

低聚壳聚糖处理对低温胁迫下水稻 幼苗类囊体膜特性的影响

孙磊^{1 2 3}, 陈国祥¹, 程嘉翎^{2 3}, 吕川根⁴

(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] 以 0.1%、0.3%、0.5%、0.7% 4 种浓度的低聚壳聚糖处理两优培九水稻幼苗, 研究低聚壳聚糖对水稻幼苗抗冷性的影响。结果表明, 低聚壳聚糖可以增加水稻幼苗的抗冷性, 其中以 0.5% 的效果最好。低温下经低聚壳聚糖处理水稻幼苗类囊体膜的室内吸收光谱和发射光谱的主峰值、类囊体膜脂不饱和脂肪酸指数 (UFA)、PSI 和 PSII 电子传递活性、叶绿素含量均比低温对照高。低聚壳聚糖处理保护了类囊体膜系统, 减缓了低温对光合机构的破坏, 增强了水稻幼苗的抗冷性。

[关键词] 壳聚糖, 水稻幼苗, 低温, 类囊体膜, 脂肪酸, 电子传递活性

[中图分类号] S435.111.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2009)02-0093-05

Effects of Chitosan Treatment on Thylakoid Membrane Characters Characteristics in Rice Seedling Under Low Temperature

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

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(2. The Sericultural Research Institute, 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 The seedlings of rice Liang you pei jiu (*Oryza sativa* L.) were treated with 0.1%, 0.3%, 0.5% and 0.7% of chitosan for studying the effects of chitosan to change chilling-tolerance activity of rice. The chilling-tolerance of seedlings of rice could be increased with chitosan treatment. The concentration of chitosan at 0.5% showed the most effective. Under low temperature stress, chlorophyll content, absorption spectra, fluorescence spectra, composition of membrane lipid acids and electron transport activities of photosystems (PSI and PSII) and the index of unsaturated fatty acid (UFA) obtained higher activities. The results indicated that chitosan treatment improved cold resistance of rice seedlings, which protected the membrane system, alleviated the damage to photosynthetic organization under low temperature.

Key words chitosan, rice seedling, low temperature, thylakoid membrane, fatty acid, electron transport activities

壳聚糖是甲壳素的脱乙酰化产物, 甲壳素在自然界的合成量仅次于纤维素, 是地球上第二大可再生资源, 它是一种非常经济的化学物质。壳聚糖在农业上的应用至今尚未引起重视, 近年来的研究发现壳聚糖在黄瓜^[1 2]、辣椒^[3]、香蕉^[4]、草莓^[5]、玉米^[6]等植物抵御低温逆境胁迫上发挥作用, 能促进植物生长, 促进抗渗透物质的合成, 提高植物体抗氧化酶活性, 增强清除自由基的能力, 保护膜系统, 从而增强植物体的自身抗性^[7]。但是关于壳聚糖应用在水稻抗冷方面的研究还未见报道。低温冷害引起水稻 (*Oryza sativa* L.) 减产是世界范围内普遍存在的问题, 分布在不同地区的水稻品种在其生育期内常受到不同程度和不同类

收稿日期: 2008-08-05

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

型的低温危害^[8],特别是在我国南方双季稻地区,低温阴雨引起的早稻烂秧和晚稻生育后期“寒露风”造成的不正常结实都是亟待解决的问题.研究水稻的低温伤害机理及其抗寒性,对于稳定和提高水稻产量有着重大的现实意义.因此本试验试图从类囊体膜的层次上探讨低聚壳聚糖对水稻幼苗抗冷性影响的可能性机理,以期为生产应用提供理论和技术依据.

