酮糖-5-磷酸和赤藓糖-4-磷酸, 促进甘油醛-3-磷酸和景天庚酮糖-7-磷酸转变为木酮糖-5-磷酸和核酮糖-5-磷酸(Schenk等1998)。Henkes等(2001)指出, 当TK活性降低20%~40%时, 就会抑制转反义烟草RuBP的再生和光合作用的进行, 该结果证明了TK与光合作用碳固定之间的密切关系, 亦暗示若提高TK活性可能成为增加碳固定、促进植物生长的有效途径(Raines 2011)。

研究发现, TK不仅参与调控高等植物的碳固定, 还可参与高等植物对非生物胁迫的响应, 进而增强其抗逆性。Bernacchia等(1995)的研究中指出,

TK主要通过调节其代谢中间产物磷酸糖的积累量来提高植物的抗旱性。本实验室在前期研究中发现, 短期低温弱光诱导TK基因(*CsTK*)的mRNA表达, 且超表达*CsTK*的黄瓜植株在该逆境下表现出较高的 P_n 和较低的丙二醛(MDA)含量, 低温耐性明显增强; 而反义黄瓜植株表现结果相反(Bi等2013, 2015), 但关于*CsTK*沉默是否会降低黄瓜幼苗的高温耐性, 目前还不清楚。在本实验中, 利用人工气候室进行高温条件的模拟, 以作者前期通过农杆菌介导法获得的转*CsTK*反义黄瓜植株为材料(Bi等2015), 研究野生型和*CsTK*沉默黄瓜幼苗的光合酶活性和PSII反应中心的变化, 旨在探明高温条件下*CsTK*参与黄瓜光合作用的机制, 及其与高温适应性之间的关系。

材料与方法

1 供试材料与培养

试验于2016年在山东农业大学园艺试验站进行。供试黄瓜(*Cucumis sativa* L.)基因型为'08-1'自交系和转反义*CsTK*株系T2'-2和T2'-4, 且反义植株已做相关DNA检测(Bi等2015)。4月10日播种(每个基因型播种50棵), 日光温室内用8 cm×8 cm营养

收稿 2017-03-06 修定 2017-09-22

资助 山东省自然科学基金(BS2015NY011)、国家自然科学基金(31701909)、山东省现代农业产业技术体系建设专项资金(SDAIT-05-10)和“双一流”奖补资金(SYL2017YSTD06)。

* 通讯作者(E-mail: axz@sdau.edu.cn)。

钵土壤育苗。育苗环境为:光量子通量密度(PFD)日均值约 $580 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,昼/夜温度均值约为 $27^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$ 。至黄瓜幼苗长至三叶一心时,选取长势一致的进行处理。预处理2 d,条件设定为昼/夜温度 $25^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$,PPFD $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光暗周期11 h/13 h。胁迫条件为:温度 40°C ,光照强度 $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。处理2 h后取幼苗的上数第3叶,液氮速冻后保存于 -80°C ,用于测定相关酶活性及RNA的提取。每处理设3次重复,取平均值。

2 测定方法

2.1 光合速率

利用Ciras-3型光合仪(美国PP-Systems公司)测定高温胁迫前后各处理黄瓜幼苗上数第3叶的光合速率(P_n)。PFD ($600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)、 CO_2 ($390 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$)浓度和叶温($25\pm 1^\circ\text{C}$)分别由仪器的可调光源、内置式 CO_2 供气系统和温度监控装置控制。

2.2 快速叶绿素荧光诱导曲线测定

利用英国Hansatech公司的Handy-PEA测定高温胁迫前后3种不同基因型黄瓜幼苗的快速叶绿素荧光诱导动力学曲线(OJIP曲线),OJIP曲线由 $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 红光诱导,测定时间为2 s,将幼苗上数第3片完全展开叶用暗适应叶夹暗适应处理30 min后进行相关测定,测得的数据按照Strasser等(2010)的方法将OJIP曲线的O-J段进行标准化处理。其中,O点是最小荧光值,K点是 $300 \mu\text{s}$ 荧光值,J点是2 ms荧光值。各荧光参数意义参照李鹏民等(2005)方法。(1) O-J段标准化: W_t 是将O-J段按照 $W_t=(F_t-F_o)/(F_j-F_o)$ 标准化后的曲线; ΔW_t 是高温处理2 h后与处理0 h的曲线的差值($\Delta W_t=W_{t2h}-W_{t0h}$); (2) PSII最大量子效率 $\phi P_o=F_v/F_m=(F_m-F_o)/F_m$; (3)以吸收光能为基础的性能指数 $PI_{\text{ABS}}=(RC/\text{ABS})\times[\phi P_o/(1-\phi P_o)]\times[\Psi_o/(1-\Psi_o)]$; (4)单位叶面积吸收的光能 ABS/CS_o ; (5)单位叶面积捕获的光能 $TR_o/\text{CS}_o=\phi P_o\times(\text{ABS}/\text{CS}_o)$; (6)单位叶面积的电子传递的量子产额 $ET_o/\text{CS}_o=\phi E_o\times(\text{ABS}/\text{CS}_o)$; (7)单位叶面积有活性的反应中心的数量 $RC/\text{CS}_o=\phi P_o\times(VJ/M_o)\times(\text{ABS}/\text{CS}_o)$ 。

