

臭氧胁迫对葡萄叶片光系统活性的影响及D1蛋白周转的防御作用

邢浩, 郝桂梅, 陈钲文, 孙永江, 翟衡, 杜远鹏*

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, 山东泰安271018

摘要: 为探究臭氧(O₃)胁迫对葡萄叶片光合电子传递的抑制, 以‘赤霞珠’(*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon)葡萄叶片为试材, 利用Dual-PAM100荧光仪测定O₃胁迫对叶片PSI及PSII光系统活性的影响, 同时配合Handy PEA测量葡萄叶片快速荧光, 结合抑制剂引入分析D1蛋白周转的防御作用。结果表明: O₃胁迫可以显著降低叶绿素最大荧光F_m和最大光化学效率F_v/F_m值, 但最大P₇₀₀信号P_m没有显著变化; 荧光光响应曲线分析表明O₃胁迫下叶片PSII实际光化学活性Y(II)显著降低, 但PSII激发压(1-qP)及非光化学淬灭(NPQ)显著升高, 同时O₃胁迫显著降低了葡萄PSII反应中心吸收的光能用于电子传递的量子产额φ_{E0}和单位面积有活性的反应中心的数目RC/CS₂; O₃胁迫也造成了葡萄叶片PSI供体侧限制引起的非光化学能量耗散的量子产量Y(ND)显著升高, 从而导致了PSI实际光化学活性Y(I)的降低。林可霉素(Lin)处理导致O₃胁迫下葡萄叶片F_v/F_m及Y(II)进一步下降, 与对照相比分别降低了28.8%和63.1%, 但Y(I)没有显著变化。由此可知, 臭氧胁迫主要抑制了PSII活性, 并导致PSI电子供体侧受到抑制; 抑制D1蛋白周转可以使臭氧胁迫下葡萄叶片PSII发生严重的破坏, 但PSI活性未受到影响。

关键词: 葡萄; 臭氧; D1蛋白; 电子传递; 光抑制; 光保护

近地层臭氧(O₃)是夏季最主要的大气污染物, 不但威胁到人类健康, 还越来越明显地影响到作物生长(Wahid等1995; 张巍巍等2011)。近年来, 我国近地层O₃浓度增加较快, 夏季平均监测浓度已达到50~60 nL·L⁻¹ (Wang等2007), O₃已经成为威胁人类健康和影响农业发展的重要污染物。

前人研究表明, O₃具有强氧化性, 可对叶片造成光氧化, 分解光合色素, 阻碍光合电子传递, 损伤光保护系统, 降低光能利用效率, 抑制卡尔文循环, 进而导致作物减产(Degl’Innocenti等2007)。本实验室在前期研究中发现, 低浓度O₃ (25~55 nL·L⁻¹)可通过气孔限制引起葡萄叶片P_n的下降, 当O₃浓度达到并超过80 nL·L⁻¹时, 以非气孔限制的方式抑制光合作用(孙永江等2015)。

光抑制是指光照强度超过植物光合作用所能利用的限度而使光合效率下降的现象, 包括PSII光抑制和PSI光抑制(张子山等2009), 其程度取决于光破坏与光修复的相对速率。植物体内PSII与PSI串联协同进行光合电子的传递, 研究表明与PSII相比, PSI活性对大多数逆境胁迫抵御能力较强(Powles 1984), 只有当植物体内累积过量活性氧时PSI活性才会受到明显抑制(Sonoike等1997)。

D1蛋白是PSII反应中心重要组成部分, 可以维持PSII反应中心的稳定, 在PSII反应中心中起着重要作用, 在逆境胁迫下, D1蛋白的快速周转是主要的光修复机制, 对逆境胁迫后快速恢复植物PSII反应活性具有重要作用(Aro等1994)。前人研究发

现活性氧(reactive oxygen species, ROS)主要通过抑制植物光D1蛋白再合成从而加剧光抑制程度(Takahashi和Badger 2011)。O₃熏蒸促进了南瓜成熟功能叶片D1蛋白的降解(Ciampi等1997), 但增加了云杉叶片D1蛋白含量(Godde和Buchhold 1992), 这可能与O₃熏蒸浓度、时间及供试材料差异有关。分析文献发现, 前人主要研究O₃对PSII的光氧化机制, 但忽视了PSII光修复机制研究, 并对PSI光抑制研究较少。本试验通过测定O₃胁迫下‘赤霞珠’葡萄的叶绿素荧光参数, 研究了臭氧胁迫下叶片PSII、PSI光抑制程度及D1蛋白周转的影响, 希望丰富该领域的知识并为葡萄田间管理技术提供一定的理论依据。

材料与方法

1 试验材料及设计

试验于2016年6~7月在山东农业大学园艺学院葡萄试验站进行。

盆栽试验试材为一年生‘赤霞珠’(*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon)自根苗, 于2016年4月5日种植于直径25 cm、高35 cm的盆中, 栽培基质为壤

收稿 2017-06-16 修定 2017-09-08

资助 国家自然科学基金(31572084)、国家葡萄产业技术体系建设专项(CARS-29-zp-02)、长江学者和创新团队发展计划(IRT15R42)和山东省“双一流”建设奖补资金(SYL2017-YSTD10)。