1 材料与方法

1.1 材料处理

供试的两优培九水稻种子由江苏省农科院水稻研究所提供.选择健壮饱满的种子,经消毒、漂洗、浸种、催芽,播种于盛有蛭石的白瓷盆中,用木村 B 培养液培养于 LRH-250-G 型培养箱.培养箱温度为 30℃/25℃(昼/夜),湿度为 (75±5)%,白天给予光照 12 h[1000 μmol/(m²·s)].待水稻长到 2 叶 1 心期时,将一个培养箱温度设为 (25℃/10℃)(昼/夜)作低温胁迫,于次日早晨 8:00 进行药剂处理:用冰醋酸溶解壳聚糖[聚 β-(1,4)-2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖]后配制成 0.1%、0.3%、0.5%、0.7% 不同浓度的溶液,并用盐酸调节 pH 至 5.5~6.5,在不同浓度药剂里加入 2 滴吐温-40 后喷施叶面和叶背(叶片药剂量欲滴为度),常温 and 低温对照喷蒸馏水.隔 24 h 处理 1 次,直至水稻长 4 叶 1 心期时采样,取倒数第 1 叶以测定各项生理指标,每次测定重复 3 次,取平均值进行分析和统计.

1.2 类囊体膜的制备

类囊体膜的制备参照 Dunahay 等^[9]所介绍的 B.B.Y 法加以改进.分别称取水稻叶片 11 g 洗净揩干,4℃下预冷,加入冷却的缓冲液 B₁冰浴研磨,4 层纱布过滤,滤液经 300 g 冷冻离心 2 min 上清液经 4000 g 冷冻离心 10 min 得破碎叶绿体沉淀.沉淀用缓冲液 B₂匀浆再离心获沉淀,再用 B₃匀浆即得类囊体膜悬浮液,叶绿素浓度控制在 2 mg/mL 左右.

1.3 叶绿素含量的测定

参照 Arnon^[10]方法,用 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.

1.4 类囊体膜室温吸收光谱

用 UV-754 型分光光度计测定 360 nm~780 nm 处 A 值,每隔 10 nm 测定 1 次,类囊体膜溶液的叶绿素浓度为 10 μg/mL.

1.5 类囊体膜荧光发射光谱的测定

室温条件下用岛津 RF-540 测定,激发光波长为 480 nm,狭缝 10 nm,类囊体膜溶液的叶绿素浓度为 4 μg/mL.

1.6 PSI 和 PSII 电子传递活性的测定

参照 Coombs 等^[11]的方法,采用 Chlorolab-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·h).

1.7 类囊体膜脂肪酸分析

参照俞红国和苏维埃方法^[12],甲酯化采用等体积的 0.4 mol/L KOH 的甲醇溶液和苯石油醚溶液(体积比为 1:1)处理,岛津 GC-17A 气相色谱仪分离脂肪酸,毛细管柱为 SP 2330(Supelco Inc),柱长 15 m,内径 0.32 mm,测定用柱温 165℃,进样和氢火焰检测器温度为 250℃,脂肪酸标准样品均购自 Sigma 公司.

2 结果与分析

2.1 低温下低聚壳聚糖处理对水稻幼苗叶绿素含量的影响

从图 1 可以看出,与常温对照相比,水稻幼苗在低温胁迫后叶片叶绿素含量均显著下降.低温处理组中,经低聚壳聚糖处理的幼苗叶绿素含量较低温对照高,其中 0.5% 壳聚糖处理的效果明显,与低温对照相比显著增加了 35.39% ($p < 0.05$).

2.2 低温下低聚壳聚糖处理对水稻幼苗类囊体膜室内吸收光谱的影响

由图 2 可见,类囊体膜室温吸收光谱在蓝光区(430 nm)和红光区(670 nm)分别有 2 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.低温处理的水稻幼苗类囊体膜吸收峰值呈规律性

降低: 其中未经壳聚糖处理水稻幼苗的吸收峰值最低, 是常温下的 62.89%; 用 0.5% 壳聚糖减缓室内吸收光谱降低的效果极显著, 为常温对照的 90.43%, 0.7% 的次之, 0.1% 的效果较差。