2.3 核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶(Rubisco)和转酮醇酶(TK)

采用酶连续循环比色法定量检测Rubisco活性,具体步骤参照上海杰美基因医药科技有限公司生产的植物核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶羧化

活性测定试剂盒(货号为GMS16015.1)说明书。TK活性测定参照Bi等(2015)的方法。

2.4 Rubisco和TK基因表达

利用购自宝生物工程(大连)生物有限公司的Trizol试剂盒进行RNA提取,参照其相应的说明书进行所有操作。引物是由实验室前期设计,序列如表1。用TaKaRa公司的SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit II试剂盒,BIO-RAD公司的iCycler iQ5实时荧光定量PCR仪检测Rubisco大、小亚基和CsTK的mRNA丰度,检测及计算方法参照试剂盒说明书进行。

表1 实验所用的引物序列

Table 1 Primer sequence used in the experiment

基因	引物名称	引物序列
<i>rbcL</i>	RL1	5' GCTATGGAATCGAGCCTGTTG 3'
	RL2	5' CCAAATACATTACCCACAATGGAAG 3'
<i>rbcS</i>	RS1	5' CGCATTTCATCAGGGTTATTGG 3'
	RS2	5' AAGAGTAGAACTTGGGGCTTGTAGG 3'
TK	TK1	5' ACGATGAGGTCATGAAG 3'
	TK2	5' CCAGCAAGATGAAGCAG 3'
Actin	aF	5' CCACGAAACTACTTACAACCTCCATC 3'
	aR	5' GGGCTGTGATTCCTTGCTC 3'

3 数据统计分析

利用Microsoft Excel软件进行数据处理,取3次重复的平均值,利用SigmaPlot软件作图,用DPS软件对数据进行单因素方差分析,并运Duncan检验法对显著性差异($P<0.05$)进行多重比较。

实验结果

1 高温条件下转反义和野生型黄瓜幼苗CsTK的表达特性

1.1 高温胁迫对转反义和野生型黄瓜叶片CsTK mRNA表达量的影响

从图1看出,在高温胁迫前,转基因株系T2'-4和T2'-2 CsTK的mRNA表达量分别为0.389和0.592,分别较野生型植株(WT)降低了61.1%和40.8%。高温胁迫后,T2'-4、T2'-2和WT的CsTK的mRNA表达量均显著上升,三者分别比胁迫前增加了2.2倍、3.1倍和4.8倍,T2'-4和T2'-2的CsTK的mRNA表达量的上升幅度明显低于WT,该结果说明短期高温可以诱导CsTK的mRNA表达,但抑制CsTK表达时,该诱导效应下降。

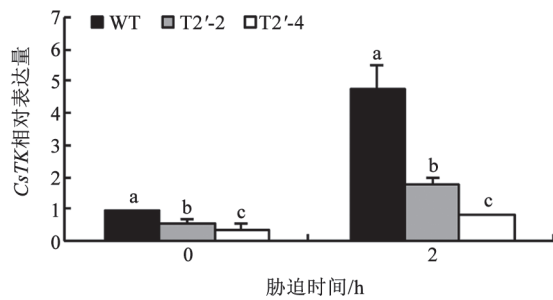


图1 高温胁迫对转反义和野生型黄瓜幼苗 *CsTK*表达量的影响

Fig.1 Effect of high temperature on *CsTK* mRNA abundance of antisense transgenic and wild type cucumber seedlings

图中数据为3次重复平均值,不同小写字母表示差异达显著水平($P<0.05$)。下图同此。

1.2 高温胁迫对转反义和野生型黄瓜叶片TK活性的影响

结果(图2)显示, T2'-4和T2'-2 TK活性均显著低于WT。高温胁迫前, T2'-4和T2'-2 TK活性分别较WT降低了23.0%和11.6%;而高温胁迫2 h后, T2'-4、T2'-2和WT的TK活性分别比胁迫前升高了19.2%、31.7%和52.8%,其中T2'-4的TK活性升高幅度最小,这与其对应的*CsTK*的mRNA相对表达量的变化趋势一致,即*CsTK*的mRNA相对表达量越低,TK活性就越小,在短期高温条件下的上升幅度亦越小。

2 高温对转*CsTK*反义和野生型黄瓜幼苗Rubisco mRNA表达和活性的影响

2.1 高温胁迫对转反义和野生型黄瓜幼苗Rubisco大、小亚基mRNA表达的影响

从图3看出,高温胁迫前,转反义植株T2'-4和

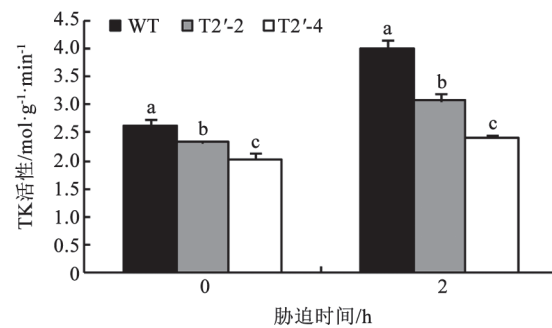


图2 高温胁迫对转反义和野生型黄瓜幼苗TK活性的影响
Fig.2 Effect of high temperature on TK activities of antisense transgenic and wild type cucumber seedlings

