

壳聚糖对低温处理下水稻剑叶光合特性的影响

孙磊^{1,2,3}, 陈国祥¹, 吕川根⁴, 程嘉翎^{2,3}

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046) (2 江苏科技大学蚕业研究所, 江苏 镇江 212003)
(3 中国农业科学院蚕业研究所, 江苏 镇江 212018) (4 江苏省农业科学院粮食作物研究所, 江苏 南京 210014)

[摘要] 研究了低温条件下外加壳聚糖对水稻剑叶叶绿体光合特性的影响. 结果表明: 低温条件下, 外加 0.5% 的壳聚糖处理能缓解低温对水稻剑叶的叶绿素含量的伤害的程度; PSI 和 PSII 电子传递活性、类囊体室温吸收光谱的主峰值, 且 F_0 、 qN 上升和 F_v/F_m 、 qP 下降的变化幅度均减小. 说明在低温处理导致过剩光能增加情况下, 喷洒壳聚糖可以利用不断增加的 qN 来进行耗散, 以维持叶片较高的光化学效率, 提高水稻抵抗低温胁迫的能力.

[关键词] 水稻剑叶, 低温, 壳聚糖, 类囊体膜, 光谱, 电子传递活性, 荧光参数

[中图分类号] S435.111.2 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)04-0075-05

Effects of Chitosan on Photosynthetic Characteristics of Flag Leaf in Rice Under Low Temperature

Sun Lei^{1,2,3}, Chen Guoxiang¹, Lü Chuangen⁴, Cheng Jialing^{2,3}

(1 School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)
(2 Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212003, China)
(3 The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China)
(4 Institute of Food & Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract This article studies the effect of exogenous chitosan on photosynthetic characteristics of flag leaf in rice under low temperature. The results showed that during chilling, 0.5% of chitosan in solution could mitigate the injury on chlorophyll content of flag leaf, electron transport activities of photosystems (PSI and PSII), absorption spectra. F_0 , qN increased and F_v/F_m , qP decreased, whereas the extents were less. The cultivar sprayed with chitosan increased the qN to dissipate superfluous solar energy absorbed and maintained the higher photosynthesis efficiency, which improved cold resistance of rice.

Key words flag leaf in rice, low temperature, chitosan, thylakoid membrane, spectra, electron transport activities, chlorophyll fluorescence parameter

水稻是喜温作物, 苗期和孕穗期是低温敏感期, 低温可对水稻代谢和生理造成不可逆伤害, 叶绿体水平上使膜透性增加, 叶绿素合成受抑制, 叶绿体结构遭到破坏, 导致光合能力下降等^[1], 进而影响产量. 因此筛选和研究能够提高水稻抗冷性的物质, 了解它们在抗冷过程中所起的作用, 探讨减轻低温危害的途径和方法在理论上和实践上都有重要意义. 近来一些研究表明, 壳聚糖及其衍生物能提高植物的抗冷性. 据报道, 壳聚糖具有促进植物生长, 提高低温下作物的发芽率^[2], 降低细胞膜透性及 MDA 的积累^[3], 还可以使植物中可溶性糖、游离脯氨酸含量增加, 使得幼苗在低温胁迫下冷害指数较小等优点^[4]. 目前, 有关壳聚糖抗冷性的生理研究仅限于抗氧化系统方面, 在细胞水平上对光能转化特性方面的研究还不多, 不足以全面阐明壳聚糖在生理方面的作用. 本试验以剑叶全展后的“两优培九”为材料, 探讨了低温下壳聚糖处理对水稻剑叶类囊体膜光合特性和叶绿素荧光参数的影响, 为水稻抗逆高产和高效栽培提供理论依据.

收稿日期: 2010-08-31

基金项目: 国家自然科学基金 (30270792)、教育部科学技术研究重点项目 (204049).