* 通讯作者(E-mail: duyuanpeng001@163.com)。

土:沙:草炭=2:1:1。每盆1株,每株仅留1个新梢直立生长,不留副梢,待长至12~15片完全展开叶时进行试验处理。在晴朗上午选择枝干粗度和叶片数量相对一致的苗木放置到气室内。气室内部用LED光源补光,环境温度为23~28°C。本实验采用的O₃浓度为110 nL·L⁻¹, O₃胁迫处理为O₃ [(110±10) nL·L⁻¹]和弱光(500±50) μmol·m⁻²·s⁻¹处理4 h; 以另外一个气室O₃浓度15~25 nL·L⁻¹和弱光(500±50) μmol·m⁻²·s⁻¹处理4 h作为对照。各重复5株。处理结束后立即进行叶绿素荧光参数的测定。

抑制剂引入试验选择生长部位及生长状态一致的健康叶片,采摘10片立即插入溶液中,并在液面下剪断叶柄(防止空气进入叶柄影响叶片蒸腾),分为2组,分别用清水和1 mmol·L⁻¹林可霉素(linc-mycin, 简写 Lin, D1蛋白合成抑制剂)培养8 h,培养环境为25°C、黑暗。将培养的两组离体叶片同时在气室中进行O₃熏蒸4 h,条件同上,处理结束后马上测定叶绿素荧光参数。以无O₃胁迫清水培养的离体葡萄叶片作为对照。

2 熏蒸系统

臭氧熏蒸系统参考本实验室王金欢等(2016)和耿庆伟等(2016)的方法并有所改进。系统由开顶式气室(open top chambers, OTCs)、供气系统、O₃发生与浓度控制系统、O₃浓度监测系统等四部分组成。OTC四周用温室专用的聚乙烯塑料膜包裹,外部用遮阳网包裹,内部1.5 m高度加装LED光源(LED冷光源植物灯,型号SP501-N, 405 W, 上海三澎机电有限公司),顶部与大气相通。O₃发生器(WJ-HY5型)所产生的O₃在轴流风机(SF2-2型)的作用下被通入OTC内,通过转子流量计调节O₃发生器的进氧量以调控OTC内的O₃浓度,用O₃浓度监测仪(DR70C-臭氧型)实时监测OTC内的O₃浓度,并把数据传输到电脑上进行监控和保存。

3 荧光参数的测定

用连续激发式荧光仪(Handy PEA, Hansatech, 英国)测定O-J-I-P曲线(李鹏民等2005),包括初始荧光(F_0)、在300 μs时的荧光(F_k)、在2 ms时的荧光(F_j)、在30 ms时的荧光(F_i)、最大荧光(F_m)、PSII最大光化学量子产量(F_v/F_m)和PSII潜在活性(F_v/F_0),测定前叶片预先暗适应30 min。通过对O-J-I-P曲线的分析得出反映PSII供体侧、受体侧及PSII反应中心功能的参数。用 $W_k=(F_k-F_0)/(F_j-$

$F_0)$ 表示受体侧放氧复合体受伤害程度;用捕获的激子将电子传递到电子传递链中 Q_A 下游其他电子受体的概率 $\phi_{E_0}=(F_m-F_j)/(F_m-F_0)$ 来表示PSII受体侧电子传递的功能;用单位面积有活性的反应中心的数目 $RC/CS_0=\Phi_{p_0}\times(V_j/M_0)\times(ABS/CS_0)$ 表示PSII反应中心变化(Cao和Govindjee 1990)。

参考Klughammer和Schreiber (1994)和Kramer等(2004)的方法进行叶绿素荧光光响应曲线的测定。采用Dual-PAM100荧光仪(Walz, 德国)进行饱和和脉冲分析。测定处理前叶片暗适应30 min后的初始荧光产量(F_0)和最大荧光产量(F_m)。处理结束后马上进行荧光光响应曲线的测定,共设置9个光强梯度,从低到高为10、23、41、113、212、287、495、780和1 215 μmol·m⁻²·s⁻¹,每个光强梯度照射样品30 s后打开饱和脉冲光进行光下最大荧光产量(F_m')及光下最大量子产量(P_m')的测量。按照如下公式进行荧光参数的计算。

PSII的有效量子产率 $Y(II)=(F_m'-F_s)/F_m'$ 。

非调节能量耗散的量子产率 $Y(NO)=1/[NPQ+1+qL(F_m/F_0-1)]$ 。

调节能量耗散的量子产率 $Y(NPQ)=1-Y(II)-1/[NPQ+1+qL(F_m/F_0-1)]$ 。

PSI的有效量子产率 $Y(I)=1-Y(ND)-Y(NA)$ 。

PSI供体侧限制引起的非光化学能量耗散的量子产量 $Y(ND)=1-P_{700\text{ red}}$ 。

PSI受体侧限制引起的非光化学能量耗散的量子产量 $Y(NA)=(P_m-P_m')/P_m$ 。

4 数据处理

采用Microsoft Excel 2013处理数据和制图,采用DPS 7.05软件进行方差分析,LSD法进行多重比较,显著水平为0.05。

实验结果

1 臭氧胁迫对盆栽葡萄叶片PSI和PSII活性的影响

由表1看出, O₃胁迫之后导致盆栽葡萄叶片的光合性能显著下降,最大荧光 F_m 比对照显著下降了17.0%;反映原初光化学反应的最大量子产额即叶片的最大光化学效率的 F_v/F_m 值比对照下降了11.1%,而反映远红光适应后打开饱和脉冲测量的最大 P_{700} 信号的 P_m 值与对照没有显著性变化,表明浓度臭氧胁迫下,弱光处理对盆栽葡萄叶片PSI活