T2'-2的Rubisco大亚基(Rubisco large subunit, *rbcL*) mRNA表达量显著低于WT (图3-A),而Rubisco小亚基(Rubisco small subunit, *rbcS*) mRNA表达量与WT无差异(图3-B)。高温胁迫后, T2'-4、T2'-2和WT植株的*rbcL*和*rbcS* mRNA均显著下降,但*CsTK*表达量降低的转反义植株T2'-4和T2'-2的*rbcL*和*rbcS* mRNA的下降幅度均大于WT。至高温胁迫2 h时, T2'-4的*rbcL*和*rbcS* mRNA分别较胁迫前下降了56.1%和60.0%, T2'-2的*rbcL*和*rbcS* mRNA表达量分别较胁迫前下降了44.5%和43.7%,而WT的*rbcL*和*rbcS* mRNA表达量分别较胁迫前下降了24.5%和26.5%。

2.2 高温胁迫对转反义和野生型黄瓜幼苗Rubisco活性的影响

从图4看出,高温胁迫前, T2'-4和T2'-2反义株系的Rubisco活性低于WT;高温胁迫2 h后, Rubisco活性均显著下降,且2个转反义株系的Rubisco活性

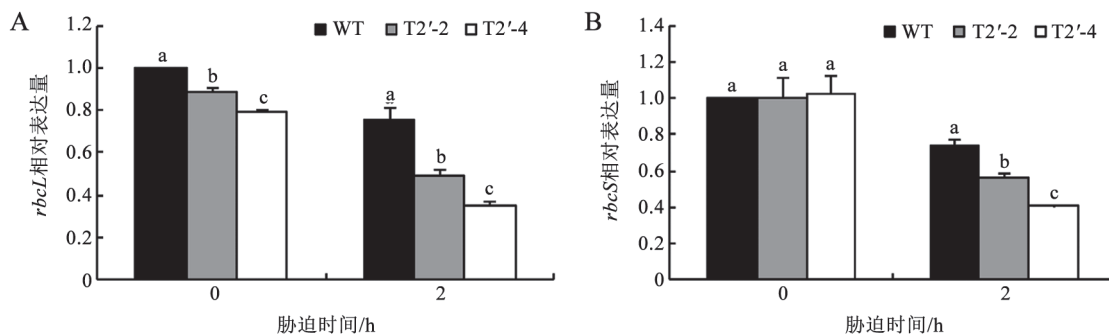


图3 高温胁迫对转反义和野生型黄瓜幼苗*rbcL* (A)和*rbcS* (B)基因表达量的影响
Fig.3 Effect of high temperature on *rbcL* (A) and *rbcS* (B) mRNA abundance of antisense transgenic and wild type cucumber seedlings

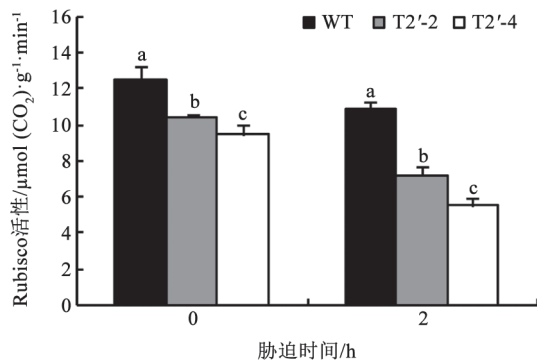


图4 高温胁迫对转反义和野生型黄瓜幼苗 Rubisco活性的影响

Fig.4 Effect of high temperature on Rubisco activities of antisense transgenic and wild type cucumber seedlings

显著低于WT。与胁迫前相比, WT、T2'-4和T2'-2的 Rubisco活性分别下降了13.1%、41.1%和31.1%, 即TK活性降低越多, 相对应的Rubisco的活性下降的越明显。

3 高温对转反义和野生型黄瓜幼苗光合参数的影响

图5-A表明, 高温胁迫前, *CsTK*沉默的2个反义黄瓜株系的光合速率均显著低于野生型植株; 高温胁迫2 h后, T2'-4、T2'-2和WT的 P_n 分别比胁迫前降低了67.9%、64.2%和35.1%, 2个反义株系 P_n 的下降程度明显高于野生型植株。同时, 气孔导度(G_s)下降(图5-B), 胞间 CO_2 浓度(C_i)值却显著上升(图5-C)。这说明植株叶片 P_n 的下降是由非气孔因素引起的, 且*CsTK*沉默加剧了高温下转基因植株光合作用的降低。

4 高温胁迫对转反义和野生型黄瓜幼苗光系统(PSII)综合活性的影响

图6显示, 高温胁迫前, T2'-4和T2'-2反义株系的 PI_{ABS} 和 F_v/F_m 均与野生型无差异, 这说明在非胁迫条件下, 两个反义株系和野生型植株的PSII综合性能是无差异的。高温胁迫2 h后, F_v/F_m 均未发生明显变化, 但 PI_{ABS} 均出现明显下降, 且T2'-4和T2'-2的下降幅度明显大于WT, 三者分别下降了54.5%、37.8%和13.0%, 这说明降低*CsTK*基因表达可加剧高温对PSII活性的伤害。