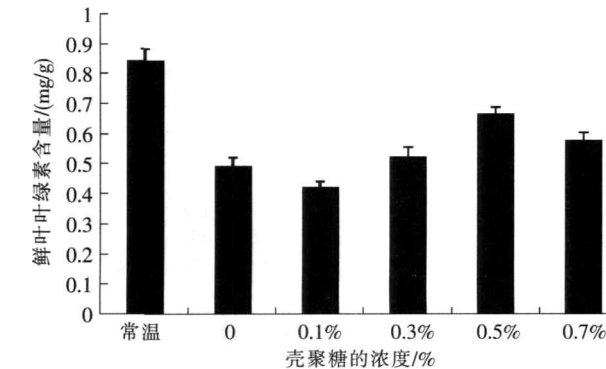


图 1 叶绿素含量的变化
Fig.1 Changes in chlorophyll contents

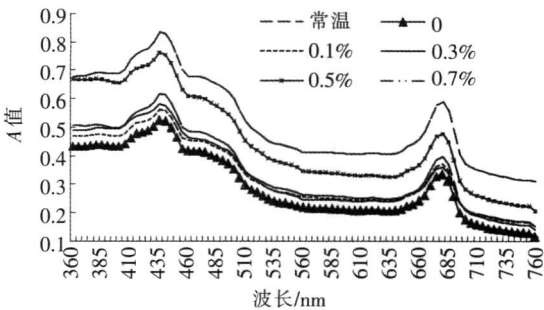


图 2 类囊体膜吸收光谱
Fig.2 Absorption spectra of thylakoid membranes at room-temperature

2.3 低温下低聚壳聚糖处理对水稻幼苗类囊体膜室内发射光谱的影响

水稻幼苗类囊体膜有 2 个荧光发射峰, 分别在 640 nm 和 720 nm 处. 其中 F_{640} 与 PSII 有关, 来源于 PSII 捕光色素蛋白复合体; 而 F_{720} 与 PSI 有关, 来源于 PSI 天线色素蛋白复合体^[13]. 由图 3 显示, 低温胁迫减弱了水稻类囊体膜室温荧光发射峰的强度, 不影响其位置. 这表明, 低温胁迫对 2 个光系统造成了一定程度的伤害. 其中经低聚壳聚糖处理的水稻幼苗的室温发射光谱主峰值比低温对照明显提高, 0.5% 和 0.7% 壳聚糖处理的效果好, 低于 0.5% 时, 其效果则随着浓度的降低而逐渐降低。

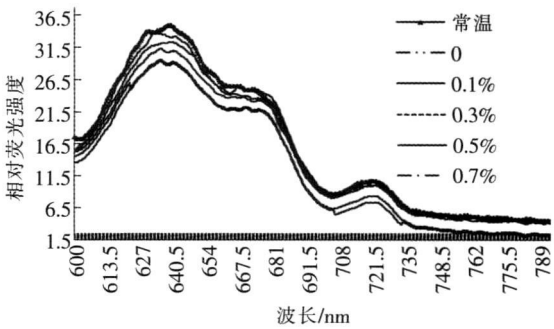


图 3 类囊体膜荧光发射光谱
Fig.3 Fluorescence spectra of thylakoid membranes

2.4 低温下低聚壳聚糖处理对水稻幼苗类囊体膜电子传递活性的影响

从图 4 可以看出, 水稻幼苗叶片在低温胁迫后 PSI 和 PSII 电子传递活性迅速降低, 但 PSI 的变化幅度较 PSII 明显; 而低聚壳聚糖处理可以减弱 PSI 和 PSII 电子传递活性的下降, 且以浓度为 0.5% 的处理效果最好, 其 PSI 和 PSII 电子传递活性分别较低温对照升高 48.9%、42.3%. 随着低聚壳聚糖浓度的增大反而效果不显著, 电子传递活性又急速下降, 与叶绿素含量的变化规律呈现一致性. 由此, 可以看出, 能够提高水稻幼苗抗冷性的适宜的浓度为 0.5%。