表1 臭氧胁迫对盆栽葡萄叶片PSI和PSII活性的影响
Table 1 Effects of ozone stress on PSI and PSII activity of potted grape leaves

参数	对照	臭氧胁迫
F_m	3.18 ± 0.05^a	2.64 ± 0.06^b
F_v/F_m	0.81 ± 0.04^a	0.72 ± 0.03^b
P_m	1.18 ± 0.06^a	1.10 ± 0.05^a

同行不同字母表示在5%水平上差异显著,表2同此。

性没有影响。 O_3 胁迫下盆栽葡萄叶片PSII活性容易发生光抑制,而PSI抗性较强。

2 臭氧胁迫对盆栽葡萄叶片光能分配的影响

从荧光光响应曲线可知,反映叶片PSI的实际光化学效率的 $Y(I)$ 随着光照强度升高而逐渐降低,与对照相比, O_3 胁迫的盆栽葡萄叶片在超过 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照强度下 $Y(I)$ 即发生显著下降(图1-A)。 $Y(\text{ND})$ 表示由于PSI供体侧限制引起的非光

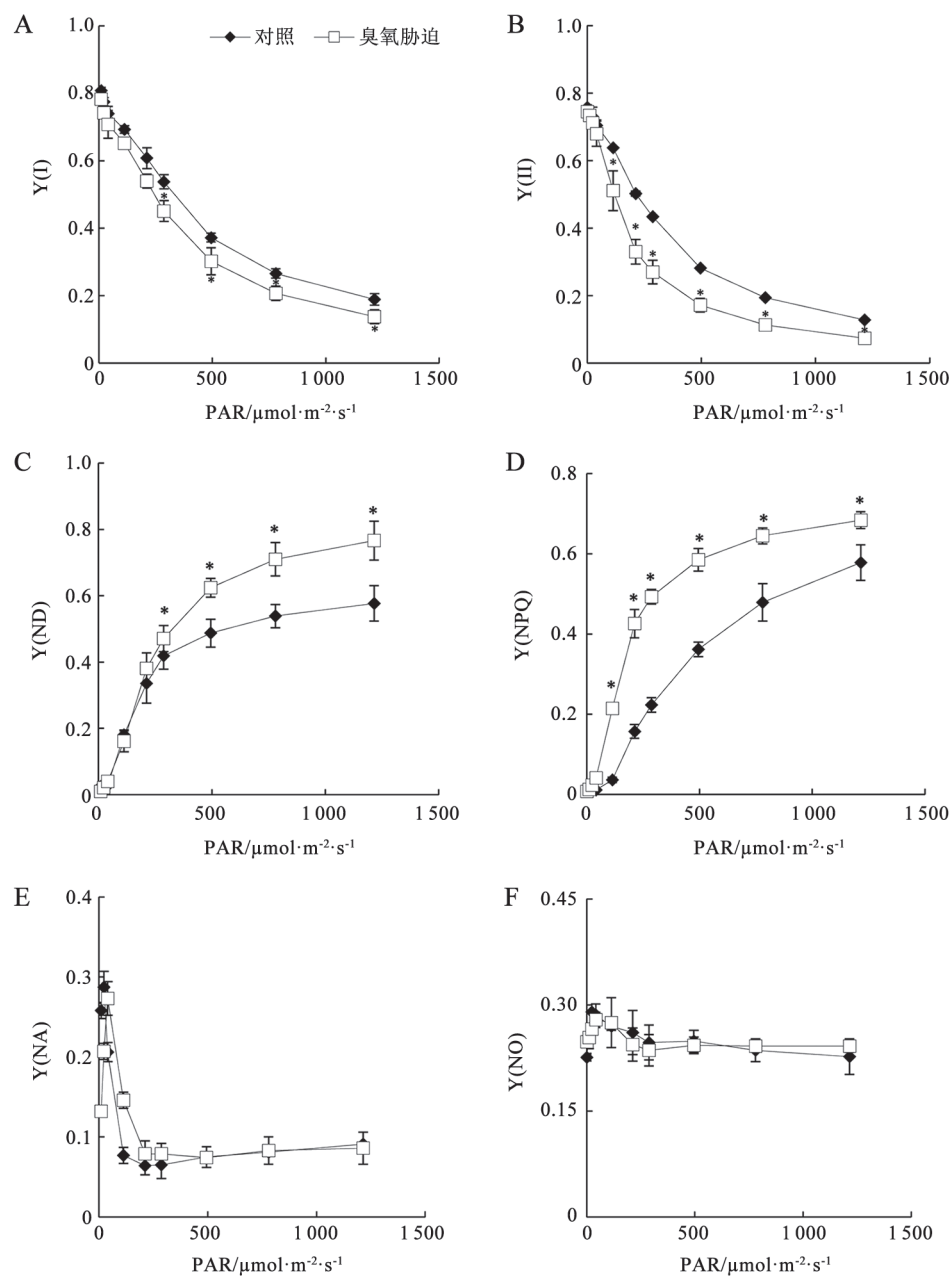


图1 臭氧胁迫对盆栽葡萄叶片 $Y(I)$ 、 $Y(\text{ND})$ 和 $Y(\text{NA})$ 及 $Y(II)$ 、 $Y(\text{NPQ})$ 和 $Y(\text{NO})$ 的影响
Fig.1 Effects of ozone stress on $Y(I)$, $Y(\text{ND})$, $Y(\text{NA})$ and $Y(II)$, $Y(\text{NPQ})$, $Y(\text{NO})$ of potted grape leaves

