

无机盐混合试剂与 γ -PGA 复合处理 对早稻苗期耐冷性的引发和分子效应分析

张言芳¹, 周慧梅¹, 蔡克桐², 朱安婷¹, 谢国生^{1*}

(1.农业部长江中游作物生理生态与耕作重点实验室/华中农业大学植物科技学院, 武汉 430070; 2.咸宁市农业科学院, 湖北 咸宁 437000)

摘要:以冷敏感早稻品种华矮 21 为材料, 利用 CaCl_2 、无机盐混合试剂、水杨酸(SA)和茉莉酸(JA)分别与 γ -PGA 组合引发水稻种子 36 h, 研究了在水培条件下生长 7 d 的水稻幼苗在 6 °C 低温处理 2 d 和常温恢复生长 3 d 的生长表现和生理特性。结果表明, 在低温胁迫下, 不同复合引发剂引发处理水稻种子可以提高幼苗的耐冷性, 可溶性糖增加, MDA 含量降低, APX 和 SOD 酶活性明显增强。综合生长与生理指标的表现可以看出, 无机盐混合试剂与 γ -PGA 复合引发处理的效果最好。利用 RT-PCR 方法检测 6 个低温响应基因经此复合引发处理后的水稻幼苗在受低温处理后转录水平变化。结果表明, 在低温胁迫下, *OsICE1* 基因转录水平无变化, 其他 5 个低温响应基因的转录明显增强, 其中 *OsDREB1B* 和 *OsCDPK7* 基因受无机盐混合试剂与 γ -PGA 复合引发处理的诱导表达, *OsMYBS3* 和 *OsFAE2* 基因表达不受种子引发处理的影响, *OsLIP19* 基因的表达受到了一定程度的抑制。这揭示无机盐混合试剂与 γ -PGA 复合引发处理可能通过增强水稻低温信号传导转录途径 *ICE1-DREB1B* 的表达而提高水稻的耐冷性。这些结果为复合型 γ -PGA 种子引发处理在提高早稻耐冷性中的应用提供了理论依据。

关键词:早稻; 苗期冷害; γ -PGA; 种子引发; RT-PCR

中图分类号: Q945 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)12-2323-08 doi:10.11654/jaes.2013.12.003

Induction and Its Molecular Mechanisms of Chilling Tolerances of Early Rice Seedlings with Inorganic Salts and γ -Polyglutamic Acid

ZHANG Yan-fang¹, ZHOU Hui-mei¹, CAI Ke-tong², ZHU An-ting¹, XIE Guo-sheng^{1*}

(1. MOA Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in the Middle Reaches of the Yangtze River, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Xianning Academy of Agricultural Sciences of Hubei Province, Xianning 437000, Hubei, China)

Abstract: Improving chilling tolerance of early rice is important for alleviation of chilling injury to early rice seedlings. Seeds of early rice Hua'ai 21, a chilling-sensitive variety, were first subjected to treatments for 36 h with CaCl_2 , inorganic salt mixture, salicylic acid(SA) and jasmonic acid(JA) in combination with γ -polyglutamic acid(PGA), respectively. The seedlings of seven-day old were then grown under chilling(6 °C) for 2 days followed by 25 °C for 3 days. Their growth and physiological characteristics were studied in hydroponic conditions. Seed treatments with different chemical compounds improved seedling tolerance to chilling stress, and increased soluble sugar contents and APX and SOD activities, but decreased MDA contents with the greatest effects observed in the treatment with inorganic salt mixture in combination with γ -PGA. Under chilling stress, the transcription level of *OsICE1* gene did not change, whereas that of other 5 cold-responsive marker genes was enhanced. Inorganic salt mixture in combination of γ -PGA induced genes *OsDREB1B* and *OsCDPK7* expression, but, inhibited *OsLIP19* gene expression. It is concluded that seed treatment with inorganic salt mixture combined with γ -PGA could enhance the chilling tolerance of early rice seedlings.

Keywords: early rice; chilling stress; γ -polyglutamic acid; seed treatment; RT-PCR

收稿日期: 2013-05-09

基金项目: 湖北省重大科技专项(ZND0017); 中央高校基本科研业务费专项资金(2012MBDX008)

作者简介: 张言芳(1988—), 女, 河南新乡人, 硕士研究生, 研究方向为水稻逆境分子生物学。E-mail: yanfang604@webmail.hzau.edu.cn