5 高温胁迫对转反义和野生型黄瓜幼苗光系统II(PSII)供体侧的影响

K点是PSII供体测光抑制的特异性标志, 由图

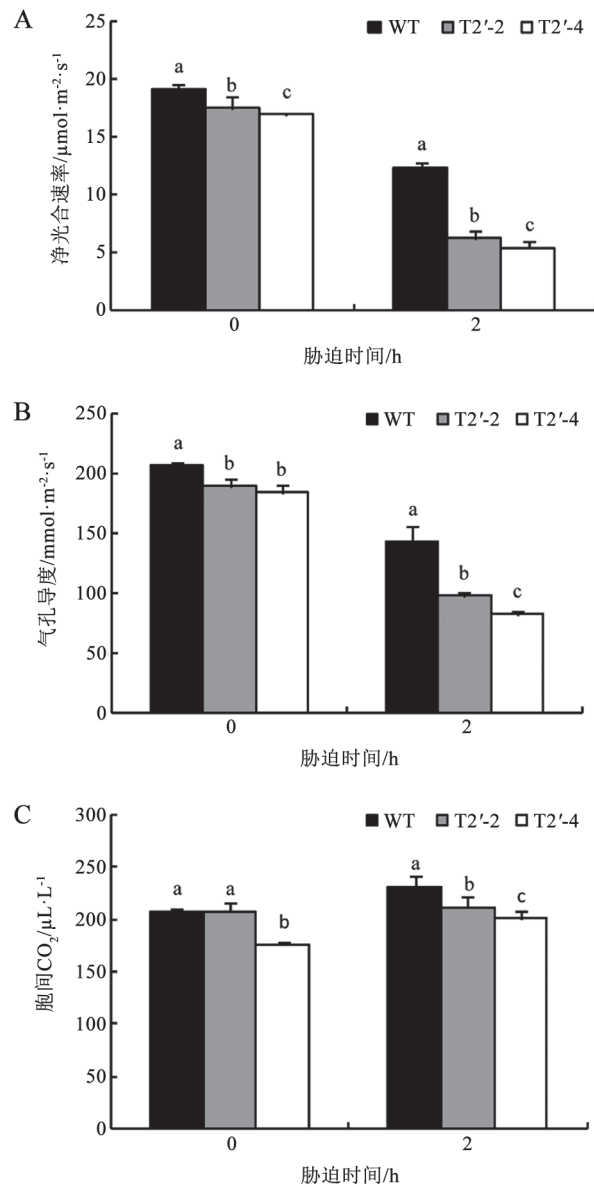
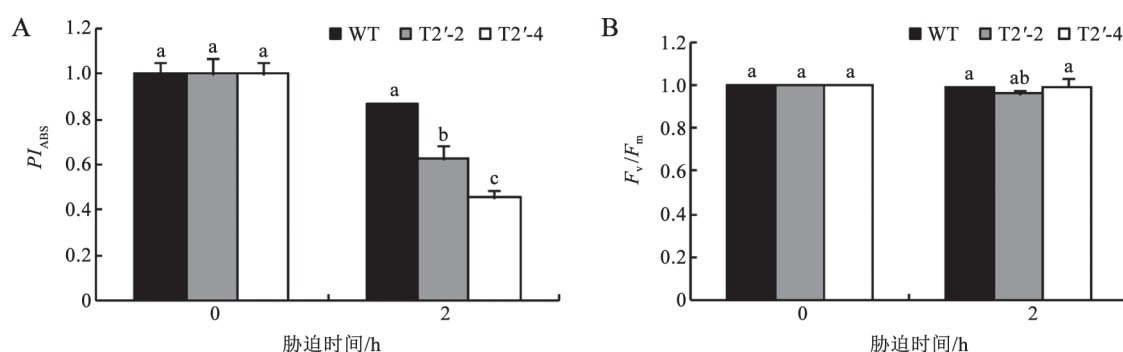
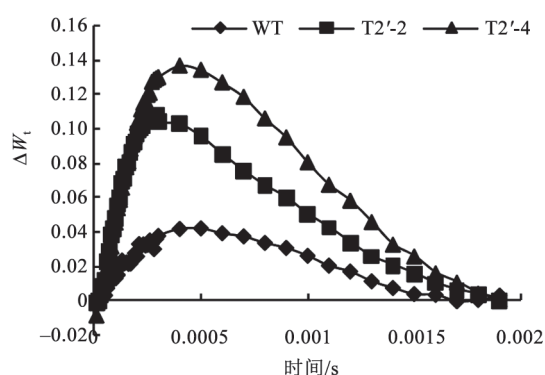


图5 高温胁迫对转反义和野生型黄瓜幼苗净光合速率 (P_n)、气孔导度(G_s)和胞间 CO_2 浓度(C_i)的影响

Fig.5 Effect of high temperature on net photosynthetic rate (P_n), stomatal conductance (G_s), intercellular CO_2 concentration (C_i) of antisense transgenic and wild type cucumber seedlings