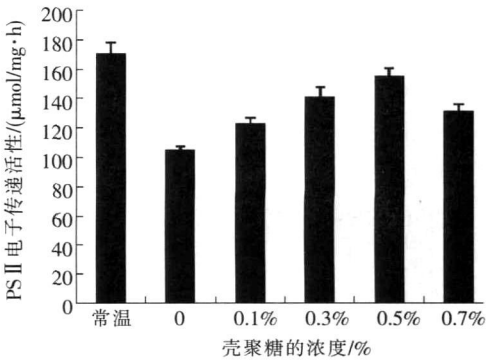
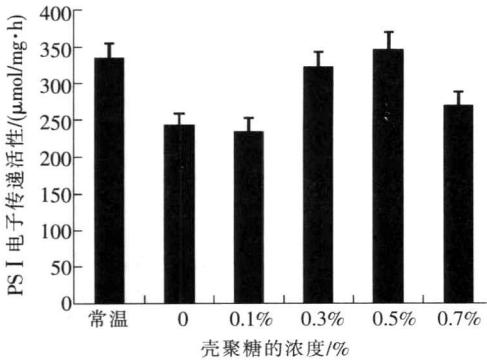


图 4 PS I 和 PS II 电子传递活性
Fig.4 The electron transport activities of PS I and PS II

2.5 低温下低壳聚糖处理对水稻幼苗类囊体膜脂脂肪酸成分的影响

水稻类囊体膜脂的脂酰基连有棕榈酸 (16:0)、硬脂酸 (18:0)、油酸 (18:1)、亚油酸 (18:2) 和亚麻酸 (18:3), 其他脂肪酸的含量极少. 由图 5 可见, 类囊体膜脂中饱和脂肪酸 (如棕榈酸 16:0 和硬脂酸 18:0)

与不饱和脂肪酸(如油酸 18:1,亚油酸 18:2和亚麻酸 18:3)在水稻幼苗中分别占 43.07% (摩尔分数,以下同)和 56.93%. 饱和脂肪酸中棕榈酸(16:0)含量较多,不饱和脂肪酸中亚麻酸(18:3)含量最高. 脂肪酸的不饱和度主要受棕榈酸和亚麻酸相对含量的影响,低温胁迫下水稻脂肪酸不饱和指数显著提高,当加入低聚壳聚糖时,所有浓度条件下的脂肪酸不饱和指数较低温对照明显地提高. 低温下经浓度为 0.3% 壳聚糖处理幼苗的 IUA 增加幅度最大,比常温对照增加了 44.5%,而比低温对照增加了 1.9%. 随着低聚壳聚糖浓度的增大,IUA 又急速下降.

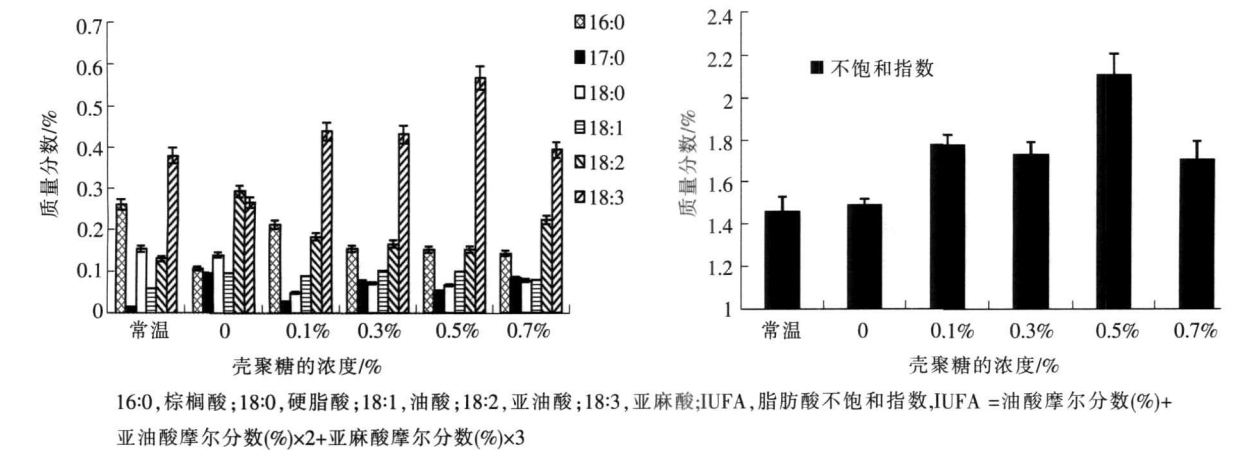


图 5 水稻幼苗类囊体膜脂脂肪酸组成和脂肪酸不饱和指数 (IUA) 的变化
Fig.5 Changes in fatty acids composition and IUA of thylakoid membrane lipids in wheat

3 讨论

目前人们主要通过遗传育种、分子生物学手段^[14]和冷锻炼等来提高植物的抗冷性. 在保护地生产中, 人们迫切需要一种简单的切实可行的方法来提高植物的抗冷能力, 因此研究和筛选能够提高植物抗冷性的物质, 了解它们在抗冷过程中所起的作用有重要的理论意义和应用价值.