通讯联系人: 陈国祥, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物学. E-mail: gxchen@njnu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材料与实验设计

供试材料“两优培九”采自江苏农业科学院作物所的试验田中,采用常规的大田种植和水肥管理.待剑叶全展时(抽穗期),从大田连土移栽水稻置于 HP 1500GS-B 型全智能人工培养箱中进行低温处理,依据同实验室前期工作的基础上^[5],选择设置 25/15℃(昼夜平均温),白天给予光照 12 h,光强为 1 000 μmol/(m²·s),培养箱中湿度为(75±5)%,不断加入水分保持土壤水分与大田一致.于次日早晨 8 00 进行药剂处理:用冰醋酸溶解壳聚糖[β-(1,4)-2-氨基-2-脱氧-D-葡聚糖]后配制成 0.5% 浓度的溶液,并用盐酸调节 pH 至 5.5~6.5,在药剂里加入 2 滴吐温-40 后喷施叶面和叶背(叶片药剂欲滴为度),对照喷蒸馏水,隔 24 h 处理 1 次.低温处理 7 d 后取水稻叶片测定其光谱特性、电子传递活性和荧光参数,同时从大田里取未经低温处理的水稻剑叶作为常温对照,重复 3 次.每隔 1 周取 1 次样进行各项指标的测定,直到水稻剑叶枯死为止.

1.2 方 法

1.2.1 类囊体膜的制备

类囊体膜的制备参照 Dunahay 等^[6]所介绍的 B. B. Y 法,叶绿素浓度控制在 2 mg/mL 左右.

1.2.2 叶绿素含量的测定

参照 Amon^[7]方法,用岛津 UV-754 分光光度计分别在 665 nm、649 nm 和 470 nm 波长下比色测定鲜叶叶片叶绿素含量,单位为 mg/g

1.2.3 类囊体膜室温吸收光谱

用岛津 UV-754 型分光光度计测定 360 nm~780 nm 处 A 值,每隔 10 nm 测定一次,类囊体膜溶液的叶绿素浓度为 10 μg/mL

1.2.4 PSI 和 PSII 电子传递活性的测定

参照 Coombs 等^[8]的方法,采用 Chlorob-2(英国 Hansatech 公司)薄膜氧电极测定类囊体膜的 PSI 还原能力和 PSII 放氧活性,单位为 mol/(mg·min).

1.2.5 叶绿素荧光参数变化

采用 Handy PEA 便携式植物荧光仪(英国 Hansatech)和 FM S-2 脉冲调制式荧光仪(英国 Hansatech)测定叶绿素荧光动力学初始荧光、最大光化学效率、光化学淬灭和非光化学淬灭参数.

不同品种、处理时间之间的差异在 Microcal Origin (Version 7.0)上用单向方差分析(ANOVA)的方法在 P≤0.05 的水平上进行显著性检验.

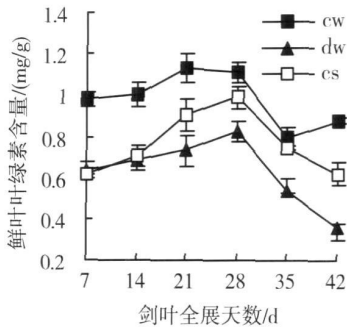
2 结果与分析

2.1 不同处理对水稻剑叶全展期叶绿素含量的变化

图 1 显示水稻剑叶全展后光合色素含量的变化.叶绿素含量随剑叶全展 7~42 d 呈先上升后下降的趋势.在剑叶全展 14 d 时,低温蒸馏水处理和低温壳聚糖处理的剑叶叶绿素含量分别是自然条件下的 63.27% 和 65.02%;到剑叶全展第 42 d 二者分别是常温对照的 41.13% 和 70.57%.2 个低温处理组均使叶绿素含量下降,其中以喷施壳聚糖处理组的降低幅度比低温对照组小.这暗示了壳聚糖能部分缓解低温对水稻叶片的伤害.

2.2 低温下壳聚糖处理对类囊体膜 PSI、PSII 电子传递活性的影响

从整体上看:PSI 电子传递活性在不同的处理组中都呈现下降趋势,在全展后第 21 d 3 个样品组的 PSI 电子传递活性急剧下降,低温对照的下降幅度明显比



注:cw 为自然条件;dw 为低温下喷施蒸馏水;
cs 为低温下喷施 0.5% 壳聚糖

图 1 剑叶全展后叶绿素含量的变化

Fig.1 Changes in chlorophyll after flag leaves exhibition

低温下壳聚糖处理的大,见图 2(a);而类囊体膜 PSII 电子传递活性的变化是一致的,即在剑叶全展 14 d 前上升比较平缓,此后开始急剧上升,并保持一段高峰期,然后呈现急剧下降.由图 2(b)可知,低温处理组 PSII 电子传递活性峰值明显的比常温对照组低,其中壳聚糖处理组下降幅度较小,在剑叶全展第 28 d 低温处理和低温下壳聚糖处理的 PSII 活性分别是常温对照的 82. 9% 和 95. 07% .