7可知, 短期高温即可导致黄瓜幼苗K点的增加, 其中野生型植株的K点上升幅度最小, 其次为T2'-2, T2'-4的上升幅度最高。说明抑制*CsTK*表达的转反义植株在高温胁迫下放氧复合体的受伤害程度明显增加, 且反义植株中*CsTK* mRNA表达量越低, K点的上升幅度就越高。

图6 高温胁迫对转反义和野生型黄瓜幼苗 PI_{ABS} (A)和 F_v/F_m (B)的影响Fig.6 Effect of high temperature on PI_{ABS} (A) and F_v/F_m (B) in antisense transgenic and wild type cucumber seedlings图7 高温处理对转反义和野生型黄瓜幼苗快速叶绿素荧光诱导动力学曲线 ΔW_i 的影响Fig.7 Effect of high temperature on the ΔW_i in antisense transgenic and wild type cucumber seedlings

6 高温胁迫对转反义和野生型黄瓜幼苗电子传递活性的影响

图8表明, 高温胁迫前, 黄瓜幼苗的电子传递正常进行, 但高温胁迫2 h后, 黄瓜幼苗叶片的 ABS/CS_0 、 TR_0/CS_0 、 ET_0/CS_0 和 RC/CS_0 均出现下降, 且2个反义株系各指标的下降程度高于WT。T2'-4的 ABS/CS_0 、 TR_0/CS_0 、 ET_0/CS_0 和 RC/CS_0 较WT植株的低5%、7%、13.7%和10.1%, T2'-2的 ABS/CS_0 、 TR_0/CS_0 、 ET_0/CS_0 和 RC/CS_0 较WT植株的低6.3%、7.3%、9.8%和7.9%。可见, 高温胁迫会导致单位叶面积反应中心数量的下降, 并降低反应中心色素复合体对光能的吸收、捕获和电子传递的效率。 $CsTK$ 沉默加剧了高温胁迫对黄瓜幼苗反应中心色素复合体的伤害。这可能是转反义植株对温光逆境适应性降低的机制之一。

讨论

黄瓜是一种对温度很敏感的设施蔬菜, 在夏季黄瓜高产栽培过程中, 经常遭受 35°C 及以上的高温胁迫(郝婷等2014), 抑制了叶绿素的合成, 光合碳同化能力下降, 产量和品质显著下降。本实验中, 高温2 h后不同基因型黄瓜幼苗的 P_n 明显降低, 且 P_n 下降的同时伴随着 G_s 的降低和 C_i 的升高(图3), 说明短期高温胁迫下的 P_n 下降主要是由非气孔因素引起的, 该结果与张洁和李天来(2005)的研究一致, 而2个转反义株系 P_n 的下降程度显著高于野生型植株。温度胁迫下光合碳同化能力的降低是光合作用下降的主要原因, 尤其是Rubisco作为碳同化的关键酶, 在维持逆境下光合作用的正常运转中起到很重要的作用(Flexas等2006)。毕焕改等(2011)研究表明, 亚适温弱光下黄瓜 P_n 降低的主要原因是光合酶基因表达量和酶活性的下降。马博等(2013)发现, 温室嫁接黄瓜在高温下的净光合速率明显低于对照, 究其原因是高温逆境抑制了其Rubisco活性。本试验中, 高温胁迫前, 抑制 $CsTK$ 表达不仅降低了T2'-4和T2'-2的TK活性, 还引起Rubisco活性下降, 导致 P_n 较低, 加之, G_s 和 C_i 值同时下降, 说明高温胁迫前转反义黄瓜幼苗 P_n 的降低是气孔因素和非气孔因素综合作用的结果。Bi等(2013)研究发现, 短期低温胁迫会诱导 $CsTK$ 表达量上升, 缓解低温下光合作用的下降, 在本文胁迫条件下, 同样发现 $CsTK$ 表达量在高温胁迫2 h后显著上升, TK活性亦显著增加, 表明 $CsTK$ 除响应低温外, 还可被高温诱导, 但 $CsTK$ 沉默会降低这种诱导

