

缺锌胁迫对‘天红2号/冀砧2号’苹果幼树生长、 光合特性和内源激素含量的影响

孙明飞, 朱杰, 李潞, 高美娜, 梁博文, 周莎莎, 徐继忠, 李中勇*

(河北农业大学园艺学院, 河北保定 071000)

摘要:【目的】研究‘天红2号/冀砧2号’幼树生长、光合特性及内源激素变化对缺锌胁迫的响应。【方法】以1年生‘天红2号/冀砧2号’砧穗组合苹果幼苗为试材, 采用营养液浇灌方式进行盆栽试验。营养液设置供锌浓度分别为0 $\mu\text{mol/L}$ (Zn0)、2 $\mu\text{mol/L}$ (Zn2)、4 $\mu\text{mol/L}$ (Zn4, 对照), 共3个处理。处理后40天, 测量幼树株高、叶面积, 取样测定叶片锌含量、光合特性、叶绿素含量、叶绿素荧光参数、内源激素含量等指标, 并分析叶绿素合成关键酶基因 *MdHEMA1*、叶绿素降解关键酶基因 *MdPAO*、生长素合成基因 *MdYUCCA4a* 和 *MdYUCCA6a* 相对表达量。【结果】‘天红2号/冀砧2号’幼树的株高、叶面积及叶片锌含量随供锌浓度的下降而显著降低; 供锌浓度越低, 生长素合成基因 *MdYUCCA4a* 和 *MdYUCCA6a* 相对表达量越低, 植株体内 IAA 和 GA_3 水平越低; 与对照 (Zn4) 相比, 净光合速率 (Pn)、蒸腾速率 (Tr)、气孔导度 (Gs) 在缺锌条件下显著降低, 胞间 CO_2 浓度 (Ci) 升高; 缺锌胁迫下, 叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素含量下降, 叶绿素 a/b 值上升, 叶绿素合成关键酶基因 *MdHEMA1* 和叶绿素降解关键酶基因 *MdPAO* 均显著升高; ‘天红2号/冀砧2号’幼树叶片的叶绿素荧光参数 Fv/Fm、 $\Phi\text{PS II}$ 、qP 及 ETR 值在缺锌胁迫下显著下降, Fo 和 NPQ 显著上升。【结论】缺锌胁迫使生长素合成基因 *MdYUCCA4a* 和 *MdYUCCA6a* 表达量显著降低, IAA 合成受阻, 导致 IAA 和 GA_3 水平降低, 抑制幼树生长。PS II 反应中心和 PS II 氧化传递链在缺锌胁迫下受到一定损伤, 造成 PS II 活性下降, 并加剧叶绿素降解, 导致光合作用降低; 同时, 叶绿素降解基因 *MdPAO* 的高表达引起树体产生反馈调节机制来进行自我保护, 诱导叶绿素合成代谢途径中的关键酶基因 *MdHEMA1* 表达量升高, 但所合成的叶绿素依然不能补偿由缺锌所造成的叶绿素降解损失。

关键词: 缺锌胁迫; 苹果幼树; 光合特性; 荧光特性; 内源激素

Effects of zinc deficiency on growth, photosynthetic characteristics, and endogenous hormone content of apple sapling ‘Tianhong 2/Jizhen 2’

SUN Ming-fei, ZHU Jie, LI Lu, GAO Mei-na, LIANG Bo-wen, ZHOU Sha-sha, XU Ji-zhong, LI Zhong-yong*
(College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: 【Objectives】The study investigates the growth response, photosynthetic characteristics, and changes in endogenous hormones in young ‘Tianhong 2 / Jizhen 2’ trees due to zinc deficiency. 【Methods】One-year-old ‘Tianhong 2 / Jizhen 2’ rootstock-spike combined apple saplings were used as experimental materials. Three zinc concentrations were set up in nutrient solution: 0 $\mu\text{mol/L}$ (Zn0), 2 $\mu\text{mol/L}$ (Zn2), and 4 $\mu\text{mol/L}$ (Zn4, control). We measured the plant height and leaf area of young trees and determined zinc content, photosynthetic characteristics, chlorophyll content, chlorophyll fluorescence parameters and endogenous hormone in leaves at 40 days after treatment. We studied the relative expression levels of the enzyme encoding gene *MdHEMA1*, chlorophyll degradation key enzyme encoding gene *MdPAO*, and auxin synthesis genes *MdYUCCA4a* and *MdYUCCA6a*. 【Results】The plant height, leaf area, and leaf zinc content of ‘Tianhong 2/Jizhen 2’ saplings ($P < 0.05$) decreased with decreasing zinc concentration. The lower the zinc concentration, the lower the relative expression