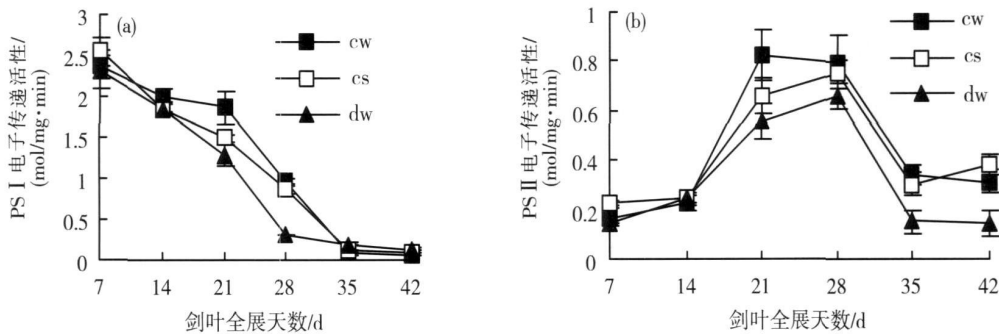
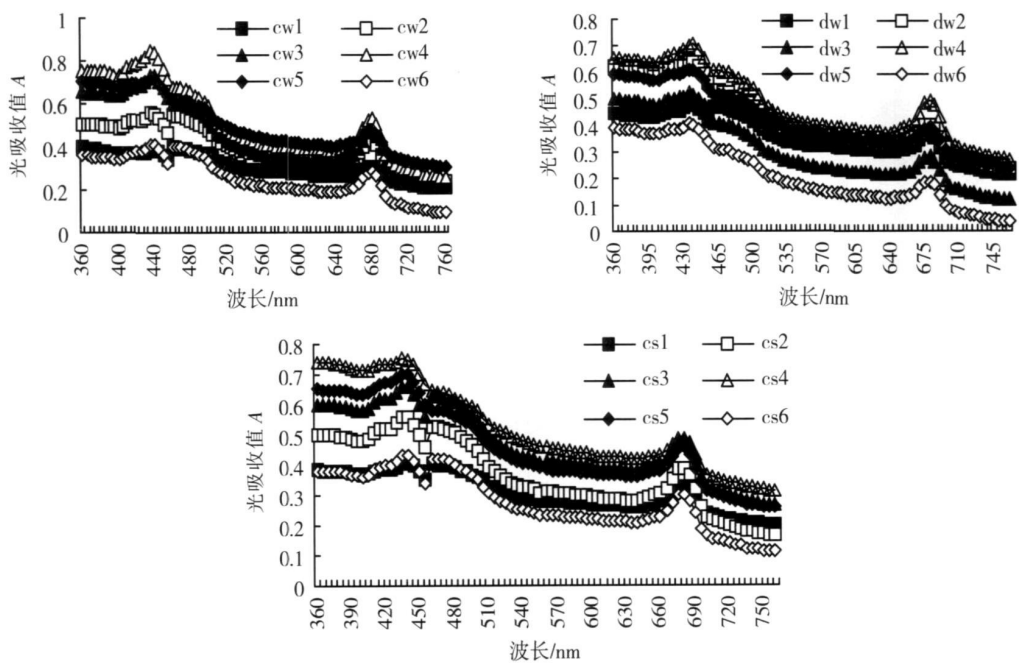


图 2 PS I 和 PS II 电子传递活性
Fig.2 The electron transport activities of PS I (a)and PS II (b)