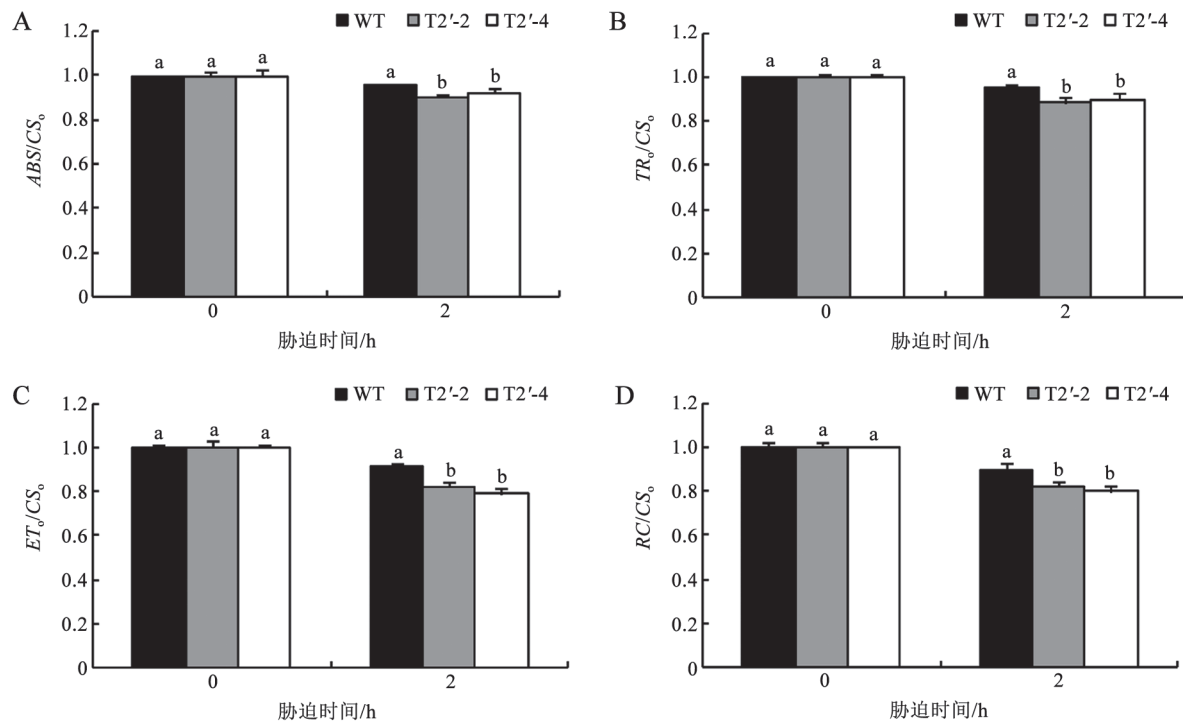


图8 高温胁迫对转反义和野生型黄瓜幼苗 ABS/CS_0 (A)、 TR_0/CS_0 (B)、 ET_0/CS_0 (C)和 RC/CS_0 (D)的影响
Fig.8 Effect of high temperature on ABS/CS_0 (A), TR_0/CS_0 (B), ET_0/CS_0 (C) and RC/CS_0 (D) in antisense transgenic and wild type cucumber seedlings

效应。孙建磊等(2017)研究指出,弱光胁迫下 $rbcL$ 和 $rbcS$ 的mRNA表达受到抑制,导致Rubisco活性下降,引起黄瓜光合功能降低。本文中高温胁迫前,2个反义植株的 $rbcL$ 的转录水平和Rubisco活性相一致,均低于野生型植株, P_n 较低;高温胁迫2 h后不仅 $rbcL$ 表达量下降, $rbcS$ 表达量也显著降低,这可能是因为 $rbcL$ 的转录水平会影响 $rbcS$ 蛋白的合成引起的(Wostrikoff和Stern 2007),且2个反义植株中的降低幅度大于野生型。这说明 $CsTK$ 沉默不仅降低了高温对TK活性的诱导效应,还加剧了 $rbcL$ 和 $rbcS$ 转录水平的下降,Rubisco活性较低,最终导致转反义黄瓜幼苗的 P_n 显著低于野生型。

前人研究发现,高温条件下,天线系统、放氧复合体(OEC)和PSII反应中心均会受到不同程度的影响,其中PSII最易受到影响,是高温逆境的首要伤害位点(Havaux 1996)。研究发现, PI_{ABS} 和 F_v/F_m 均可反映非生物逆境胁迫对光合机构的影响,且 PI_{ABS} 的灵敏度要高于 F_v/F_m (Christoph和Heinrich 2004; Appenroth等2001)。本实验结果也证明了这一点,高温胁迫2 h后各处理的 PI_{ABS} 均显著下降,但

F_v/F_m 并没有发生明显的变化。这与前人研究结果一致,且高温胁迫2 h时,T2'-2和T2'-4的 PI_{ABS} 显著低于WT,说明高温逆境对反义植株PSII活性的伤害程度大于野生型植株。OJIP曲线中K点的出现常被用作反映PSII的供体侧即放氧复合体(OEC)的伤害程度(Srivastava等1997; Chen等2004)。金立桥等(2015)研究表明,当供体侧和受体侧同时受到伤害时,如果PSII供体侧受伤害程度大于受体侧时,K点升高,反之,则K点变化不明显。本文中,高温胁迫2 h导致各处理K点的明显上升,同时,反映受体侧的 ET_0/CS_0 显著下降,说明短期高温处理导致PSII供体侧和受体侧同时受到伤害且供体侧的受伤害程度大于受体侧。这与金立桥等(2015)研究结果一致。胁迫结束后 RC/CS_0 、 ABS/CS_0 和 TR_0/CS_0 均有所下降,说明PSII反应中心活性亦受到抑制。文中TK活性降低的转反义植株的K点升高程度以及 ET_0/CS_0 、 RC/CS_0 、 ABS/CS_0 和 TR_0/CS_0 的下降程度均高于野生型,说明抑制 $CsTK$ 表达后加剧了高温对PSII反应中心的伤害,电子传递效率明显下降。

本研究发现,抑制 $CsTK$ 表达不仅降低了正常

环境条件下植株的光合碳同化能力, 还加剧了短期高温下Rubisco大小亚基基因表达的下降, Rubisco活性显著降低, 同时, 植株PSII供体侧、反应中心和受体侧的伤害较大, 使得转基因植株的光合作用降低, 高温耐性下降。

