

## 亚低温对番茄 *hta9hta11* 双突变体光合碳同化相关指标的影响

卢盼玲<sup>1,2</sup>, 郭世荣<sup>1</sup>, 杨学东<sup>2</sup>, 冯 岩<sup>2</sup>, 季维维<sup>3</sup>, 张 辉<sup>2</sup>, 田守波<sup>2</sup>, 朱为民<sup>1,2,①</sup>

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 上海市农业科学院设施园艺研究所 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201403;  
3. 上海星辉种苗有限公司, 上海 201403)

**Effect of mild hypothermia on photosynthetic carbon assimilation related indexes of *hta9hta11* double mutant of *Lycopersicon esculentum*** LU Panling<sup>1,2</sup>, GUO Shirong<sup>1</sup>, YANG Xuedong<sup>2</sup>, FENG Yan<sup>2</sup>, JI Weiwei<sup>3</sup>, ZHANG Hui<sup>2</sup>, TIAN Shoubo<sup>2</sup>, ZHU Weimin<sup>1,2,①</sup> (1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Shanghai Key Lab of Protected Horticultural Technology, Horticultural Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201403, China; 3. Shanghai Xinghui Seedling Co., Ltd., Shanghai 201403, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2019, 28(2): 106–108

**Abstract:** Taking day temperature of 25 °C and night temperature of 20 °C as the control group, variations of photosynthetic carbon assimilation related indexes of wild type and *hta9hta11* double mutant of *Lycopersicon esculentum* Mill. in treatment group (day temperature of 15 °C and night temperature of 10 °C) were compared. The results show that chlorophyll content in *hta9hta11* double mutant in treatment group is slightly lower than that of wild type; its net photosynthetic rate, contents of sucrose and starch, activities of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase and fructose-1, 6-bisphosphatase, and relative expression levels of *TK*, *GAPDH*, *SBPase*, *PRK*, *RbcL*, *RCA*, *FBPase* and *FBA* genes are significantly lower than those of wild type; while its ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity and relative expression level of *RbcS* gene are significantly higher than those of wild type. It is suggested that photosynthetic carbon assimilation ability of *hta9hta11* double mutant of *L. esculentum* is lower than that of wild type under mild hypothermia condition, and histone variant H2A. Z may play an important role in regulating photosynthetic carbon assimilation pathway of *L. esculentum*.

**关键词:** 番茄; *hta9hta11* 双突变体; 亚低温; 光合碳同化

**Key words:** *Lycopersicon esculentum* Mill.; *hta9hta11* double mutant; mild hypothermia; photosynthetic carbon assimilation

中图分类号: Q948. 112<sup>+</sup>. 2; Q591. 4; S641. 2. 034 文献标志码: A 文章编号: 1674–7895(2019)02–0106–03  
DOI: 10. 3969/j. issn. 1674–7895. 2019. 02. 14

表观遗传机制可调控植物对逆境胁迫的应答, 组蛋白变体 H2A. Z 为重要的表观修饰因子, 参与多种非生物胁迫<sup>[1–3]</sup>, 并且, 其基因家族成员较多<sup>[4–5]</sup>。*hta9hta11* 双突变体植株具有多效性表型, 且 H2A. Z 基因家族其他成员的表达不能补偿 HTA9 和 HTA11 蛋白功能缺失<sup>[6]</sup>。

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 为重要的设施蔬菜和常用的模式植物, 对低温敏感<sup>[7]</sup>。亚低温条件下番茄 *hta9hta11* 双突变体生长明显迟缓<sup>[8]</sup>。为了探明亚低温条件下番茄组蛋白变体 H2A. Z 对光合碳同化表观遗传机制的作用, 作者就亚低温对番茄野生型和 *hta9hta11* 双突变体光合碳同化相关指标的影响进行了研究, 以期进一步探明番茄组蛋白变体 H2A. Z 的功能, 并为利用表观遗传修饰提高番茄对亚低温的耐受能力进而提高番茄产量和品质提供研究基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