*表示对照和臭氧胁迫叶片之间存在显著差异,下同。

化学能量耗散的量子产量。 O_3 胁迫导致葡萄叶片 $Y(ND)$ 显著上升(图1-C)。 $Y(NA)$ 是由于PSI受体侧限制引起的非光化学能量耗散的量子产量。由图1-E中看出,葡萄叶片经过 O_3 胁迫之后 $Y(NA)$ 值没有显著差异。以上结果表明 O_3 胁迫下葡萄叶片 $Y(I)$ 的降低,主要是由于PSI供体侧限制引起的非光化学能量耗散的量子产量的升高而致。

$Y(II)$ 是PSII的有效量子产率。 $Y(NPQ)$ 代表通过非光化学淬灭的调节能量耗散的量子产率。与对照相比,葡萄叶片经过 O_3 胁迫之后 $Y(II)$ 发生显

著下降(图1-B),而 $Y(NPQ)$ 显著升高(图1-D);但代表非调节能量耗散的量子产率 $Y(NO)$ 与对照相比没有显著变化(图1-F)。

$1-qP$ 反映总PSII的反应中心关闭反应中心所占的比例。由图2-A看出 O_3 胁迫和对照的葡萄叶片 $1-qP$ 均随着光照增加而上升,而在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照以上 O_3 胁迫比对照 $1-qP$ 有显著上升。反映叶片热耗散的变化和光抑制程度的非光化学淬灭 NPQ 在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照 O_3 胁迫处理条件下有更为显著的上升,表明非光化学淬灭 NPQ 对 O_3 胁迫更为敏感(图2-B)。

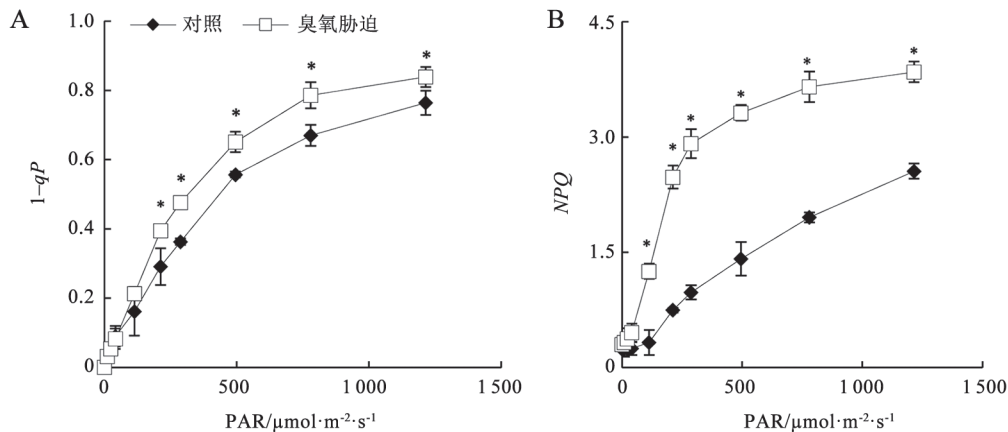


图2 臭氧胁迫对盆栽葡萄叶片 $1-qP$ 和 NPQ 的影响

Fig.2 Effects of ozone stress on $1-qP$ and NPQ of potted grape leaves

W_k 表示受体侧放氧复合体受伤害程度, W_k 升高表示供体侧受到伤害。 O_3 胁迫显著提高了葡萄叶片的 W_k 值(图3-A)。 ϕ_{E_0} 反映了反应中心吸收的光能用于电子传递的量子产额,即反应中心吸收的光能将电子传递到电子传递链中超过 Q_A 的其他电子受体的概率。 O_3 胁迫能显著降低葡萄叶片 ϕ_{E_0} , O_3 胁迫相比对照 ϕ_{E_0} 值下降了34.5%(图3-B)。 RC/CS_0 反映了单位面积有活性的反应中心的数目。从图3-C可以看出, O_3 胁迫处理能显著降低葡萄叶片 RC/CS_0 ,相比对照下降了44.1%。

3 离体葡萄叶片D1蛋白周转对臭氧胁迫的防御作用

经过 O_3 胁迫后离体叶片的荧光变化和盆栽苗相似(表2),PSI的光化学效率 $Y(I)$ 和PSII的有效量子产率 $Y(II)$ 相比对照显著下降,分别下降了33.0%和50.1%,同时由供体侧限制引起的PSI处非光化

学能量耗散的量子产量 $Y(ND)$ 和非光化学淬灭的调节能量耗散的量子产率 $Y(NPQ)$ 相比对照显著上升,分别上升了27.3%和49.2%。

引入D1蛋白周转抑制剂Lin后, Lin+ O_3 处理与单纯 O_3 胁迫处理相比, F_m 和 F_v/F_m 有显著下降,分别下降了23.3%和19.7%,而 P_m 有所下降但无显著差异。 $Y(II)$ 显著下降了26.0%, $Y(NPQ)$ 显著下降了23.1%, $Y(NO)$ 显著升高了35.4%,但反映PSI性能的 $Y(I)$ 、 $Y(ND)$ 和 $Y(NA)$ 参数没有显著变化。引入抑制剂Lin后,导致Lin+ O_3 处理的 $Y(II)$ 值降到最低, O_3 胁迫的次之,对照 $Y(II)$ 值最高;相反, $Y(NPQ)$ 值以Lin+ O_3 处理值最高,对照 $Y(NPQ)$ 最低。