参考文献

- Ai XZ, Ma XZ, Yu LM, Xing YX (2004). Effect of long-term suboptimal temperature and short-term low temperature under low light density on cucumber growth and its photosynthesis. *Chinese J Appl Ecol*, 15 (11): 2091–2094 (in Chinese with English abstract) [艾希珍, 马兴庄, 于立明, 刑禹贤(2004). 弱光下长期亚适温和短期低温对黄瓜生长及光合作用的影响. *应用生态学报*, 15 (11): 2091–2094]
- Appenroth KJ, Stöckel J, Srivastav A, Strasser RJ (2001). Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. *Environ Pollut*, 115: 49–64
- Bernacchia G, Schwall G, Lottspeich F, Salamini F, Bartels (1995). The transketolase gene family of the resurrection plant *Craetostigma plantagineum*: differential expression during the rehydration phase. *EMBO J*, 14: 610–618
- Bi HG, Dong XB, Wu GX, Wang ML, Ai XZ (2015). Decreased TK activity alters growth and tolerance to low temperature and low light intensity in transgenic cucumber plants. *Plant Cell Rep*, 34: 345–354
- Bi HG, Wang ML, Dong XB, Ai XZ (2013). Cloning and expression analysis of transketolase gene in *Cucumis sativus* L.. *Plant Physiol Bioch*, 70: 512–521
- Bi HG, Wang ML, Jiang ZS, Dong XB, Ai XZ (2011). Effect of suboptimal temperature and low light intensity on photosynthetic enzymes activities and gene expression in cucumber seedlings. *Chinese J Appl Ecol*, 22 (11): 2894–2900 (in Chinese with English abstract) [毕焕改, 王美玲, 姜振生, 董绪兵, 艾希珍(2011). 亚适温弱光对黄瓜幼苗光合酶活性和基因表达的影响. *应用生态学报*, 22 (11): 2894–2900]
- Chen HX, Li WJ, An SZ, Gao HY (2004). Characterization of PSII photochemistry and thermostability in salt-treated *Rumex* leaves. *Plant Physiol J*, 161: 257–264
- Christoph G, Heinrich KG (1991). A simple model relating photoinhibitory fluorescence quenching in chloroplasts to a population of altered Photosystem II reaction centers. *Photosynth Res*, (30): 115–121
- Flexas J, Bota J, Galmés J, Medrano H, Ribas-Carbo M (2006). Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiol Plant*, 127: 343–352
- Hao T, Ding XT, Jin HJ, Zhang HM, Yu JZ, Zhu YL (2014). Effects of high temperature on cucumber growth and countermeasures in protected culture. *Shanghai Acta Agric*, 30 (2): 125–131 (in Chinese with English abstract) [郝婷, 丁小涛, 金海军, 张红梅, 余纪柱, 朱月林(2014). 高温对黄瓜生长的影响及设施栽培对策. *上海农业学报*, 30 (2): 125–131]
- Havaux M (1996). Short-term responses of Photosystem I to heat stress. *Photosynth Res*, 47: 85–97
- Henkes S, Sonnewald U, Badur R, Flachmann R, Stitt M (2001). A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 13 (3): 535–551
- Jin LQ, Che XK, Zhang ZS, Gao HY (2015). The relationship between the changes in W_k and different damage degree of PSII donor side and acceptor side under high temperature with high light in cucumber. *Plant Physiol J*, 51 (6): 969–976 (in Chinese with English abstract) [金立桥, 车兴凯, 张子山, 高辉远(2015). 高温、强光下黄瓜叶片PSII供体侧和受体侧的伤害程度与快速荧光参数 W_k 变化的关系. *植物生理学报*, 51 (6): 969–976]
- Kochetov GA (2001). Functional flexibility of the transketolase molecule. *Bioch*, 66: 1077–1085
- Li BM, Gao HY, Strasser RJ (2005). Application of the chlorophyll fluorescence induction dynamics in photosynthesis study. *Plant Physiol Mol Biol J*, 31 (6): 559–566 (in Chinese with English abstract) [李鹏民, 高辉远, Strasser RJ (2005). 快速叶绿素荧光诱导动力学分析在光合作用研究中的应用. *植物生理学与分子生物学学报*, 31 (6): 559–566]
- Liang WJ, Wang ML, Ai XZ, Sun XQ, Wang HT (2008). Photosynthesis adaptation of cucumber seedlings to suboptimal temperature and low light intensity stress. *Transact Chin Soc Agric Eng*, 24 (8): 240–244 (in Chinese with English abstract) [梁文娟, 王美玲, 艾希珍, 孙晓琦, 王洪涛(2008). 黄瓜幼苗光合作用对亚适温弱光胁迫的适应性. *农业工程学报*, 24 (8): 240–244]
- Liu W, Ai XZ, Liang WJ, Wang HT, Liu SX, Zheng N (2009). Effects of salicylic acid on the leaf photosynthesis and antioxidant enzyme activities of cucumber seedlings under low temperature and light intensity. *Chin J Appl Ecol*, 20 (2): 441–445 (in Chinese with English abstract) [刘伟, 艾希珍, 梁文娟, 王洪涛, 刘升学, 郑楠(2009). 低温弱光下水杨酸对黄瓜幼苗光合作用及抗氧化酶活性的影响. *应用生态学报*, 20 (2): 441–445]
- Ma B, Cui SM, Zhang ZW, Liu JC, Ren J, Xia YH (2013). Effect of high temperature and elevated CO₂ on morphological features, net photosynthetic rate and RubpCase activity of grafted cucumber in greenhouse. *Inner Mongolia Agric Univ J*, 34 (3): 32–39 (in Chinese with English abstract) [马博, 崔世茂, 张之为, 刘杰才, 任杰, 夏永恒(2013). 高温、CO₂加富对温室嫁接黄瓜形态特征、净光合速率和Rubisco羧化酶活性的影响. *内蒙古农业大学学报*, 34 (3): 32–39]
- Raines CA (2011). Increasing photosynthetic carbon assimilation in C3 plants to improve crop yield: current and future strategies. *Plant Physiol*, 155: 36–42
- Schenk G, Duggleby RG, Nixon PF (1998). Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *Int J Biochem Cell Biol*, 30: 1297–1318
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Qiang S, Goltsev V (2010). Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochim Biophys Acta*, 1797: 1313–1326