以上海市农业科学院设施园艺研究所上海市设施园艺技术重点实验室保存的番茄品种‘1479’的野生型和 *hta9hta11* 双突变体幼苗为研究对象。

### 1.2 方法

1.2.1 亚低温处理方法 选取 3 叶 1 心期长势良好且基本一致的野生型和 *hta9hta11* 双突变体幼苗, 移入人工气候箱中, 培养 1 d 后进行亚低温处理。设置对照组 (昼温和夜温分别为 25 °C 和 20 °C) 和处理组 (昼温和夜温分别为 15 °C 和 10 °C)。其他培养条件相同, 光照时间 14 h · d<sup>-1</sup>、光照强度

收稿日期: 2018–11–30

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0101703; 2017YFD0101902); 上海市农委资助项目 [沪农科攻字 (2015) 第 6–1–7 号; 沪农科种字 (2017) 第 3–1–2 号; 沪农青字 (2018) 第 1–15 号]

作者简介: 卢盼玲 (1993—), 女, 江苏淮安人, 硕士研究生, 主要从事番茄栽培与育种研究。

①通信作者 E-mail: wnzhu@126.com

500  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 空气相对湿度 70%。栽培基质为 V(泥炭):V(蛭石)=2:1 的混合基质。采用随机区组排列, 每组野生型和 *hta9hta11* 双突变体幼苗各 50 株, 均 3 个重复。处理 20 d 后取样检测各指标。

1.2.2 指标测定 在晴天 9:00 至 11:00, 每组取 3 株苗, 用 GFS-3000 便携式高级光合作用-荧光测量系统(德国 Walz 公司)测定苗顶端向下第 3 枚叶的净光合速率, 重复测定 3 次。测定时, 开放气路, 光照强度 800  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $\text{CO}_2$  浓度 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 叶室温度 ( $25 \pm 2$ )  $^\circ\text{C}$ , 空气相对湿度 60%~70%。

每组取 9 株苗, 采集顶端向下第 2 和第 3 枚叶, 测定叶绿素含量<sup>[9]</sup>以及淀粉和蔗糖含量<sup>[10]</sup>, 并测定果糖-1,6-二磷酸醛缩酶活性<sup>[11]</sup>以及核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶和果糖-1,6-二磷酸酯酶活性<sup>[12]</sup>。每个指标重复测定 3 次。

每组取 9 株苗, 采集顶端向下第 2 和第 3 枚叶, 每 3 株为 1 组, 视为 1 个重复。将叶剪碎后混合, 称取 0.1 g, 在液氮中研磨成粉, 用 RNA 提取试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]提取总 RNA, 用 PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix 反转录试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]合成 cDNA 第 1 条链, 用 TB Green<sup>TM</sup> Premix Dimer Eraser 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]在 Applied Biosystems QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)上完成扩增反应, 并采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法<sup>[13]</sup> 计算基因的相对表达量。供试基因引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

### 1.3 数据分析

利用 EXCEL 2016 软件处理数据, 采用 SPSS 19.0 统计分析软件进行单因素方差分析。

## 2 结果和讨论

亚低温对番茄野生型和 *hta9hta11* 双突变体光合碳同化相关指标的影响见表 2。由表 2 可见: 对照组(昼温 25  $^\circ\text{C}$  和夜温 20  $^\circ\text{C}$ ) 野生型和 *hta9hta11* 双突变体的净光合速率(Pn), 叶绿素(Chl)和蔗糖(Suc)含量, 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶(FBA)、果糖-1,6-二磷酸酯酶(FBPase)和核酮糖-1,5-二磷酸

表 1 用于扩增反应的各基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of each gene used for amplification reaction

基因 Gene	引物序列(5'→3')	
	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
<i>RbcL</i>	AATTGTTGGTGATGGTAGT	TCCTTCTCGTAGTCTTGT
<i>RbcS</i>	GCAATGCTGGAAGAGTGA	AGGAAGGTATGAGAGTGT
<i>RCA</i>	ATTGTCACCTGGTAACGATT	ATGTCATCATCAGGAAGCTC
<i>FBPase</i>	ATGATGATTCCACGATTGA	GTAGACCACTGAACTTGAA
<i>GAPDH</i>	ACTCTGGTATATGTGTTACTC	AGGGAAGCAAGATTACTAAA
<i>SBPase</i>	AATGGAGACTGCTGTAC	TTGAAGTTGAGTATTGTTGAG
<i>PRK</i>	GACCAAGGAAGATGACAT	TACCACAACCAGAATCAG
<i>TK</i>	TTGAGAAGATGGACCTA	GTGCTTATTCTTGAGGATTG
<i>FBA</i>	AAGGCTGCTCAGATACTTAC	CTTGTTTACCTTCATCGGATTAC
<i>Actin</i> <sup>1)</sup>	TTCCGTTGCCAGAGTCTCT	TCGCCCTTGAATCCACATC