周慧梅与张言芳对本文同等贡献。

* 通信作者: 谢国生 E-mail: xiegsh@mail.hzau.edu.cn

水稻是一种起源于热带和亚热带地区的喜温作物。早籼稻品种比粳稻对 0~15 °C 的低温更敏感^[1]。在长江中下游地区,早稻直播遭遇“倒春寒”(早春低温)时,导致僵苗,叶色暗绿,上部叶片呈现渍状病斑,生长停滞,严重的引起死苗烂秧,还可能造成低温综合症^[2]。近年来,随着我国早稻直播面积的扩大,如何利用种子引发等化学调控技术减缓早春低温对早稻幼苗伤害已成为农业生产中关注的重要问题之一。

目前,种子引发剂,包括有机大分子如 PEG、无机小分子成分如 Ca^{2+} 、 NO_3^- 和 H_2PO_4^- 以及植物生长调节剂等,在提高农作物种子活力、促进发芽和幼苗生长等方面得到了广泛应用^[3]。例如:25%PEG-6000 在 25 °C 下预处理 48 h 可以明显提高早稻种子活力和抗寒能力^[4]; Ca^{2+} 浸种处理可以提高水稻和玉米幼苗的抗冷性^[5-6]; 外施 SA 和 JA 可以促进水稻和玉米种子在低温下的萌发^[7-10]。利用两种或两种以上的化学药剂配置的组合引发剂,如 KNO_3 、 Na_2HPO_4 和 KH_2PO_4 按 1:1:1 比例组合成抗寒剂处理水稻种子或喷施幼苗,可以减轻早春寒害对水稻幼苗的损伤^[11]。而且,混合盐类(-0.73 MPa)引发处理使水稻在低温和高盐条件下种子活力和幼苗生长较对照表现出明显优势^[12]。

作为一种新的环境友好型生物大分子,聚 γ -谷氨酸(γ -PGA, γ -polyglutamic acid)是由微生物发酵产生的一种 γ -谷氨酸链状高聚物,它富含侧链羧基,具有无毒、无害、易降解和无残留等特性,还具有高吸水保水性,螯合多种无机离子等功能^[13]。 γ -PGA 浸种处理可以提高烟草的种子活力和发芽率,缩短出苗时间,提高种子淀粉酶和过氧化物酶的活性^[14]; γ -PGA 浸种处理可以提高水稻的耐干旱和渗透调节能力^[15]。然而,未见 γ -PGA 与上述种子引发剂复合处理提高水稻耐冷性及其作用机制的报道。反向遗传学的研究表明,在低温胁迫下,转录激活基因 *OsICE1* 基因激活 *OsDREB1B* 基因表达,通过调控下游基因 *OsCDPK7* 等的转录来增强水稻的耐冷性^[16-17],钙依赖蛋白激酶基因 *OsCDPK7* 超表达可以提高水稻幼苗的耐冷性^[18],转录因子 *OsMYBS3* 和 *OsLIP19* 基因参与了水稻不依赖于 *ICE1-DREB1B* 转录调控途径的耐冷性调控^[19-21]。为此,本试验以早稻华矮 21 为材料,研究不同试剂与 γ -PGA 复合引发处理对水稻幼苗在 6 °C 低温处理下幼苗生长和生理活性的影响,初步探讨了无机盐混合试剂和 γ -PGA 复合型引发剂影响水稻幼苗耐冷性的分子机制,为化学调控提高水稻耐冷性提供新策略和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

对低温敏感的早稻品种华矮 21。

1.2 单一引发剂的种子处理

将水稻种子在 75%乙醇中浸泡 2 min 后,再用 2.5%次氯酸钠溶液浸泡并不断摇动 20 min。随后,用蒸馏水反复冲洗至无味。蒸馏水浸种 12 h 后,试剂引发 36 h 后水培。在蒸馏水中继续浸种 2 d。随后,均匀播入与塑料盒子配套的聚乙烯网格中水培,3 d 换 1 次培养液或蒸馏水。不同种子引发剂处理 3 盆,分别为:①氯化钙处理:0.55 g·L⁻¹ CaCl_2 ;②无机盐混合试剂(MR):5 g·L⁻¹ KNO_3 +2 g·L⁻¹ Na_2HPO_4 +2 g·L⁻¹ KH_2PO_4 ;③水杨酸(SA)处理:0.069 g·L⁻¹ SA;④茉莉酸(JA)处理:2.1 mg·L⁻¹ JA;⑤聚 γ -谷氨酸(γ -PGA)处理:0.1 g·L⁻¹ γ -PGA。并设置两个对照处理:⑥低温对照:未进行种子引发处理的幼苗进行低温处理;⑦常温对照:未进行种子引发处理的幼苗一直在常温下生长。水培培养条件为昼 28 °C/夜 26 °C,12 h 光照/12 h 黑暗,相对湿度 70%。水稻幼苗生长 7 d 达到一叶一心期,在 6 °C 低温下处理 2 d、25 °C 下恢复培养 3 d。在低温处理第 0 d 和恢复生长后第 3 d 取样(分别标记为 0 d 和 R3 d)测定水稻幼苗生长指标的变化。