不同处理对葡萄叶片O-J-I-P曲线的影响不同。图4显示的是葡萄叶片O-J-I-P原始曲线的变化,可以看出 O_3 胁迫显著降低了葡萄的 F_m 值, Lin+ O_3 处理进一步降低了 F_m 值。

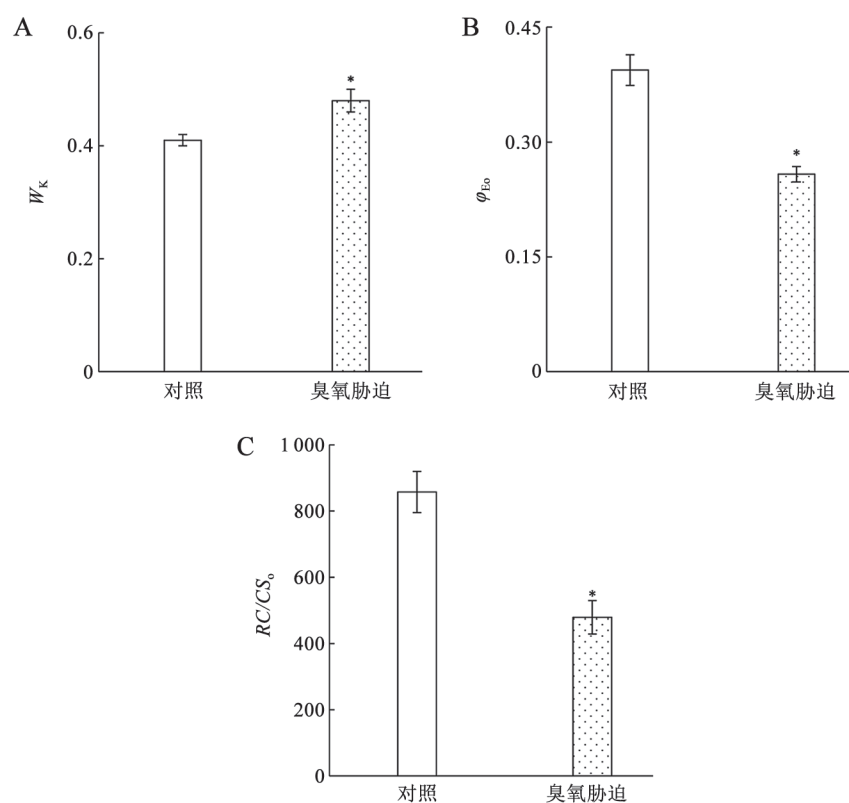
图3 臭氧胁迫对盆栽葡萄叶片 W_k 、 ϕ_{E_0} 和 RC/CS_0 的影响Fig.3 Effects of ozone stress on W_k , ϕ_{E_0} and RC/CS_0 of potted grape leaves

表2 D1蛋白周转抑制剂对臭氧胁迫下葡萄离体叶片荧光参数的影响

Table 2 Effects of D1 protein turnover inhibitor on fluorescence parameters of grape leaves *in vitro* under ozone stress

参数	对照	臭氧胁迫	林可霉素+臭氧胁迫
F_m	3.04±0.04 ^a	2.57±0.06 ^b	1.97±0.04 ^c
F_v/F_m	0.80±0.03 ^a	0.71±0.03 ^b	0.57±0.02 ^c
P_m	1.15±0.06 ^a	1.06±0.05 ^a	0.976±0.04 ^a
Y(I)	0.436±0.02 ^a	0.292±0.03 ^b	0.288±0.07 ^b
Y(ND)	0.488±0.01 ^b	0.621±0.03 ^a	0.652±0.02 ^a
Y(NA)	0.075±0.01 ^a	0.074±0.01 ^a	0.063±0.01 ^a
Y(II)	0.347±0.02 ^a	0.173±0.01 ^b	0.128±0.01 ^c
Y(NPQ)	0.392±0.01 ^c	0.585±0.05 ^a	0.450±0.03 ^b
Y(NO)	0.249±0.01 ^b	0.243±0.01 ^b	0.329±0.03 ^a

讨 论

前人研究表明, 光能过剩会导致光合器官发生光钝化, 引起光抑制, 而且在环境胁迫存在时会加剧光抑制发生(李志真等2014)。植物光合机构由光系统I (PSI)和光系统II (PSII)构成, 一般PSII被

认为是发生光抑制的原初部位(Gerganova等2016), 而PSI比较稳定, 一般不会受到影响。 F_v/F_m 的降低是光合作用光抑制的显著特征(Demmig-Adams和Adams 1992), 而 P_m 的高低反映了PSI活性(Huang等2017a)。O₃进入植物叶片后诱导产生的活性氧物质(ROS)增加, 叶绿体内活性氧的过量累积会抑制光抑制修复过程, 从而导致叶片光抑制发生(Mohanty等2007)。本研究表明, O₃胁迫下的葡萄叶片具有更低的 F_v/F_m 值, 但是相比对照叶片, P_m 值没有显著变化, 表明葡萄叶片在受到O₃胁迫后在相同的光照条件下PSII首先发生光抑制, 而PSI活性在该条件下没有受到影响。