<sup>1)</sup> 内参基因 Referece gene.

羧化/加氧酶(Rubisco)活性以及 *PRK*、*RbcS*、*RbcL*、*FBPase* 和 *FBA* 基因的相对表达量无显著差异; *hta9hta11* 双突变体的淀粉(Sta)含量和 *TK* 基因的相对表达量显著 ( $P < 0.05$ ) 低于野生型, 而其 *GAPDH*、*SBPase* 和 *RCA* 基因的相对表达量显著高于野生型。处理组(昼温 15  $^\circ\text{C}$  和夜温 10  $^\circ\text{C}$ ), *hta9hta11* 双突变体的 Chl 含量略低于野生型; 其 Pn 值, Suc 和 Sta 含量, FBA 和 FBPase 活性以及 *TK*、*GAPDH*、*SBPase*、*PRK*、*RbcL*、*RCA*、*FBPase* 和 *FBA* 基因的相对表达量显著低于野生型; 而其 Rubisco 活性和 *RbcS* 基因的相对表达量显著高于野生型。

由表 2 还可见: 就野生型而言, 对照组和处理组间的 Chl 和 Suc 含量、Rubisco 活性和 *TK* 基因的相对表达量无显著差异; 处理组的 Pn 值、Sta 含量和 *RbcS* 基因的相对表达量显著低于对照组, 而其 FBA 和 FBPase 活性以及 *GAPDH*、*SBPase*、*PRK*、*RbcL*、*RCA*、*FBPase* 和 *FBA* 基因的相对表达量显著高于对照组。就 *hta9hta11* 双突变体而言, 对照组和处理组间的 Chl 和 Suc 含量、Rubisco 活性以及 *FBPase* 和 *FBA* 基因的相对表达量无显著差异; 处理组的 Pn 值, Sta 含量, FBA 活性以及 *TK*、*GAPDH* 和 *RCA* 基因的相对表达量显著低于对照组, 而其 FBPase 活性以及 *SBPase*、*PRK*、*RbcS* 和 *RbcL* 基因的相对表达量显著高于对照组。

表 2 亚低温对番茄野生型(WT)和 *hta9hta11* 双突变体(*hta9hta11*)光合碳同化相关指标的影响( $\bar{X} \pm SD$ )<sup>1)</sup>

Table 2 Effect of mild hypothermia on photosynthetic carbon assimilation related indexes of wild type (WT) and *hta9hta11* double mutant (*hta9hta11*) of *Lycopersicon esculentum* Mill. ( $\bar{X} \pm SD$ )<sup>1)</sup>

处理 <sup>2)</sup> Treatment <sup>2)</sup>	Pn/( $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )		$\text{C}_1$ /( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )		$\text{C}_2$ /( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )		$\text{C}_3$ /( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	
	WT	<i>hta9hta11</i>	WT	<i>hta9hta11</i>	WT	<i>hta9hta11</i>	WT	<i>hta9hta11</i>
CK	11.53±1.20Aa	11.84±1.41Aa	2.44±0.13Aa	2.57±0.22Aa	63.85±4.74Aa	58.69±5.66Aa	115.67±11.99Aa	100.24±9.81Ab
T	8.59±1.57Ba	6.64±1.01Bb	2.32±0.14Aa	2.22±0.12Aa	70.46±5.90Aa	54.38±3.96Ab	73.03±7.62Ba	61.68±4.45Bb
处理 <sup>2)</sup> Treatment <sup>2)</sup>	$\text{A}_1$ /( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )		$\text{A}_2$ /( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )		$\text{A}_3$ /( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )		$\text{RE}_1$	
	WT	<i>hta9hta11</i>	WT	<i>hta9hta11</i>	WT	<i>hta9hta11</i>	WT	<i>hta9hta11</i>
CK	80.79±0.50Ba	81.18±4.57Aa	34.83±2.35Ba	33.67±1.90Ba	83.59±6.43Aa	107.17±9.82Aa	0.50±0.05Aa	0.36±0.01Ab
T	90.91±6.50Aa	52.46±7.42Bb	63.18±4.69Aa	47.08±3.98Ab	92.16±9.82Ab	130.74±13.39Aa	0.51±0.11Aa	0.18±0.01Bb