收稿日期: 2022-07-15 接受日期: 2022-10-21

基金项目: 财政部和农业农村部—国家现代农业产业技术体系 (CARS-27); 河北省重点研发计划项目 (20326802D)。

联系方式: 孙明飞 E-mail: 414400795@qq.com; *通信作者 李中勇 E-mail: yylzy2014@163.com

of auxin synthesis genes *MdYUCCA4a* and *MdYUCCA6a* and IAA and GA₃ levels in plants. Compared with the control, net photosynthetic rate (Pn), transpiration rate (Tr), and stomatal conductance (Gs) ($P < 0.05$) decreased, while intercellular CO₂ concentration (Ci) increased under zinc deficiency. Under zinc stress, chlorophyll a, b, and total chlorophyll content decreased, and the chlorophyll a/b ratio increased. Chlorophyll synthesis enzyme encoding gene *MdHEMA1* and chlorophyll degradation enzyme encoding gene *MdPAO* ($P < 0.05$) increased. The chlorophyll fluorescence parameters Fv/Fm, $\Phi PS II$, qP and ETR of ‘Tianhong 2/Jizhen 2’ seedlings ($P < 0.05$) decreased under zinc deficiency, while Fo and NPQ increased. 【Conclusions】 The expression of auxin synthesis genes *MdYUCCA4a* and *MdYUCCA6a* decreased under zinc deficiency, and IAA synthesis was blocked. This decreased IAA and GA₃ levels, inhibiting the young tree growth. The PS II reaction center and PS II oxidation transfer chain were damaged to some extent under zinc deficiency, resulting in decreased PS II activity, chlorophyll degradation, and decreased photosynthesis. Simultaneously, the high expression of the chlorophyll degradation gene *MdPAO* caused the tree to produce a feedback regulation mechanism to protect itself. It induced the expression of the key enzyme gene *MdHEMA1* in the chlorophyll synthesis metabolism pathway. However, the synthesized chlorophyll did not compensate for the loss of chlorophyll degradation caused by zinc deficiency.

Key words: zinc deficiency stress; apple sapling; photosynthesis characteristic; fluorescence characteristic; endogenous hormone

锌是植物生长所必需的微量元素, 参与植物体内光合作用、碳水化合物的代谢、蛋白质合成、调节生长素的代谢等过程^[1-2], 被认为是继氮之后最容易缺乏的矿质元素^[3]。苹果对缺锌比较敏感^[4], 树体缺锌易发生小叶病。当前, 苹果缺锌已成为许多苹果产区苹果产量和品质提高的重要限制因子之一^[5]。

锌对植物光合作用的正常进行和维持叶绿体的结构及功能具有重要作用^[6-7]。缺锌可导致大田苹果树在盛果期光合速率下降, 叶片的光能吸收利用效率降低^[8]。另外, 缺锌还会引起玉米叶绿素含量下降, 叶绿体数量减少^[9]。关于缺锌对苹果叶片叶绿素含量变化影响的分子机理研究较少。*HEMA1* 是调控叶绿素合成途径的关键酶基因, 在叶绿素合成过程中具有重要作用^[10]。叶绿素降解途径包括氧化降解和酶降解, 酶降解途径目前比较认可的是 PAO 途径, 脱镁叶绿素 a 加氧酶 (pheophorbide a oxygenase, PAO) 是叶绿素降解代谢的关键酶。

缺锌会使植物体内生长素含量下降^[11]。有研究发现, 锌是色氨酸的重要组成成分, 而色氨酸是 IAA 合成的重要前体物质, 因此认为缺锌导致 IAA 含量降低是因为抑制了其前体物质色氨酸的合成^[12]。但也有报道称, 色氨酸含量不是限制 IAA 合成的关键因子, 缺锌可能是减弱了植物由色氨酸向 IAA 的转化或增强了 IAA 的降解^[11]。*YUCCA* 基因编码黄素单加氧酶, 在生长素生物合成的吲哚丙酮酸途径中发挥重要作用, 是生长素合成的关键限速酶^[13]。其是否响应苹果缺锌胁迫下 IAA 的生物合成

尚无报道。

不同苹果砧木对缺锌及高锌胁迫的耐性不同^[14]。前人研究表明, 不同砧木上嫁接红富士品种会影响根系对锌的吸收, SH40 作中间砧时根系中锌含量较低^[15]。‘冀砧 2 号’是从 SH40 的实生后代中选出的苹果矮化砧木新品种, 具有矮化性状明显, 嫁接亲和性好, 接穗早花早果、丰产性强等优点^[16]。‘冀砧 2 号’作砧木是否表现缺锌以及其对缺锌胁迫下的响应研究尚无报道。因此, 本研究以‘冀砧 2 号’自根砧上嫁接‘天红 2 号’红富士苹果为试材, 探讨缺锌胁迫对‘天红 2 号/冀砧 2 号’苹果幼树生长、光合特性及激素变化的影响, 比较分析生长素合成关键酶基因 *MdYUCCA4a*、*MdYUCCA6a* 以及叶绿素合成、降解关键基因 *MdHEMA1* 和 *MdPAO* 在缺锌和健康叶片之间的相对表达差异, 以期阐明缺锌导致苹果光合和激素代谢变化的生理生化机制提供理论依据, 并为‘冀砧 2 号’自根砧的优质高效利用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于 2021 年在河北农业大学西校区创新试验园进行。试验材料为 1 年生盆栽‘天红 2 号/冀砧 2 号’砧穗组合。2021 年 3 月, 将‘冀砧 2 号’自根砧苗栽植于装有沙子的塑料花盆 (口径 30 cm, 底径 20 cm, 盆高 22 cm) 中, 栽植后一周采用单芽腹接嫁

接‘天红2号’。嫁接后每15天浇一次1/2 Hoagland 营养液,保证幼树生长。处理前1个月停止浇营养液,每隔2天进行去离子水冲洗,以消除砂培中残存的矿质营养成分。

2021年8月1日开始处理。除 Zn^{2+} 以外,其他营养元素按照1/2 Hoagland 营养液标准配制。设3个不同锌浓度,即0 $\mu\text{mol/L}$ (Zn_0)、2 $\mu\text{mol/L}$ (Zn_2)、4 $\mu\text{mol/L}$ (Zn_4)。随机区组设计,每小区15株幼树,3次重复,每处理共45株幼树。每隔1天对各试材定量浇灌1.5 L 营养液,为避免高盐毒害,每隔7天进行1次4 L 去离子水冲洗。处理40天后采样测定各项指标。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 生长指标测定 在处理第0天和第40天测量新梢生长量,用1 m 钢卷尺测量嫁接口至顶端生长点的高度;处理第40天,选取各处理新梢顶端下部第5~7片叶,用Yaxin-1241 叶面积仪测量叶面积。