1.3 最佳复合引发剂的种子处理筛选

将水稻种子在 75%乙醇中浸泡 2 min 后,2.5%次氯酸钠溶液处理并不断摇动 20 min,蒸馏水反复冲洗至无味。在蒸馏水中浸种 12 h 后,将上述 4 种单一种子引发试剂分别与 0.1 g·L⁻¹ γ -PGA 复合处理,分别简写为:① CaCl_2 +P:0.55 g·L⁻¹ CaCl_2 +0.1 g·L⁻¹ γ -PGA;②MR+P:(5 g·L⁻¹ KNO_3 +2 g·L⁻¹ Na_2HPO_4 +2 g·L⁻¹ KH_2PO_4)+0.1 g·L⁻¹ γ -PGA;③SA+P:69 mg·L⁻¹ SA+0.1 g·L⁻¹ γ -PGA;④JA+P:2.1 mg·L⁻¹ JA+0.1 g·L⁻¹ γ -PGA;⑤CK-1(低温对照,同上);⑥CK-2(常温对照,同上)。引发处理 36 h 后,在蒸馏水中继续浸种 2 d。随后,均匀播入与塑料盒子配套的聚乙烯网格中水培,3 d 换 1 次蒸馏水。人工培养箱培养条件为:昼 28 °C/夜 26 °C,12 h 光照/12 h 黑暗,相对湿度 70%。每个处理重复 3 次。每个处理的水稻幼苗生长 7 d 后,6 °C 低温处理 2 d 和 25 °C 恢复培养 3 d。在低温胁迫第 0 d、1 d、2 d 和恢复后第 3 d 取样分别标记为 0 d、1 d、2 d 和 R3 d,并进行相应指标的测定。

1.4 幼苗鲜重和生理指标的测定

每个处理随机取样 10 株,用吸水纸擦干植株表面

水分,用电子天平称芽重和根重。每处理重复 3 次。

可溶性糖和 MDA 含量的测定参考王学奎等^[21]的方法;APX 和 SOD 酶活性分别参考 Chao 等^[22]和 Shah 等^[23]方法进行测定。

1.5 无机盐混合试剂与 γ -PGA 复合处理下基因表达的 RT-PCR 检测

在上述试验基础上,选择种子引发效果最佳的无机盐混合试剂与 γ -PGA 复合处理的水稻幼苗,研究其对水稻低温逆境响应基因表达的分子效应。3 种处理分别为:①无机盐混合试剂与 γ -PGA 复合处理;② γ -PGA 单一引发处理;③未进行种子引发处理的低温对照(CK)。各处理的浓度与时间同上。水稻幼苗在 6℃低温胁迫后 0、12、24 h 和 48 h,分别提取水稻幼芽的总 RNA,逆转录合成 cDNA 第一条链,利用半定量 RT-PCR 检测水稻低温响应 marker 基因转录水平的差异。3 种处理对应泳道分别为:无机盐混合试剂与 γ -PGA 复合处理(泳道 1、2、3、4)、 γ -PGA 单一引发处理(泳道 5、6、7、8)和未进行种子引发处理的低温对照(泳道 9、10、11 和 12)。检测 RNA 纯度的方法:200 ng 总 RNA 在 1%琼脂糖凝胶 150 V 下电泳 20 min,EB 染液染色 15 min 后,在紫外灯下照相。

6 个水稻低温响应基因的引物如下:

OsICE1 (AK064946): Forward primer: 5'-GTCGT CATTGCCTCCAACAC-3' 和 Reverse primer: 5'-TTCCT GAGCTACTCTGTCCTTTG-3'; *OsDREB1B* (AK062422): Forward primer: 5'-CCAACG ATGGCGACGAAG-3' 和 Reverse primer: 5'-TCACAAAAGGAGGGAGAAATCTG-3'; *OsMYB3* (AK101062): Forward primer: 5'-CAGA AAG ATG AAG ATGGTCCTG-3' 和 Reverse primer: 5'-TGATACAGACTACGGAGAACGG-3'; *OsCDPK7* (AK066495): Forward primer: 5'-CGGACGAAGAACAATGA GAAA-3' 和 Reverse primer: 5'-CAATTACACCCAAC ACAGCCAG-3'; *OsFAE2* (AK067907): Forward primer: 5'-ATGAAGAACGTCAAGCCCTAC-3', Reverse primer: 5'-CATCCACCTAACAAAAGTGCC-3'; *OsLIP19* (AK065180): Forward primer: 5'-GACGCCTTCCAGTTCTGAG-3' 和 Reverse primer: 5'-CATCACATCACAAACCAG CAC-3'。