续表2 Table 2 (Continued)

处理 <sup>2)</sup> Treatment <sup>2)</sup>	RE <sub>2</sub>		RE <sub>3</sub>		RE <sub>4</sub>		RE <sub>5</sub>	
	WT	<i>hta9hta11</i>	WT	<i>hta9hta11</i>	WT	<i>hta9hta11</i>	WT	<i>hta9hta11</i>
CK	0.23±0.02Bb	0.34±0.04Aa	0.26±0.01Bb	0.47±0.04Ba	0.54±0.13Ba	0.51±0.04Ba	1.32±0.19Aa	1.38±0.11Ba
T	2.58±0.26Aa	0.11±0.02Bb	2.10±0.16Aa	1.01±0.04Ab	1.60±0.17Aa	0.89±0.11Ab	0.58±0.06Bb	1.74±0.12Aa
处理 <sup>2)</sup> Treatment <sup>2)</sup>	RE <sub>6</sub>		RE <sub>7</sub>		RE <sub>8</sub>		RE <sub>9</sub>	
	WT	<i>hta9hta11</i>	WT	<i>hta9hta11</i>	WT	<i>hta9hta11</i>	WT	<i>hta9hta11</i>
CK	0.24±0.01Ba	0.24±0.03Ba	0.47±0.03Bb	1.95±0.19Aa	0.27±0.01Ba	0.25±0.02Aa	0.46±0.02Ba	0.51±0.05Aa
T	0.63±0.08Aa	0.32±0.01Ab	1.03±0.05Aa	0.57±0.02Bb	0.63±0.07Aa	0.24±0.03Ab	1.28±0.14Aa	0.57±0.04Ab

<sup>1)</sup> 同列中不同大写字母表示在不同组间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different capitals in the same column indicate the significant ( $P < 0.05$ ) difference among different groups; 同行中不同小写字母表示在野生型和 *hta9hta11* 双突变体间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different lowercases in the same row indicate the significant ( $P < 0.05$ ) difference between wild type and *hta9hta11* double mutant. Pn: 净光合速率 Net photosynthetic rate; C<sub>1</sub>: 叶绿素含量 Chlorophyll content; C<sub>2</sub>: 蔗糖含量 Sucrose content; C<sub>3</sub>: 淀粉含量 Starch content; A<sub>1</sub>: 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶活性 Activity of fructose-1,6-bisphosphate aldolase; A<sub>2</sub>: 果糖-1,6-二磷酸酶活性 Activity of fructose-1,6-bisphosphatase; A<sub>3</sub>: 核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶活性 Activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. RE<sub>1</sub>, RE<sub>2</sub>, RE<sub>3</sub>, RE<sub>4</sub>, RE<sub>5</sub>, RE<sub>6</sub>, RE<sub>7</sub>, RE<sub>8</sub>, RE<sub>9</sub>: 分别表示 *TK*, *GAPDH*, *SBPase*, *PRK*, *RbcS*, *RbcL*, *RCA*, *FBPase* 和 *FBA* 基因的相对表达量 Indicating relative expression levels of *TK*, *GAPDH*, *SBPase*, *PRK*, *RbcS*, *RbcL*, *RCA*, *FBPase*, and *FBA* genes, respectively.

<sup>2)</sup> CK: 对照组 (昼温 25 °C 和夜温 20 °C) The control group with day temperature of 25 °C and night temperature of 20 °C; T: 处理组 (昼温 15 °C 和夜温 10 °C) Treatment group with day temperature of 15 °C and night temperature of 10 °C.