1.2.2 光合参数、叶绿素含量及叶绿素荧光参数测定

处理第40天,测定叶片光合、荧光参数及叶绿素含量。使用Li-6800 XT 便携式光合仪测定植株叶片净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、胞间二氧化碳浓度(C_i)、蒸腾速率(T_r)。每处理选取5片完全暴露在光下且叶位相同的功能叶,在9:00—11:00 进行测量。测定时采用1 cm^2 的叶室,流速为500 $\mu\text{mol/s}$,参比室的 CO_2 浓度为400 $\mu\text{mol/mol}$,光强设置为1000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。

采用Handy PEA 叶绿素荧光仪测定叶片叶绿素荧光参数,包括初始荧光(F_0)、PS II 最大光化学效率(F_v/F_m)、PS II 实际光化学效率($\Phi\text{PS II}$)、光化学猝灭系数(qP)、非光化学猝灭系数(NPQ)和表观光合电子传递效率(ETR)。叶绿素含量测定参照Arnon^[17]的方法。

1.2.3 植物内源激素含量测定 植物内源激素IAA、 GA_3 、玉米素核苷(ZR)采用高效液相色谱法

测定。

1.2.4 锌含量测定 采用电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP)测定。

1.2.5 叶绿素合成降解及 IAA 合成相关基因表达量测定 采取距新梢顶端(生长点)以下第6~7片成熟叶片进行叶绿素相关生理指标及基因表达分析;采取新梢顶端(生长点)的第2~3片嫩叶进行内源激素含量及相关基因表达分析。采用聚合美试剂盒提取总RNA,将RNA反转录成cDNA并稀释,用UEIrisII RT-PCR 试剂盒(美国光大股份有限公司,中国苏州)进行荧光定量。检测MdHEMA1、MdPAO、MdYUCCA4a、MdYUCCA6a的表达量。利用7500 Real-time PCR system 进行q RT-PCR,反应程序为起始模板95℃ 酶激活2 min,95℃ 变性15 s,57℃ 退火和延伸60 s,45个循环,4℃ 终止反应。每个基因表达量均测定3个生物学重复和3个技术重复,计算平均值。利用NCBI设计基因特异性引物,由安徽通用生物股份有限公司合成(表1)。

1.3 数据分析

试验数据采用IBM SPSS Statistics 26 软件进行方差分析,采用Tukey's 检验进行多重比较($P<0.05$),Sigma Plot 14.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 缺锌胁迫对‘天红2号/冀砧2号’幼树生长和锌含量的影响

由表2可知, Zn_4 处理的叶片锌含量最高,分别是 Zn_0 和 Zn_2 处理的2.12、1.29倍; Zn_0 和 Zn_2 处理的新梢生长量分别比 Zn_4 处理低52.17%、27.52%,叶面积比 Zn_4 处理低51.10%、25.30%。由此可见,缺锌胁迫导致叶片锌含量显著降低,抑制了‘天红2号/冀砧2号’幼树的新梢生长和叶片发育(图1)。

2.2 缺锌胁迫对‘天红2号/冀砧2号’幼树叶片叶绿素含量的影响

表1 实时荧光定量PCR基因引物序列

Table 1 Primer sequences for the real-time PCR quantification

基因 Gene	引物序列 Primer sequences (5'-3') F	引物序列 Primer sequences (5'-3') R
<i>β-Actin</i>	GGATTTGCTGGTGATGATGCT	AGTTGCTCACTATGCCGTGCT
<i>MdHEMA1</i>	GAACATGCACGCTCTTAAC	CGAGTTGAAGATTACACCAG
<i>MdPAO</i>	CAAATGAAGGCAACCCACGG	AGTCTTCCCTGGTGCCATTG
<i>MdYUCCA4a</i>	TAGGCAACACAGACCAATTAGG	ACAATGCTCCAACATCAAGAAC
<i>MdYUCCA6a</i>	GGACTACTTGGTGCCTCAATGGA	ATGATGGTGGTGATGATGATGATAGTG

表 2 缺锌胁迫对‘天红 2 号/冀砧 2 号’幼树生长和锌含量的影响

Table 2 Effects of zinc deficiency on the growth and zinc content of ‘Tianhong 2/Jizhen 2’ saplings

处理 Treatment	新梢生长量 Shoot length (cm)	叶面积 Leaf area (cm ²)	锌含量 Zn content (mg/kg)
Zn0	11.00±1.73 c	13.57±2.85 c	10.47±0.45 c
Zn2	16.67±1.15 b	20.73±3.50 b	17.27±0.53 b
Zn4	23.00±3.61 a	27.75±1.41 a	22.25±0.29 a

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。
Note: Values followed by different lowercase letters in a column indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

由表 3 可知, 随锌浓度的下降, 苹果叶片叶绿素含量显著下降。Zn0 处理的叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量分别较 Zn4 下降 49.04%、64.71% 和 54.34%; Zn2 处理的叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量分别较 Zn4 下降 15.38%、34.31% 和 21.54%。而 Zn0 和 Zn2 处理的叶绿素 a/b 值显著高于 Zn4 处理, 分别是 Zn4 处理的 1.35、1.23 倍。

2.3 缺锌胁迫对‘天红 2 号/冀砧 2 号’幼树光合参数的影响

由表 4 可知, 与 Zn4 相比, Zn0 和 Zn2 处理的净光合速率 (Pn)、蒸腾速率 (Tr) 和气孔导度 (Gs) 显著降低, 且胁迫程度越大, 下降幅度越大。Zn0 和 Zn2 处理的 Pn 分别比 Zn4 低 23.38%、13.01%,