PSII天线色素吸收光能有三个分路, PSII光化学反应所利用的能量Y(II)、PSII调节性能量耗散Y(NPQ)和非调节性能量耗散Y(NO), 分析吸收光能的分配将有利于了解植物叶片对吸收光能的处理策略(向芬等2014)。高Y(NPQ)表示叶片具有较高的可调控生理代谢, 如热耗散等形式耗散过剩的光能。本实验结果表明, O₃胁迫显著降低了Y(II),

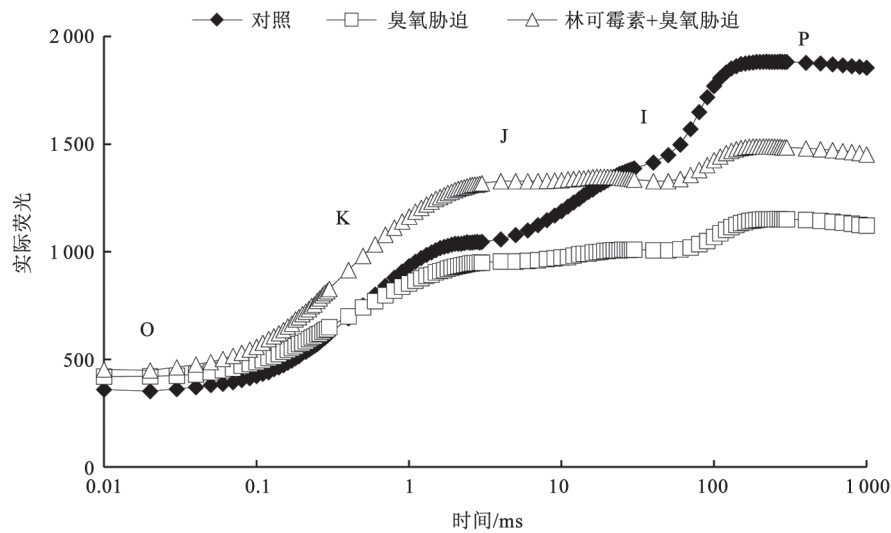


图4 D1蛋白周转抑制剂对臭氧胁迫下离体叶片快速叶绿素荧光诱导曲线的影响

Fig.4 Effects of D1 protein turnover inhibitor on rapid chlorophyll fluorescence induction curve *in vitro* leaves under ozone stress

同时Y(NPQ)显著上升,说明葡萄叶片提高了热耗散能量的比例来抵御过剩激发能的积累(Baker 2008),高Y(NO)值表示PSII光化学反应和保护性调节机制没有发挥作用,过量的激发能将对PSII产生光破坏。同时,伴随着O₃胁迫葡萄单位面积有活性反应中心数目(RC/CS₀)显著下降,电子受体侧发生伤害,线性电子链传递电子受阻后会引引起活性氧的积累,导致D1蛋白的修复过程受阻。反应中心吸收的光能用于电子传递的量子产额 ϕ_{E_0} 显著下降也说明PSII发生了光抑制。 W_k 经过O₃胁迫后有显著上升说明了放氧复合体受体侧受到一定伤害(罗海波等2010)。Y(NA)表示PSI电子受体侧限制引起的非光化学能量耗散的量子产量,是PSI光抑制的指标之一(Huang等2017b)。本实验结果表明,经过O₃胁迫后葡萄叶片Y(NA)没有显著变化,进一步说明O₃胁迫未对葡萄叶片PSI活性造成抑制(Takagi等2016)。

PSII的可逆失活一般不会造成D1的净降解,而发生不可逆破坏时,反应中心D1蛋白净含量减少(Keren等1997)。强光下,D1蛋白修复速率低于降解速率会累积光损伤,加剧光抑制程度(Tikkanen等2008)。引入Lin抑制葡萄叶片D1蛋白周转后,葡萄叶片在O₃胁迫下,Y(II)进一步下降,Y(NPQ)进一步上升,这表明D1蛋白的周转可以缓解PSII光抑制程度,而抑制D1蛋白周转导致O₃胁迫下葡萄叶片

发生更加严重光抑制。O-J-I-P曲线的变化也说明了这一点,O₃胁迫后反映PSII的电子传递状况的 F_m 值显著下降,引入Lin抑制D1蛋白周转后 F_m 值进一步下降(Lu和Zhang 1999),O₃胁迫和Lin+O₃处理均导致葡萄叶片O-J-I-P曲线出现较明显的K点和J点,表明臭氧协同胁迫导致葡萄叶片PSII反应中心受体侧伤害程度大于供体侧,而引入D1蛋白周转抑制剂Lin后加重了PSII反应中心的伤害(金立桥等2015)。Y(I)、Y(ND)和Y(NA)与O₃胁迫处理没有显著差异,表明葡萄叶片在PSII光抑制程度加重的情况下PSI没有受到进一步光抑制,这可能是由于PSII光抑制通过减少线性电子传递从而保护PSI免受破坏(Sonoike 2011)。