本实验中, 低温胁迫后, 水稻幼苗叶绿素含量均降低, 光能的吸收转化受到影响, 低聚壳聚糖处理的水稻幼苗于低温对照相比, PSI 和 PSII 电子传递活性高. 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, 不仅有利于形成更多的 ATP, 而且有利于形成更多的 NADPH^[15], 从而促进光合碳同化的进行和干物质的积累. 因此低聚壳聚糖处理能减缓水稻幼苗叶绿素含量下降, 从而保持较高的 PSI 和 PSII 电子传递活性 ($R_{PSI}^2 = 0.7491$, $R_{PSII}^2 = 0.5675$, $P \leq 0.05$), 表现出较强的光合优势, 维持较高的光合效率. 水稻幼苗叶片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, 结果显示: 低温胁迫后, 水稻幼苗的蓝光区和红光区的最大吸收峰峰值变小, 表明叶绿素光能的吸收能力减弱. 低聚壳聚糖处理的水稻类囊体膜的总体吸收水平要高于低温对照, 这可能是其高光效的生理基础之一; 叶绿素荧光光谱特性可反映周围环境条件影响下膜结构的能量转化状态, 低温处理后, 类囊体膜室温荧光发射峰的位置不受影响, 但是其主峰值下降, PSII 的荧光发射峰的强度减弱, 这表明低温胁迫对 PSII 造成了一定程度的伤害. 经低聚壳聚糖处理的 PSII 的荧光发射峰的强度较高, 说明在低温逆境下低聚壳聚糖处理能使叶绿素捕获光能有效激发的能力更强.

低温可改变桑树、假山毛榉、水稻、番茄、南瓜等^[16-20]质膜脂肪酸的组成比例, 诱导不饱和脂肪酸比例提高, 增加不饱和脂肪酸含量(如亚油酸和亚麻酸). 植物不饱和脂肪酸含量, 特别是不饱和程度高的脂肪酸含量与其耐寒性呈正相关. 经低聚壳聚糖处理的幼苗与低温对照相比, 类囊体膜脂不饱和脂肪酸含量增加, 饱和脂肪酸含量下降, 导致膜脂不饱和指数 (IUA) 上升, 从而提高了水稻幼苗的抗冷性. 这与前人的研究结果一致^[16-20]. 类囊体膜由双层脂类构成, 它为膜蛋白提供行使功能的框架, 因此 IUA 降低可能减慢了重新合成的 D1 蛋白装配到 PSII 反应中心的速率^[21], 引起 PSII 反应中心的光化学功能减弱. 数据显示类囊体膜脂 IUA 变化和 PSII 电子传递活性的变化成显著正相关性 ($R^2 = 0.9091$, $P \leq 0.05$). 因此改变了膜脂的不饱和脂肪酸指数也就可能影响了膜上蛋白的功能, 对光合功能如类囊体膜上光化学和电子传递反应产生重要的影响, 这与前人的研究结果一致^[22-23]. 据此, 膜脂 IUA 较高水稻幼苗类囊体膜在低温

下有较高的光合活性, 受伤的程度较小, 说明低聚壳聚糖处理能提高水稻幼苗对低温胁迫的抗性。

只有适宜浓度的低聚壳聚糖处理才能明显增加水稻幼苗的抗冷性。在本试验中, 0.1%、0.3%、0.5% 等 4 个浓度的壳聚糖处理不同程度地提高了水稻幼苗的抗冷性, 其中以 0.5% 的效果最明显。