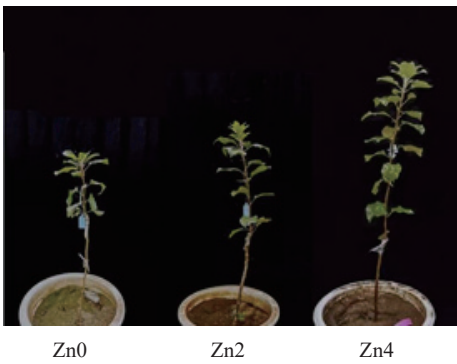


图 1 不同锌浓度处理下‘天红 2 号/冀砧 2 号’幼树
Fig. 1 ‘Tianhong 2/Jizhen 2’ saplings under different Zn concentrations

Tr 分别比 Zn4 低 36.58%、15.49%; Zn4 处理的 Gs 分别是 Zn0 和 Zn2 处理的 1.69、1.22 倍, Zn0 处理的 Gs 比 Zn2 低 27.87%; 不同锌浓度处理下的胞间 CO₂ 浓度 (Ci) 与 Pn、Tr 和 Gs 的变化趋势相反, Zn0 的 Ci 最高, 分别是 Zn2 和 Zn4 的 1.04、1.10 倍。

2.4 缺锌胁迫对‘天红 2 号/冀砧 2 号’幼树叶片叶绿素荧光参数的影响

不同锌浓度处理对苹果叶片叶绿素荧光参数的影响不同 (表 5)。Zn0 和 Zn2 处理的 Fo 分别较 Zn4 升高了 11.67%、7.60%; 与 Zn4 处理相比, Zn0 和 Zn2 处理的 Fv/Fm、ΦPS II、qP 及 ETR 均显著下降。Zn0 和 Zn2 处理的 ΦPS II 分别比 Zn4 低

表 3 缺锌胁迫对‘天红 2 号/冀砧 2 号’幼树叶片叶绿素含量的影响

Table 3 Chlorophyll content in leaves of ‘Tianhong 2/Jizhen 2’ saplings under different Zn concentrations

处理 Treatment	叶绿素 a (mg/g) Chlorophyll a	叶绿素 b (mg/g) Chlorophyll b	总叶绿素 (mg/g) Total chlorophyll	叶绿素 a/b chlorophyll a/b
Zn0	1.06±0.02 c	0.36±0.01 c	1.42±0.03 c	2.91±0.02 a
Zn2	1.76±0.13 b	0.67±0.08 b	2.44±0.21 b	2.64±0.14 b
Zn4	2.08±0.09 a	1.02±0.07 a	3.11±0.06 a	2.15±0.03 c

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。
Note: Values followed by different lowercase letters in a column indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

表 4 缺锌胁迫对‘天红 2 号/冀砧 2 号’幼树光合参数的影响

Table 4 Photosynthetic parameters of ‘Tianhong 2 / Jizhen 2’ saplings under different Zn concentrations

处理 Treatment	净光合速率 [μmol/(m ² ·s)] Pn	蒸腾速率 [mmol/(m ² ·s)] Tr	气孔导度 [mmol/(m ² ·s)] Gs	胞间 CO ₂ 浓度 [μmol/mol] Ci
Zn0	9.60±0.17 c	12.45±0.37 c	247.04±17.63 c	363.40±5.07 a
Zn2	10.90±0.41 b	16.59±0.52 b	342.51±10.74 b	348.28±8.27 b
Zn4	12.53±0.34 a	19.63±0.54 a	416.95±5.64 a	329.41±5.95 c

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。
Note: Values followed by different lowercase letters in a column indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

35.48%、22.58%，qP 分别比 Zn4 低 44.19%、20.93%，ETR 分别比 Zn4 低 29.66%、16.41%；缺锌胁迫使 NPQ 显著上升，Zn0 和 Zn2 处理的 NPQ 分别是 Zn4 处理的 2.37、1.79 倍。

2.5 缺锌胁迫对‘天红 2 号/冀砧 2 号’幼树叶片内源激素含量的影响

由表 6 可知，缺锌胁迫使苹果叶片内源 IAA 和 GA₃ 含量显著下降。Zn4、Zn2 和 Zn0 处理的叶片 IAA 和 GA₃ 含量差异显著，两种内源激素含量在不同锌浓度处理下的苹果叶片中均表现为 Zn4>Zn2>Zn0 的规律。Zn0 和 Zn2 处理的 IAA 含量分别比 Zn4 低 52.17%、39.48%，GA₃ 含量分别比 Zn4 低 49.29%、38.20%。这与不同锌浓度处理下的苹果新梢生长量结果相符。玉米素核苷 (ZR) 含量 Zn2 处理最高，显著高于 Zn0 和 Zn4 处理。

2.6 缺锌胁迫对‘天红 2 号/冀砧 2 号’幼树叶绿素合成降解相关基因相对表达量的影响

如图 2 所示，叶绿素合成基因 *MdHEMA1* 和叶绿素降解基因 *MdPAO* 均在 Zn0 处理下表达量最高，而 Zn4 和 Zn2 处理的 *MdHEMA1* 和 *MdPAO* 表达量无显著差异。Zn0 处理的 *MdHEMA1* 表达量分别是 Zn2 和 Zn4 的 2.80、2.67 倍，*MdPAO* 表达量分别是 Zn2 和 Zn4 的 3.64、3.33 倍。

2.7 缺锌胁迫对‘天红 2 号/冀砧 2 号’幼树 IAA 合成相关基因相对表达量的影响

如图 3 所示，锌供应不足显著降低苹果幼树叶

片中 *MdYUCCA4a* 和 *MdYUCCA6a* 的表达量。Zn4 处理的 *MdYUCCA4a* 表达量分别是 Zn0 和 Zn2 处理的 6.17、1.76 倍；Zn2 处理的 *MdYUCCA4a* 表达量也显著高于 Zn0 处理，是 Zn0 处理的 3.50 倍。Zn4 处理的 *MdYUCCA6a* 表达量同样显著高于 Zn0 和 Zn2 处理，分别是 Zn0 和 Zn2 处理的 2.94、2.20 倍。