参考文献

- Aro EM, McCaffery S, Anderson JM (1994). Recovery from photoinhibition in peas (*Pisum sativum* L.) acclimated to varying growth irradiances (role of D1 protein turnover). *Plant Physiol*, 104 (3): 1033-1041
- Baker NR (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 89-113
- Cao J, Govindjee (1990). Chlorophyll a fluorescence transient as an indicator of active and inactive photosystem II in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1015 (2): 180-188
- Ciampi S, Castagna A, Ranieri A, Nali C, Lorenzini G, Soldatini GF (1997). CO₂ assimilation, xanthophyll cycle pigments and PSII efficiency in pumpkin plants as affected by ozone fumigation. *Physiol Plant*, 101 (4): 881-889

- Degl'Innocenti E, Guidi L, Soldatini GF (2007). Effects of elevated ozone on chlorophyll a fluorescence in symptomatic and asymptomatic leaves of two tomato genotypes. *Biol Plant*, 51 (2): 313–321
- Demmig-Adams B, Adams III WW (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 43: 599–626
- Geng QW, Xing H, Hao GM, Sun YJ, Zhai H, Du YP (2016). Effect of exogenous melatonin on photosynthesis of 'Cabernet Sauvignon' grape leaves under ozone stress. *Acta Horti Sin*, 43 (8): 1463–1472 (in Chinese with English abstract) [耿庆伟, 邢浩, 郝桂梅, 孙永江, 翟衡, 杜远鹏(2016). 外源褪黑素对臭氧胁迫下'赤霞珠'葡萄叶片光合作用的影响. *园艺学报*, 43 (8): 1463–1472]
- Gerganova M, Popova AV, Stanoeva D, Velitchkova M (2016). Tomato plants acclimate better to elevated temperature and high light than to treatment with each factor separately. *Plant Physiol Biochem*, 104: 234–241
- Godde D, Buchhold J (1992). Effect of long term fumigation with ozone on the turnover of the D-1 reaction center polypeptide of photosystem II in spruce (*Picea abies*). *Physiol Plant*, 86 (4): 568–574
- Huang W, Yang YJ, Zhang JL, Hu H, Zhang SB (2017a). Superoxide generated in the chloroplast stroma causes photoinhibition of photosystem I in the shade-establishing tree species *Psychotria henryi*. *Photosynth Res*, 132 (3): 293–303
- Huang W, Yang YJ, Zhang SB (2017b). Specific roles of cyclic electron flow around photosystem I in photosynthetic regulation in immature and mature leaves. *J Plant Physiol*, 209: 76–83
- 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]
- Keren N, Berg A, Van Kan PJ, Levanon H, Ohad I (1997). Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 (4): 1579–1584
- Klughhammer C, Schreiber U (1994). An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance changes at 830 nm. *Planta*, 192 (2): 261–268
- Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE (2004). New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth Res*, 79 (2): 209–218
- Li PM, Gao HY, Strasser RJ (2005). Application of the Fast Chlorophyll II fluorescence induction dynamics analysis in photosynthesis study. *J Plant Physiol Mol Biol*, 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. *植物生理与分子生物学报*, 31 (6): 559–566]
- Li ZZ, Liu DH, Zhao SW, Jiang CD, Shi L (2014). Mechanisms of photoinhibition induced by high light in *Hosta* grown outdoors. *Chin J Plant Ecol*, 38 (7): 720–728 (in Chinese with English abstract) [李志真, 刘东焕, 赵世伟, 姜闯道, 石雷(2014). 环境强光诱导玉簪叶片光抑制的机制. *植物生态学报*, 38 (7): 720–728]
- Lu C, Zhang J (1999). Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *J Exp Bot*, 50 (336): 1199–1206
- Luo HB, Ma L, Duan W, Li SH, Wang LJ (2010). Influence of heat stress on photosynthesis in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Sci Agric Sin*, 43 (13): 2744–2750 (in Chinese with English abstract) [罗海波, 马苓, 段伟, 李绍华, 王利军(2010). 高温胁迫对'赤霞珠'葡萄光合作用的影响. *中国农业科学*, 43 (13): 2744–2750]
- Mohanty P, Allakhverdiev SI, Murata N (2007). Application of low temperatures during photoinhibition allows characterization of individual steps in photodamage and the repair of photosystem II. *Photosynth Res*, 94 (2-3): 217–224
- Powles SB (1984). Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu Rev Plant Physiol*, 35: 15–44
- Sonoike K (2011). Photoinhibition of photosystem I. *Physiol Plant*, 142 (1): 56–64
- Sonoike K, Kamo M, Hihara Y, Hiyama T, Enami I (1997). The mechanism of the degradation of psbA gene product, one of the photosynthetic reaction center subunits of photosystem I, upon photoinhibition. *Photosynth Res*, 53 (1): 55–63
- Sun YJ, Wang JH, Geng QW, Xing H, Zhai H, Du YP (2015). Effects of different concentrations of ozone stress on photosynthetic system II in *Vitis vinifera* cv. 'Cabernet Sauvignon'. *Plant Physiol J*, 51 (11): 1947–1954 (in Chinese with English abstract) [孙永江, 王金欢, 耿庆伟, 邢浩, 翟衡, 杜远鹏(2015). 不同浓度臭氧处理对'赤霞珠'葡萄叶片光系统II功能的影响. *植物生理学报*, 51 (11): 1947–1954]
- Takagi D, Takumi S, Hashiguchi M, Sejima T, Miyake C (2016). Superoxide and singlet oxygen produced within the thylakoid membranes both cause photosystem I photoinhibition. *Plant Physiol*, 171 (3): 1626–1634
- Takahashi S, Badger MR (2011). Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci*, 16 (1): 53–60
- Tikkanen M, Nurmi M, Kangasjärvi S, Aro EM (2008). Core protein phosphorylation facilitates the repair of photodamaged photosystem II at high light. *Biochim Biophys Acta*, 1777 (11): 1432–1437
- Wahid A, Maggs R, Shamsi SR, Bell JN, Ashmore MR (1995). Effects of air pollution on rice yield in the Pakistan Punjab. *Environ Pollut*, 90 (3): 323–329
- Wang JH, Geng QW, Xing H, Sun YJ, Wang Y, Zhai H, Du YP (2016). Effects of shading on photosynthesis and reactive oxygen metabolism in *Vitis vinifera* 'Cabernet Sauvignon' leaves under ozone stress. *J Fruit Sci*, 33 (7): 823–831 (in Chinese with English abstract) [王金欢, 耿庆伟, 邢浩, 孙永江, 王杨, 翟衡, 杜远鹏(2016). 遮阴对臭氧胁迫下'赤霞珠'葡萄叶片光合功能及活性氧代谢的影响. *果树学报*, 33 (7): 823–831]
- Wang X, Manning W, Feng Z, Zhu Y (2007). Ground-level ozone in China: distribution and effects on crop yields. *Environ Pollut*,