总之, 我们认为低聚壳聚糖能维持低温下水稻幼苗光合机构的正常功能来增强抗冷性。但是壳聚糖到底是作为信号物质来诱导与抗冷性有关酶 (包括冷响应蛋白) 的基因表达, 还是直接作用于细胞膜系统, 抑或是通过其它作用机理提高水稻幼苗的抗冷性, 需进一步进行探索和分析。

[参考文献]

- [1] 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(16): 4 039-4 040.
- [2] 薛国希, 高辉远, 李鹏民. 低温下壳聚糖处理对黄瓜幼苗生理生化特性的影响 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(4): 441-448.
- [3] 郁继华, 闰晓花, 张洁宝, 等. 壳聚糖对低温胁迫下辣椒幼苗活性氧产生和保护酶活性的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(4): 725-726.
- [4] 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.
- [5] 樊国华, 金芳. 壳聚糖和水杨酸对低温胁迫下草莓抗寒性的影响 [J]. 甘肃农业大学学报, 2008, 43(2): 83-86.
- [6] 周天, 胡永军, 姜坤, 等. 壳聚糖对玉米种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. 吉林农业科学, 2004, 29(3): 8-10.
- [7] 罗兵, 孙海燕, 徐朗莱, 等. 壳聚糖及其衍生物对植物抗性生理的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(29): 9 171-9 17
- [8] 刘鸿先. 植物对逆温的抵御能力与地热资源利用 [J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(4): 304-305.
- [9] 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(2): 179-1193.
- [10] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts Polyphenol oxidase in Beta vulgaris L [J]. Plant Physiol 1949, 24(1): 1-15.
- [11] Coombs J, Hall D O, Long S P, et al. Techniques in bioproductivity and photosynthesis [M]. Oxford: Pergamon Press, 1985, 136-137.
- [12] 俞红国, 苏维埃. PSII 膜脂肪酸的脱饱和与黄瓜低温光抑制关系的研究 [J]. 生物物理学报, 1996, 12(2): 227-233.
- [13] Kuang T Y, Argyroudi A, Koyunoglu J H, Nakatani H Y, et al. The origin of long fluorescence emission band (77K) from photosystem I [J]. Arch Biochem Biophys, 1984, 235(2): 618-627.
- [14] Gilmore S J, Sebolt A M, Salazar M P, et al. Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator in rice multiple biochemical changes associated with cold acclimation [J]. Plant Physiology, 2000, 124(4): 1 854-1 865.
- [15] 王仁雷, 华春. 杂交稻汕优 63 剑叶光合特性的研究 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2001, 24(4): 111-115.
- [16] Yoshida S. Chemical and biophysical changes in the plasma membrane during cold acclimation of mulberry bark cells (Morus bombycis Koiz. Cv. Goroji) [J]. Plant Physiol 1984, 76(1): 257-265.
- [17] Lag M A. Lipid composition of chloroplasts from cold-acclimation and non-acclimation Nothofagus dombeyi [J]. Phytochemistry, 1991, 30(3): 763-768.
- [18] Kasano K. Low temperature-induced changes in the thermotropic properties and fatty acid composition of the plasma membrane and tonoplast of cultured rice (Oryza sativa L.) cells [J]. Plant Cell Physiol, 1992, 33(5): 609-616.
- [19] 王孝宣, 李树德, 东惠茹, 等. 低温胁迫对番茄苗期和开花期脂肪酸的影响 [J]. 园艺学报, 1997, 24(2): 161-164.
- [20] Xu Y. Low temperature treatments induce an increase in the relative content of both linolenic and Δ^3 -trans-hexadecenoic acids in thylakoid membrane phosphatidylglycerol of squash cotyledons [J]. Plant Cell Physiol, 1997, 38(5): 611-618.
- [21] Vijayan P, Browse J. Photoinhibition in mutants of Arabidopsis deficient in thylakoid unsaturation [J]. Plant Physiol, 2002, 129(2): 876-885.
- [22] Gombos Z, Wada H, Murata N. The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids a mechanism of chilling tolerance [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(19): 8 787-8 791.
- [23] Vijayan P, Browse J. Photoinhibition in mutants of Arabidopsis deficient in thylakoid unsaturation [J]. Plant Physiol, 2002, 129(2): 876-885.

[责任编辑: 孙德泉]