3 讨论

形态特征和生理变化是植物响应外界环境所做出的重要改变，可以反映植物的生长状况^[18]。本研究结果表明，缺锌严重影响了‘天红 2 号/冀砧 2 号’幼树新梢生长和叶片发育，使树体生长受到抑制。范晓丹等^[19]通过对 8 种苹果砧木进行耐缺锌能力综合评价，发现耐缺锌能力最强的为小金海棠，其次为火焰海棠，山定子、锡金海棠、八棱海棠和平邑甜茶的耐缺锌能力较弱，丽江山定子和新疆野苹果的耐缺锌能力最弱。其中锡金海棠叶片锌含量在缺锌和对照下分别为 16.7、39.2 mg/kg，缺锌较对照锌含量下降 57.40%，平邑甜茶叶片锌含量在缺锌和对照下分别为 9.9、18.5 mg/kg，缺锌较对照锌含量下降 46.48%，经比较分析，本研究中，‘天红 2 号/冀砧 2 号’苹果幼树叶片锌含量在 Zn0 处理下较 Zn4 处理下降了 52.94%，与耐缺锌能力较弱的平邑甜茶和锡金海棠相似，因此生产上应注意对该砧穗组合的锌元素供应，避免由于缺锌引起生长与生理障碍。

激素作为信号分子在时间和空间上调控植物发

表 5 缺锌胁迫对‘天红 2 号/冀砧 2 号’幼树叶片叶绿素荧光参数的影响

Table 5 Chlorophyll fluorescence parameters of the leaves of ‘Tianhong 2/Jizhen 2’ saplings under different Zn concentrations

处理 Treatment	初始荧光 Fo	PS II 最大光化学效率 Fv/Fm	PS II 实际光化学效率 ΦPS II	光化学猝灭系数 qP	表观光合电子传递效率 ETR	非光化学猝灭系数 NPQ
Zn0	347.67±4.04 a	0.78±0.01 c	0.20±0.01 c	0.24±0.03 c	72.19±11.28 c	0.57±0.03 a
Zn2	335.00±5.51 b	0.81±0.01 b	0.24±0.01 b	0.34±0.02 b	85.79±1.61 b	0.43±0.04 b
Zn4	311.33±7.23 c	0.83±0.01 a	0.31±0.01 a	0.43±0.03 a	102.63±5.97 a	0.24±0.07 c

注：同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Values followed by different lowercase letters in a column indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

表 6 缺锌胁迫下‘天红 2 号/冀砧 2 号’幼树叶片内源激素的含量 (ng/g)

Table 6 Content of endogenous hormones in the leaves of ‘Tianhong 2/Jizhen 2’ saplings under different Zn concentrations

处理 Treatment	吲哚乙酸 IAA	赤霉素 GA ₃	玉米素核苷 ZR
Zn0	34.71±0.03 c	121.90±0.38 c	11.48±0.67 b
Zn2	43.92±0.08 b	148.55±0.09 b	19.30±2.74 a
Zn4	72.57±0.35 a	240.38±0.97 a	9.49±2.31 b

注：同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Values followed by different lowercase letters in a column indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

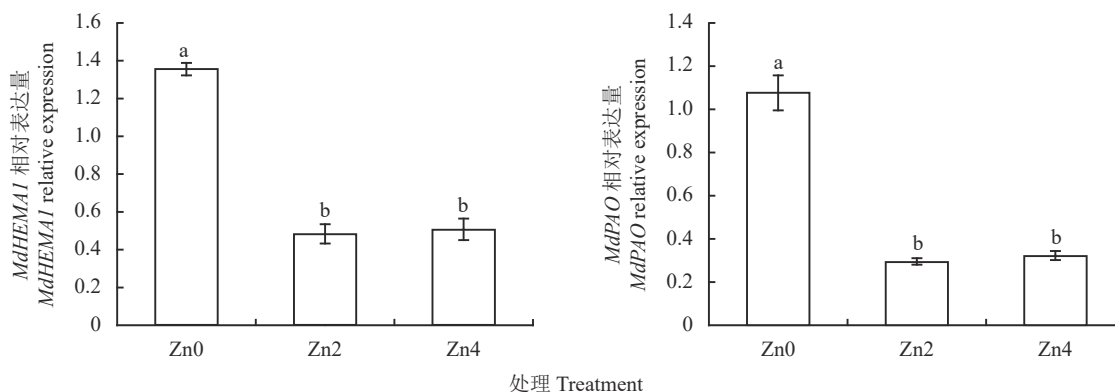


图 2 缺锌胁迫对 *MdHEMA1* 和 *MdPAO* 相对表达量的影响

Fig. 2 Effects of Zn deficiency on the relative expression levels of *MdHEMA1* and *MdPAO*