2. 3 低温下壳聚糖处理对类囊体膜室温吸收光谱的影响

由图 3 可见,类囊体膜室温吸收光谱在蓝紫光区 (430 nm) 和红光区 (670 nm) 分别有两个明显的吸收峰,吸收光谱的变化可以反应出叶片对光能的吸收状况.在整个抽穗期中,3 个处理组的类囊体膜的室温吸收光谱峰值均是稍有上升,到剑叶全展 28 d 后,急剧下降.剑叶全展第 35 d 吸光光谱在蓝紫光的主峰处 (430 nm),低温下壳聚糖处理组和低温对照组的 A 值分别下降为常温对照的 90%、81%;而在红光的主峰处 (680 nm),分别下降为常温对照的 92%、84. 5%.就“两优培九”剑叶全展期的不同处理组而言,低温下壳聚糖处理水稻剑叶的类囊体膜的总体吸收水平要高于低温对照处理,与常温对照组比较接近.光能的吸收是植物体光合作用的基础,室温吸收光谱表示对光能的吸收能力.低温下壳聚糖处理能提高水稻的光合活性,维持较高的光合性能.



注:cw 为常温对照;dw 为蒸馏水喷施,低温胁迫;cs 为 0.5% 壳聚糖喷施,低温胁迫.标注 1、2、3、4、5、6 依次代表剑叶全展第 7、14、21、28、35、42 d

图 3 类囊体膜室温吸收光谱
Fig.3 The absorption spectra of thylakoid membranes at room temperature

2. 4 低温下壳聚糖处理对叶绿素荧光参数的影响

F_o 为初始荧光,是 PSII 反应中心全部开放状态时的荧光水平. F_v/F_m 常用来表示 PSII 最大光化学效

率. 低温引起 PSII 光化学效率 F_v/F_m 的下降, 这反映低温已经对 PSII 反应中心造成了光化学伤害^[9], 一般来说, 抗寒力弱的品种下降更明显. 2 个低温处理组的 F_o 均上升, F_v/F_m 比值均下降, 但低温对照组变化幅度比壳聚糖处理组明显较大, 且这种影响随着剑叶全展时间的延长愈来愈显著. 在剑叶全展第 28 d 低温处理的 F_v/F_m 较常温对照下降 28.4%; 低温下壳聚糖处理的下降 20.2%.

qP 是光化学淬灭, 反映的是被那天线色素吸收来并用以光合作用的能量部分. 由图 6(c) 可见, 剑叶全展第 7~21 d 低温胁迫对水稻 qP 影响较小 (和常温对照相比, 低温处理降低了 17.4%, 低温下壳聚糖处理降低了 12%); 剑叶全展第 28 d 低温对照组的 qP 较常温对照降低了 42.4%, 而低温下壳聚糖处理的降幅只有 17.7%.

qN 是非光化学淬灭. 不同低温处理组来看, 剑叶全展后, 低温胁迫均使水稻 qN 剑叶全展 7 d 时是上升的, 后期整体上都是下降的; 而后期 qN 下降过程中, 相对于低温对照组, 壳聚糖处理组使水稻 qN 处于上升趋势, 在剑叶全展 28 d 比低温对照增加了 35.2%, 差异显著 ($P = 0.022$ $Q P < 0.05$). 表明低温下壳聚糖处理使水稻剑叶非辐射能量的耗散有所增加, 促使水稻耗散过剩能量, 防御冷胁迫引起的光抑制.