- 147 (2): 394–400
- Xiang F, Zhou Q, Tian XR, Chen GX, Xiao Y (2014). Leaf morphology and PSII chlorophyll fluorescence parameters in leaves of *Sinosenecio jishouensis* in different habitats. *Acta Ecol Sin*, 34 (2): 337–344 (in Chinese with English abstract) [向芬, 周强, 田向荣, 陈功锡, 肖艳(2014). 不同生境吉首蒲儿根叶片形态和叶绿素荧光特征的比较. *生态学报*, 34 (2): 337–344]
- Zhang WW, Niu JF, Wang XK, Tian Y, Yao FF, Feng ZZ (2011). Effects of elevated ozone concentration on slash pine (*Pinus elliotii*) seedlings. *Environ Sci*, 32 (6): 1710–1716 (in Chinese with English abstract) [张巍巍, 牛俊峰, 王效科, 田媛, 姚芳芳, 冯兆忠(2011). 大气臭氧浓度增加对湿地松幼苗的影响. *环境科学*, 32 (6): 1710–1716]
- Zhang ZS, Zhang LT, Gao HY, Jia YJ, Bu JW, Meng QW (2009). Research of the photoinhibition of PSI and PSII in leaves of cucumber under chilling stress combined with different light intensities. *Sci Agric Sin*, 42 (12): 4288–4293 (in Chinese with English abstract) [张子山, 张立涛, 高辉远, 贾裕娇, 部建雯, 孟庆伟(2009). 不同光强与低温交叉胁迫下黄瓜PSI与PSII的光抑制研究. *中国农业科学*, 42 (12): 4288–4293]

Effects of ozone stress on the activity of photosystems and on the D1 protein turnover in grape leaves

XING Hao, HAO Gui-Mei, CHEN Zheng-Wen, SUN Yong-Jiang, ZHAI Heng, DU Yuan-Peng*

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

Abstract: In order to investigate the effect of ozone (O_3) stress on the inhibition of photosynthetic electron transport in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) leaves, the photosystem I (PSI) and PSII activities in leaves treated with O_3 stress were measured with P_{700} and chlorophyll fluorescence measuring system (Dual-PAM100). Furthermore, the role of D1 protein in protecting photosynthetic apparatus against photodamage was also studied by using the inhibitor and the chlorophyll fast fluorescence O-J-I-P transient. The results showed that the maximum fluorescence F_m and the maximum photochemical efficiency F_v/F_m were significantly decreased in leaves treated with O_3 stress, but the maximum P_{700} signal P_m did not change significantly. Analysis of chlorophyll fluorescence light response curve showed that the actual photochemical activity of leaf PSII [Y(II)] was significantly decreased under O_3 stress, but PSII excitation pressure ($1-qP$) and non-photochemical quenching (NPQ) increased significantly. O_3 stress also resulted in a significant increase of the yield of the non-photochemical energy dissipation caused by the confinement of the PSI donor side [Y(ND)], resulting in a decrease in the actual photochemical activity of the PSI [Y(I)]. The O-J-I-P test showed that O_3 stress significantly reduced the amount of light energy absorbed by the PSII reaction center for electron transport (ϕ_{E_0}) and the number of reaction centers centered on and activity per unit area (RC/CS_0). Lincmycin treatment further decreased the F_v/F_m and Y(II) in grape leaves treated with O_3 stress, which decreased by 28.8% and 63.1%, respectively, but there was no significant change in Y(I). These results suggested O_3 stress mainly inhibited the PSII activity and the inhibition of PSI electron donor side. The inhibition of D1 protein turnover caused serious damage to the PSII of the grape leaves under O_3 stress, but the PSI activity was not affected.

Key words: grape; ozone; D1 protein; electron transport; photoinhibition; photoprotection

Received 2017-06-16 Accepted 2017-09-08

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31572084), the China Agriculture Research System (Grant No. CARS-29-zp-02), the Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University Project (Grant No. IRT15R42) and Funds of Shandong "Double Tops" Program (Grant No. SYL2017YSTD10).

*Corresponding author (E-mail: duyuanpeng001@163.com).