注: 柱上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

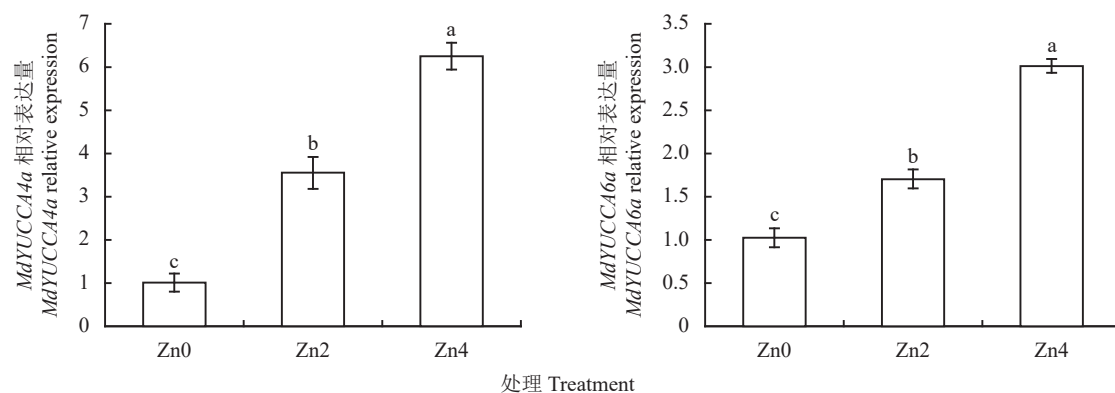


图 3 缺锌胁迫对 *MdYUCCA4a* 和 *MdYUCCA6a* 相对表达量的影响

Fig. 3 Effects of Zn deficiency on the relative expression levels of *MdYUCCA4a* and *MdYUCCA6a*

注: 柱上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

育的诸多过程^[20]。植物可以通过若干途径合成 IAA, 其中吲哚-3-丙酮酸途径是目前公认植物体内 IAA 合成的最主要途径^[21]。该途径由色氨酸转氨酶 (TAAs) 通过转氨基将色氨酸转变为吲哚-3-丙酮酸 (IPA), 后者被核黄素单加氧酶 (YUCs) 进一步催化成吲哚-3-乙酸 (IAA)。而锌是色氨酸合成所必需的。本研究中, 不同锌浓度下, ‘天红 2 号/冀砧 2 号’ 苹果幼树叶片的 IAA 和 GA_3 含量差异显著。叶片中生长素合成基因 *MdYUCCA4a* 和 *MdYUCCA6a* 表达量在 Zn0 处理下均显著降低。由此推断, 缺锌可能首先导致叶片中色氨酸含量下降, 继而引起吲哚-3-丙酮酸 (IPA) 含量下降, YUC 家族催化的底物浓度降低导致 *YUCCA4a* 和 *YUCCA6a* 相对表达量降低, IAA 合成受阻而引起叶片 IAA 含量降低。有研究表明, 生长素可通过调节赤霉素合成基因的表达来影响赤霉素的生成^[22-23]。本研究中, 缺锌胁迫下苹果叶片

GA_3 含量下降可能是由于 IAA 含量的下降影响了 GA_3 的合成, 其具体调控机制有待进一步研究。IAA 和 GA_3 对植物生长有直接促进作用^[24], 两者含量的下降是导致缺锌胁迫下 ‘天红 2 号/冀砧 2 号’ 苹果幼树新梢和叶片发育缓慢的间接原因。

光合作用是果树生长和结果的基础, 构成果树根、茎、叶、花、果实的 90% 以上的干物质来自叶片的光合产物^[25]。导致植物叶片光合作用降低的因素, 主要包括气孔的部分关闭导致的气孔限制和叶肉细胞光合活性的下降导致的非气孔限制两类^[26]。气孔因素是指由于气孔关闭, 造成 C_i 和 G_s 降低, 此时 P_n 的下降主要由气孔因素引起; 相反, 叶片 P_n 的降低伴随着 C_i 的升高, 此时光合作用的主要限制因素是非气孔因素^[27]。本研究中, Zn0 和 Zn2 处理的 P_n 、 Tr 、 G_s 的下降伴随着 C_i 值的上升, 因此缺锌造成 P_n 下降的原因为非气孔限制因素, 这与人

在马铃薯^[28]、灰杨^[29]等植物上的研究结果一致。叶绿体是光合作用的重要细胞器,叶绿体中所含的叶绿素是最主要的光合色素^[30]。本研究表明,苹果幼树叶片叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量在 Zn0 处理下显著降低,叶绿素 a/b 值上升。叶绿素 a/b 可以反映捕光色素复合体 II 在含有叶绿素的结构中的比重,叶绿素 a/b 高对光能的捕获减少,叶绿素 a/b 低预示着叶片对光能的捕获增多^[31-32]。本研究中,缺锌胁迫致使叶绿素 a/b 值升高,表明树体锌营养不足造成叶片对光能的捕获减少,降低可能由缺锌导致光合机构遭受破坏的风险。脱镁叶绿酸 a 加氧酶 (PAO) 通过破坏叶绿素的卟啉环结构而导致绿色的丧失,是叶绿素降解代谢的关键酶,相关研究^[33-34]表明,一些植物激素尤其是 GA₃, 可以通过抑制 PAO 基因的表达,从而延迟叶绿素含量的降低。本试验结果表明, *MdPAO* 相对表达量在 Zn0 处理下显著上升,推测可能是由于苹果幼树在缺锌胁迫下,叶片中 GA₃ 含量下降,不能有效抑制叶绿素降解关键酶基因 *MdPAO* 的表达,迫使其表达量升高,引起叶绿素降解代谢加快。被子植物叶绿素合成由 15 个步骤组成,由 L-谷氨酰-tRNA 到 5-氨基乙酰丙酸 (ALA) 的生物合成过程是整个叶绿素合成的重要组成部分,ALA 合成上游的一个关键酶谷氨酰-tRNA 还原酶是由 *HEMA1* 基因编码。在本研究中, *MdHEMA1* 相对表达量在 Zn0 处理下显著上升,可能是由于苹果叶片首先在极度缺锌的条件下叶绿素降解代谢加快,引起植物产生反馈调节机制诱导叶绿素合成代谢途径中的关键酶基因即 *MdHEMA1* 表达量升高,但所合成的叶绿素依然不能补偿由缺锌所造成的叶绿素降解损失。