- Srivastava A, Guisse B, Greppin H, Strasser RJ (1997). Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP. *Biochim Biophys Acta*, 1320: 95–106
- Sun JL, Wang CQ, Xiao SH, Gao C, Li LB, Cao QW, Wang X, Dong YM, Jiao ZG (2017). Effect of low light on photosynthesis and Rubisco of cucumber seedlings. *Nuclear Agric Sci*, 31 (6): 1200–1209 (in Chinese with English abstract) [孙建磊, 王崇启, 肖守华, 高超, 李利斌, 曹齐卫, 王晓, 董玉梅, 焦自高(2017). 弱光对黄瓜幼苗光合特性及Rubisco酶的影响. *核农学报*, 31 (6): 1200–1209]
- Wostrikoff K, Stern DB (2007). Rubisco large-subunit translation is autoregulated in response to its assembly state in tobacco chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (15): 6466–6471
- Zhang J, Li TL (2005). Effects of daytime sub-high temperature on photosynthesis and chloroplast ultrastructure of tomato leaves in greenhouse. *Acta Horti Sin*, 32 (4): 614–619 (in Chinese with English abstract) [张洁, 李天来(2005). 日光温室亚高温对番茄光合作用及叶绿体超微结构的影响. *园艺学报*, 32 (4): 614–619]
- Zhang LH, Song Y, Zhang ZW, Sun SJ, Pan L, Tan ZM, Cui SM (2015). Effects of the starch accumulation on photosynthesis of cucumber leaves under long term elevated CO₂ condition. *Acta Horti Sin*, 42 (7): 1321–1328 (in Chinese with English abstract) [张丽红, 宋阳, 张之为, 孙世军, 潘璐, 谭占明, 崔世茂(2015). 长期增施CO₂条件下黄瓜叶片淀粉积累对光合作用的影响. *园艺学报*, 42 (7): 1321–1328]

Effects of transketolase gene silencing on photosynthesis in cucumber seedlings under high temperature stress

BI Huan-Gai, LI Fu-De, DONG Xu-Bing, AI Xi-Zhen*

College of Horticulture Science and Engineering, State Key Laboratory of Crop Biology, Key Laboratory of Horticultural Crop Biology and Germplasm Innovation of Agriculture Ministry, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China

Abstract: The two anti-sense transketolase gene (*CsTK*) transgenic lines T2'-2 and T2'-4 as well as the wild type (WT) '08-1' cucumber seedlings were used as test materials to study the effect of *CsTK* silence on net photosynthetic rate (P_n), the mRNA abundance and activity of ribulose biphosphate carboxylic enzyme (Rubisco) as well as the chlorophyll fluorescence parameters of cucumber (*Cucumis sativa*) seedlings under high temperature (40°C) stress. The results showed that the mRNA abundance of *CsTK* and TK (transketolase) activity were significantly lower in *CsTK* suppress-expressing cucumber seedlings than those in WT. Following 2-h exposure to high temperature, we assayed a lower P_n , stomatal conductance (G_s), photochemical performance index based on the absorption of light energy (PI_{ABS}), the mRNA abundance and activity of Rubisco as well as the activity of photosystem (PSII), while a higher *CsTK* mRNA abundance and TK activity and intercellular CO₂ concentration (C_i) in both antisense and WT plants. However, these parameters of the two anti-sense transgenic lines were always lower compared to the WT, especially, the parameters of T2'-4 was the lowest. In general, the data suggested that *CsTK* silence exacerbated the reduction of the activity of Rubisco and PSII which led to the decrease of photosynthesis and high temperature tolerance in anti-sense *CsTK* transgenic cucumber seedlings.

Key words: *CsTK*; antisense transgenic plant; high temperature; photosynthetic rate; *Cucumis sativa*

Received 2017-03-06 Accepted 2017-09-22

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (Grant No. BS2015NY011), National Natural Science Foundation (Grant No. 31701909), the Modern Agricultural Industry Technology System in Shandong Province (Grant No. SDAIT-05-10) and Funds of Shandong "Double Tops" Program (Grant No. SYL2017YSTD06).

*Corresponding author (E-mail: axz@sdau.edu.cn).