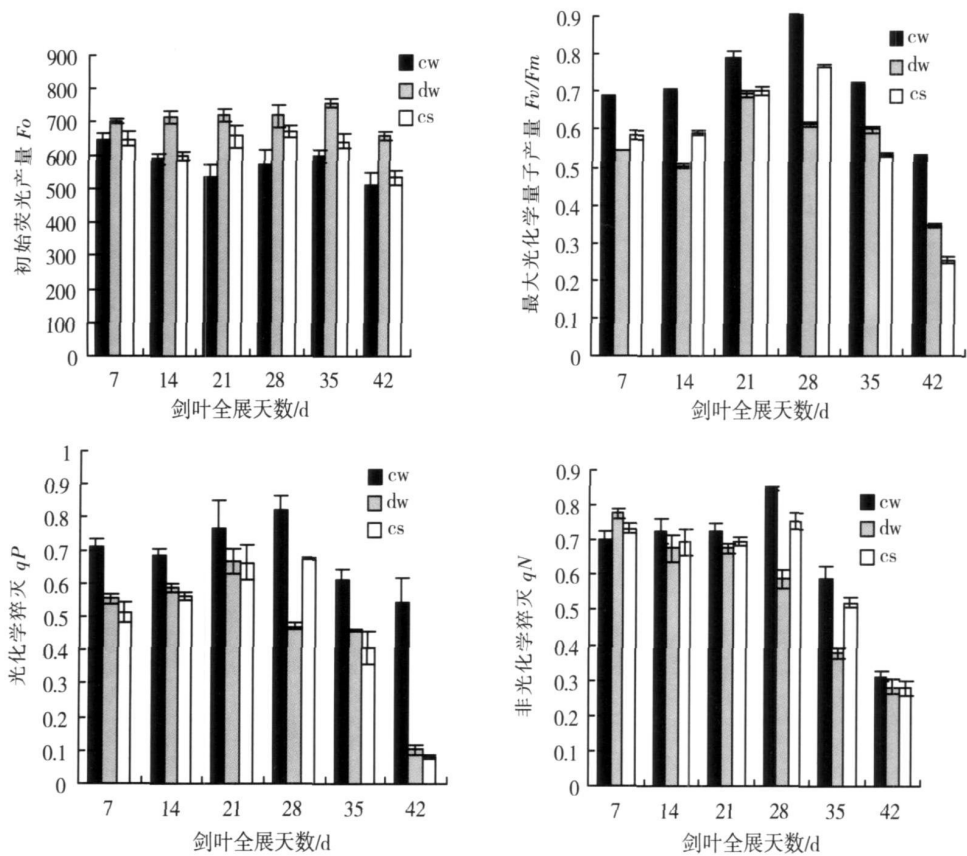


图 4 水稻初始荧光(a)、最大光化学效率(b)、光化学淬灭(c)和非光化学淬灭(d)随着剑叶生长的变化
Fig.4 The changes of F_o (a), F_v/F_m (b), qP (c) and qN (d) with the growth of flag leaves in rice

3 讨论

低温冷害引起水稻粮食减产是世界范围内普遍存在的问题, 而水稻产量的基础是光合作用. 因此, 如何缓解低温引起水稻光合功能下降的问题已经显得非常迫切. 本实验研究发现, 低温胁迫使得叶绿素含量下降, 冷胁迫下剑叶全展第 28 d 的叶绿素含量是常温对照的 65.02%; 而壳聚糖处理的水稻叶绿素含量是常温对照的 70.57%, 与低温对照组相比下降的幅度小, 水稻能保持较高的叶绿素含量, 表现出较高的光合优势, 这与罗兵^[10]的研究结果相一致.

光合作用的电子传递速率总是与光合磷酸化相偶联的, 较高的电子传递速率, 而且有利于形成更多的 $NADH^{[11]}$, 从而促进光合碳同化的进行和干物质的积累, 为高产稳产奠定良好的物质基础. 本实验结果可以看出, 常温下“两优培九”的 PSII 活性在剑叶全展后 28 d 达最高水平, 随后逐渐下降; 低温处理后,

PSI、PSII 活性均较常温对照有所下降, 其中 PSII 活性下降较 PSI 明显, 对低温更敏感. 低温下壳聚糖处理组的 PSII 活性降幅较低, 表现出较稳定的光合, 维持较高的光合效率. 水稻剑叶类囊体膜光谱分析为进一步考察低温胁迫对类囊体膜电子传递活性的变化. 由结果可以看出, 低温胁迫下水稻剑叶类囊体膜的蓝光区和红光区的最大吸收峰峰值比常温低, 表明叶绿素光能的吸收能力减弱, 到剑叶全展末期, 光谱峰值明显下降, 特别是低温处理的, 其吸收光谱几乎没有峰值, 这与王静等^[12]的研究结果相一致. 但喷洒壳聚糖的水稻叶片类囊体膜的总体光能吸收水平要高于低温对照组. 说明在低温逆境下壳聚糖处理能使叶绿素捕获光能有效激发的能力更强.