本研究中,处理组番茄野生型和 *hta9hta11* 双突变体的 Pn 值显著低于对照组,处理组 *hta9hta11* 双突变体的 Pn 值显著低于野生型,说明 *hta9hta11* 双突变体对亚低温更敏感。处理组 *hta9hta11* 双突变体的 Suc 和 Sta 含量显著低于野生型,处理组 *hta9hta11* 双突变体的 FBA 和 FBPase 活性显著低于野生型,而其 Rubisco 活性显著高于野生型,据此推测在亚低温条件下番茄组蛋白变体 H2A. Z 可能对光合碳同化关键酶活性有调节作用。与对照组相比,*hta9hta11* 双突变体 *TK*, *GAPDH* 和 *RCA* 基因的相对表达量显著下降,而 *SBPase*, *PRK*, *RbcS* 和 *RbcL* 基因的相对表达量却显著上升,说明在亚低温条件下番茄组蛋白变体 H2A. Z 可能参与调控光合碳同化关键酶基因的表达,但具体调控机制尚不明确,有待进一步研究。综合分析认为,亚低温条件下番茄 *hta9hta11* 双突变体的光合碳同化能力低于野生型,组蛋白变体 H2A. Z 可能在调控番茄光合碳同化途径中起重要作用。

#### 参考文献:

- [1] HU Y, SHEN Y, SILVA N C E, et al. The role of histone methylation and H2A. Z occupancy during rapid activation of ethylene responsive genes[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e28224.
- [2] NGUYEN N H, CHEONG J J. H2A. Z-containing nucleosomes are evicted to activate *AtMYB44* transcription in response to salt stress [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 499(4): 1039-1043.
- [3] KUMAR S V, WIGGE P A. H2A. Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*[J]. Cell, 2010, 140(1): 136-147.
- [4] YI H, SARDESAI N, FUJINUMA T, et al. Constitutive expression exposes functional redundancy between the *Arabidopsis* histone H2A gene *HTAI* and other H2A gene family members [J]. The Plant Cell, 2006, 18(7): 1575-1589.
- [5] HU Y, LAI Y. Identification and expression analysis of rice histone genes[J]. Plant Physiology Biochemistry, 2015, 86(2): 55-65.
- [6] MARCH-DÍAZ R, REYES J C. The beauty of being a variant: H2A. Z and the SWR1 complex in plants [J]. Molecular Plant, 2009, 2(4): 565-577.
- [7] CHEN H, CHEN X, CHEN D, et al. A comparison of the low temperature transcriptomes of two tomato genotypes that differ in freezing tolerance; *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites* [J]. BMC Plant Biology, 2015, 15(1): 132.
- [8] 杨学东, 田守波, 朱为民, 等. 番茄组蛋白变体 H2A. Z 基因双突变体的获得及其功能研究 [J]. 园艺学报, 2018, 45(6): 1081-1088.
- [9] 刘 彧, 王 琳, 杨伊如, 等. 干旱胁迫下转 *CINAC9* 基因露地菊品种‘纽 9717’叶片光合及叶绿素荧光特性的比较 [J]. 植物资源与环境学报, 2018, 27(3): 41-48.
- [10] YUAN Y, ZHONG M, SHU S, et al. Effects of exogenous putrescine on leaf anatomy and carbohydrate metabolism in cucumber (*Cucumis sativus* L.) under salt stress [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2015, 34(3): 451-464.
- [11] MUSTROPH A, ALBRECHT G. Tolerance of crop plants to oxygen deficiency stress: fermentative activity and photosynthetic capacity of entire seedlings under hypoxia and anoxia [J]. Physiologia Plantarum, 2003, 117(4): 508-520.
- [12] HOLADAY A S, MARTINDALE W, ALRED R, et al. Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plants to low temperature [J]. Plant Physiology, 1992, 98(3): 1105-1114.
- [13] 李 翔, 桑勤勤, 束 胜, 等. 外源油菜素内酯对弱光下番茄幼苗光合碳同化关键酶及其基因的影响 [J]. 园艺学报, 2016, 43(10): 2012-2020.

(责任编辑: 佟金凤)