叶绿素荧光参数分析有助于探明光合机构受逆境胁迫伤害的程度^[35]。本研究结果表明,‘天红 2 号/冀砧 2 号’苹果幼树在锌供应不足条件下 Fo 显著上升, Fv/Fm、ΦPS II、qP 及 ETR 显著下降。Fo 是判断 PS II 反应中心运转情况的重要指标,暗适应下, Fv/Fm 降低的同时,若伴随有 Fo 的升高,则可明确 PS II 反应中心已经遭到破坏^[36]。Fv/Fm 作为反映 PS II 活性中心的光能转换效率参数,只有在发生光抑制时才会降低。结合本研究结果,‘天红 2 号/冀砧 2 号’幼树在缺锌胁迫下发生了明显光抑制, PS II 反应中心遭到破坏; ΦPS II、qP 及 ETR 的下降说明幼树叶绿体中的光合原初电子传递受到抑制,阻碍了光能向化学能的转化,降低了碳的同化能力,最终表现为 Pn 的下降;而 NPQ 在缺锌胁迫下的显著

上升,说明苹果自身保护其在缺锌胁迫下通过热耗散的方式耗散过剩的光能,这是 Pn 下降的又一重要因素^[37]。

4 结论

缺锌胁迫下,‘天红 2 号/冀砧 2 号’幼树叶片生长素合成基因 *MdYUCCA4a* 和 *MdYUCCA6a* 相对表达量显著降低, IAA 合成受阻,导致 IAA 和 GA₃ 含量降低,进而影响树体生长。PS II 反应中心和 PS II 氧化传递链在缺锌胁迫下受到一定损伤,造成 PS II 活性下降,并加剧叶绿素降解,导致光合作用降低;同时叶绿素降解基因 *MdPAO* 的高表达引起树体产生反馈调节机制来进行自我保护,诱导叶绿素合成代谢途径中的关键酶基因 *MdHEMA1* 表达量升高,但所合成的叶绿素依然不能补偿由缺锌所造成的叶绿素降解损失。

参 考 文 献:

- [1] Noulas C, Tziouvalakas M, Karyotis T. Zinc in soils, water and food crops[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2018, 49: 252–260.
- [2] Pathak G C, Gupta B, Pandey N. Improving reproductive efficiency of chickpea by foliar application of zinc[J]. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2012, 24(3): 173–180.
- [3] Srivastava A K, Singh S. Zinc nutrition, a global concern for sustainable citrus production[J]. *Journal of Sustainable Agriculture*, 2005, 25(3): 5–42.
- [4] Sadeghzadeh B, Rengel Z. The molecular and physiological basis of nutrient use efficiency in crops. Zinc in soils and crop nutrition[M]. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011. 335–375.
- [5] 束怀瑞. 果树栽培理论与实践[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009. Shu H R. Fruit tree cultivation theory and practice[M]. Hangzhou: China Agricultural Press, 2009.
- [6] Misra A, Srivastava A K, Srivastava N K, Khan A. Zn-acquisition and its role in growth, photosynthesis, photosynthetic pigments, and biochemical changes in essential monoterpene oil (s) of *Pelargonium graveolens*[J]. *Photosynthetica*, 2005, 43(1): 153–155.
- [7] Aravind P, Prasad M N V. Zinc protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum* L., a freshwater macrophyte[J]. *Plant Science*, 2004, 166(5): 1321–1327.
- [8] 付春霞, 张元珍, 王衍安, 等. 缺锌胁迫对苹果叶片光合速率及叶绿素荧光特性的影响[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(18): 3826–3833. Fu C X, Zhang Y Z, Wang Y A, et al. Effects of zinc deficiency on photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence characteristics of apple leaves[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(18): 3826–3833.
- [9] Mattiello E M, Ruiz H A, Neves J C L, et al. Zinc deficiency affects