叶绿素荧光技术在许多种植物的抗寒性研究中发现, 低温对叶片 PSII 反应中心产生障碍或损害, 使其光能捕捉能力与光化学转化效率降低, 热耗散比例增高^[13, 14]. 在本试验中, 随着温度降低, 水稻叶片的 F_0 显著上升, 表明 PSII 反应中心失活, 已经受到低温胁迫的损害^[15], 导致光化学效率 F_v/F_m 显著下降, PSII 光合电子传递能力减弱, 很可能会影响光化学连锁反应, 使得用于光化学反应的光能部分显著减少, 从而形成过剩光能. 当大量过剩光能不能及时用于光化学反应时, 就能形成光抑制现象. 而低温下喷洒壳聚糖能维持较高的光化学效率和光合电子传递能力, 以及利用较高的 q_N 来进行耗散过剩激发, 能积极防御冷胁迫的伤害, 有效地避免或减轻因吸收而引起过多的光能的光抑制和光氧化, 从而保护 PSII^[16], 具有较强的抵抗能力.

综合以上, 经壳聚糖处理的低温下水稻具有较高的光合色素含量和电子传递链活性, 维持较高的光化学效率, 以及可能利用不断增加的 q_N 来进行耗散过剩激发能, 保护了类囊体膜系统, 减缓了低温对光合机构的破坏, 具有一定的缓解低温胁迫伤害的能力. 然而, 由于低温对水稻生理生化和光合作用的影响是多方面的, 壳聚糖对水稻的抗冷性影响的分子机理还需进一步探索分析.

[参考文献]

- [1] 王国莉, 郭振飞. 低温对水稻不同耐冷品种幼苗光合速率和叶绿素荧光参数的影响 [J]. 中国水稻科学, 2005, 19(4): 381-383.
- [2] 舒英杰, 时侠清, 张子学. 壳聚糖对黄瓜种子萌发及幼苗抗冷性的效应 [J]. 种子, 2007, 26(1): 22-24.
- [3] 李茂富, 李绍鹏, 赵维峰. 壳聚糖提高香蕉幼苗抗冷性的效应 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(4): 464-466.
- [4] 孙巧峰, 于贤昌, 高俊杰, 等. 羧甲基壳聚糖对黄瓜幼苗抗冷性的影响 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1 660-1 665.
- [5] 王静, 张成军, 陈国祥等. 低温对灌浆期水稻剑叶光合色素和类囊体膜脂肪酸的影响 [J]. 中国水稻科学, 2006, 20(2): 177-182.
- [6] Dunahay T G, Staehelin L A, Serbert M. Structural biochemical and biophysical characterization of four oxygen evolving photo system preparation from spinach [J]. BBA, 1984, 764: 179-193.
- [7] Amon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in Beta vulgaris L [J]. Plant Physiol, 1949, 24: 1-15.
- [8] Coombs J, Hall D O, Long S P, et al. Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis [M]. Oxford: Pergamon Press, 1985: 136-137.
- [9] 郭延平, 张良诚, 洪双松, 等. 温州蜜柑叶片气体交换和叶绿素荧光对低温的响应 [J]. 植物生理学报, 2000, 26(2): 88-94.
- [10] 罗兵, 孙海燕. 壳聚糖对黄瓜幼苗冷害损伤的缓解效应 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(26): 4 039-4 040.
- [11] Kranze G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis [J]. Plant Mol Biol, 1991, 42: 313-349.
- [12] 王静, 孙磊, 张成军, 等. 杂交稻幼苗期对低温胁迫的生理反应 [J]. 作物学报, 2006, 32(7): 1 049-1 056.
- [13] 蔡志全, 曹坤芳, 冯玉龙, 等. 夜间低温胁迫对两种生长光强下藤黄幼苗叶片荧光特征和活性氧代谢的影响 [J]. 应用生态学报, 2003, 14(3): 326-331.
- [14] Perks M P, Osborne B A, Mitchell D T. Rapid predictions of cold tolerance in Douglas-fir seedlings using chlorophyll fluorescence after freezing [J]. New Forests, 2004, 28(1): 49-62.
- [15] Demmig-Adams R, Adams W W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1992, 43: 599-626.
- [16] 吴雪霞, 陈建林, 查丁石. 低温胁迫对茄子幼苗叶片叶绿素荧光特性和能量耗散的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(1): 164-169.

[责任编辑: 孙德泉]