- physiological and anatomical characteristics in maize leaves[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 183: 138–143.
- [10] Liu W, Fu Y, Hu G, *et al.* Identification and fine mapping of a thermo-sensitive chlorophyll deficient mutant in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Planta*, 2007, 226(3): 785–795.
- [11] 周斌, 张金尧, 乙引, 等. 缺锌对玉米根系发育、生长素含量及生长素转运基因表达的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(5): 1352–1358.
- Zhou B, Zhang J Y, Yi Y, *et al.* Effects of zinc deficiency on root growth, endogenous auxin content and key auxin transport genes expressions in maize roots[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2017, 23(5): 1352–1358.
- [12] Salami A U, Kenefick D G. Stimulation of growth in zinc - deficient corn seedlings by the addition of tryptophan 1[J]. *Crop Science*, 1970, 10(3): 291–294.
- [13] Won C, Shen X, Mashiguchi K, *et al.* Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(45): 18518–18523.
- [14] 刘飞, 王金花, 张洪毅, 等. 四种苹果砧木幼苗对锌胁迫的耐性差异[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(18): 3801–3811.
- Liu F, Wang J H, Zhang H Y, *et al.* Differences in tolerance of four apple rootstock seedlings to zinc stress[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(18): 3801–3811.
- [15] 赵德英, 袁继存, 徐锴, 等. 不同矮化中间砧嘎啦苹果幼树形态与不同径级根系养分累积分布特征[J]. *华北农学报*, 2016, 31(4): 184–191.
- Zhao D Y, Yuan J C, Xu K, *et al.* Tree morphology, accumulation and distribution characteristics of mineral nutrient in root system of Gala apple young tree with different dwarfing interstocks[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2016, 31(4): 184–191.
- [16] 张学英, 李中勇, 邵建柱, 等. 苹果矮化砧木新品种‘冀砧2号’[J]. *园艺学报*, 2020, 47(8): 1625–1626.
- Zhang X Y, Li Z Y, Shao J Z, *et al.* A new apple dwarfing rootstock cultivar ‘Jizhen 2’[J]. *Acta Horticulture Sinica*, 2020, 47(8): 1625–1626.
- [17] Amon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*[J]. *Plant Physiology*, 1949, 24(1): 1–15.
- [18] 周武先, 李大荣, 龚丝雨, 等. 外源锌对白木种子萌发及幼苗生长的影响[J]. *北方园艺*, 2022, (3): 98–106.
- Zhou W X, Li D R, Gong S Y, *et al.* Effects of exogenous zinc on seed germination and seedling growth of *Atractylodes macrocephala* [J]. *Northern Horticulture*, 2022, (3): 98–106.
- [19] 范晓丹, 刘飞, 王衍安, 等. 不同苹果砧木对缺锌胁迫的耐性评价[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(10): 3045–3052.
- Fan X D, Liu F, Wang Y A, *et al.* Evaluation of zinc deficiency tolerance in different kinds of apple rootstocks[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(10): 3045–3052.
- [20] 闫树堂, 徐继忠, 陈海江. 不同矮化中间砧红富士苹果内源激素与果实细胞分裂关系研究[J]. *河北农业大学学报*, 2005, 28(3): 31–33.
- Yan S T, Xu J Z, Chen H J. Study on the relationship between cell division in the fruits of Red Fuji apple on different interstocks and endogenous hormones contents[J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2005, 28(3): 31–33.
- [21] 王海霞, 崔大勇. 陆生植物生长素合成的主要途径及调控[J]. *生物学教学*, 2015, 40(9): 2–5.
- Wang H X, Cui D Y. Main pathways and regulation of auxin synthesis in terrestrial plants[J]. *Biology Teaching*, 2015, 40(9): 2–5.
- [22] Olszewski N, Sun T, Gubler F. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14: S61–S80.
- [23] Nemhauser J L, Hong F, Chory J. Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses[J]. *Cell*, 2006, 126(3): 467–475.
- [24] 李洪娜, 许海港, 任饴华, 等. 不同施氮水平对矮化富士苹果幼树生长、氮素利用及内源激素含量的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2015, 21(5): 1304–1311.
- Li H N, Xu H G, Ren Y H, *et al.* Effects of different N application rates on plant growth, ¹⁵N-urea utilization and hormone content of dwarf apple trees[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2015, 21(5): 1304–1311.
- [25] 李天忠, 张志宏. 现代果树生物学[J]. 北京: 科学出版社, 2008.
- Li T Z, Zhang Z H. Modern fruit tree biology[J]. Beijing: Science Press, 2008.
- [26] Chaves M M, Flexas J, Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell[J]. *Annals of Botany*, 2009, 103(4): 551–560.
- [27] Farquhar G D, Sharkey T D. Stomatal conductance and photosynthesis [J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1982, 33(1): 317–345.
- [28] 索海翠, 王丽, 李成晨, 等. 叶面施锌对马铃薯叶片光合特性、超微结构及产量的影响[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(7): 1963–1970.
- Suo H C, Wang L, Li C C, *et al.* Effects of leaf-spraying zinc treatment on photosynthetic characteristics, ultrastructure of potato leaves and yield[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(7): 1963–1970.
- [29] 张莹, 魏安智, 杨途熙, 等. 锌胁迫对灰杨幼苗生长和光合特性的影响[J]. *东北林业大学学报*, 2011, 39(3): 19–21.
- Zhang Y, Wei A Z, Yang T X, *et al.* Effect of zinc stress on growth and photosynthetic characteristics of populus canescens[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2011, 39(3): 19–21.
- [30] 曾淑华, 刘峰, 周昌贵, 等. 铬胁迫对烤烟生长和生理生化指标的影响[J]. *核农学报*, 2014, 28(3): 526–531.
- Zeng S H, Liu F, Zhou C G, *et al.* Effects of chromium stress on growth and physiological and biochemical indexes of flue-cured tobacco[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(3): 526–531.
- [31] 李磊, 李向义, 林丽莎, 等. 两种生境条件下6种牧草叶绿素含量及荧光参数的比较[J]. *植物生态学报*, 2011, 35(6): 672–680.
- Li L, Li X Y, Lin L S, *et al.* Comparison of chlorophyll content and fluorescence parameters of six pasture species in two habitats in China[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2011, 35(6): 672–680.
- [32] Anderson J M, Aro E M. Grana stacking and protection of photosystem II in thylakoid membranes of higher plant leaves under sustained high

- irradiance: An hypothesis[J]. *Photosynthesis Research*, 1994, 41(2): 315–326.
- [33] Li J R, Yu K, Wei J R, *et al.* Gibberellin retards chlorophyll degradation during senescence of *Paris polyphylla*[J]. *Biologia Plantarum*, 2010, 54(2): 395–399.
- [34] Borovsky Y, Paran I. Chlorophyll breakdown during pepper fruit ripening in the chlorophyll retainer mutation is impaired at the homolog of the senescence-inducible stay-green gene[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 117(2): 235–240.
- [35] 吴晓艳, 周守标, 程龙玲, 等. 营养液对鸭儿芹幼苗生长、抗氧化酶活性及叶绿素荧光参数的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2012, 18(4): 1026–1034.
- Wu X Y, Zhou S B, Cheng L L, *et al.* Effects of nutrient solution on growth, antioxidase activities and chlorophyll fluorescence parameters of *Cryptotaenia japonica* seedling[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2012, 18(4): 1026–1034.
- [36] Baker N R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 89–113.
- [37] 董彦红, 赵志成, 张旭, 等. 分根交替滴灌对管栽黄瓜光合作用及水分利用效率的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2016, 22(1): 269–276.
- Dong Y H, Zhao Z C, Zhang X, *et al.* Improvement of alternate partial root-zone drip irrigation on photosynthesis and water use efficiency of cucumbers[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2016, 22(1): 269–276.