1.6 数据处理

数据分析采用 SPSS 17.0 软件处理分析。多重比较采用新复极差法 ($P<0.05$),比较结果的显著性差异用小写英文字母表示。采用 Excel 软件作图。

2 结果与分析

2.1 单一种子引发剂处理对低温胁迫下水稻幼苗生长的影响

我们前期的研究表明, γ -PGA 浸种处理可以提高水稻的耐干旱和渗透调节能力^[15]。因此,我们比较了不同单一种子引发剂处理后水稻幼苗在低温处理下的生长状况。表 1 结果表明,一叶一心期水稻幼苗在 6℃低温处理 2 d 和 25℃恢复培养 3 d 后,其芽长、根长、芽鲜重和根鲜重较常温对照明显下降,说明低温胁迫使幼苗生长受到明显的抑制。但是, CaCl_2 、混合试剂、SA、JA 和 γ -PGA 进行种子引发后,水稻幼苗在低温下的生长形态指标较未进行种子引发处理的都有明显提高。0.55 g·L⁻¹ CaCl_2 处理的水稻幼苗根长显著高于低温对照,恢复 3 d 后的芽鲜重和根鲜重分别较低温对照提高了 19.0% 和 5.7%。无机盐混合试剂处理与 0.069 g·L⁻¹ SA 引发处理后,水稻幼苗在低温处理后的根重和芽重均明显高于低温对照。2.1 mg·L⁻¹ JA 引发处理的水稻幼苗在低温处理后的芽长和芽鲜重也明显高于低温对照。 γ -PGA 引发处理的水稻幼苗芽长、根长和低温处理恢复后的芽鲜重均高于低温对照,但其根重与对照相比差异不显著。这表明各种单一种子引发剂对水稻幼苗幼芽和幼根的作用效果不同,它们分别与 γ -PGA 复合引发处理水稻种子的效果需要进一步的研究。

2.2 复合引发剂处理对低温胁迫下水稻幼苗生长的影响

为了进一步研究上述 4 种单一种子引发剂与 γ -PGA 复合引发对水稻幼苗耐冷性的影响,将它们分别与 γ -PGA 复合引发种子 36 h 后,在水培条件下培养水稻幼苗 7 d 后生长至一叶一心期。并在 6℃低温胁迫下考察了幼苗的生长状况。如表 2 结果所示,低温处理前,在所有复合引发处理中,无机盐混合试剂和 0.1 g·L⁻¹ γ -PGA 复合引发处理后,水稻幼苗根长和根重明显大于常温对照。在 6℃低温处理后,所有引发处理的水稻幼苗存活率都有一定程度的提高,无机盐混合试剂和 0.1 g·L⁻¹ γ -PGA 复合处理的水稻幼苗芽重和根重分别较低温对照高 31.3% 和 10.5%。这是所有引发处理中表现最高的,其存活率较低温对照提高了 1.2 倍,表明该复合种子引发处理促进了水稻种子的发芽,使水稻幼苗生长健壮,进而提高了发芽期水稻幼苗的耐冷性。

表 1 单一种子引发剂处理对低温胁迫下水稻幼苗生长的影响
Table 1 Effect of different seed treatments on growth of rice seedlings under chilling stress

处理 Treatments	芽长 Shoot L/cm		根长 Root L/cm		芽鲜重 Shoot FW/g		根鲜重 Root FW/g	
	0 d	R3 d	0 d	R3 d	0 d	R3 d	0 d	R3 d
CaCl ₂ 0.55 g·L ⁻¹	4.4±0.5b	4.4±0.4c	14.8±1.2a	14.8±1.3b	0.45±0.1c	0.25±0.1b	0.63±0.2b	0.74±0.2b
CK-1	5.4±1.4a	5.4±1.2b	12.6±2.1b	12.6±1.6c	0.58±0.1a	0.21±0.1b	0.70±0.1a	0.70±0.1c
CK-2	4.8±1.2b	10.9±1.2a	10.9±1.5c	17.2±2.3a	0.52±0.1b	0.95±0.2a	0.69±0.1a	0.79±0.1a
MR	6.5±1.1a	6.4±1.2b	12.7±1.6a	14.0±0.2ab	0.59±0.2a	0.58±0.2b	0.60±0.2a	0.84±0.2a
CK-1	6.0±0.2a	6.0±0.2b	12.0±0.2a	12.0±1.2b	0.56±0.1a	0.23±0.1c	0.63±0.1a	0.66±0.1b
CK-2	6.1±0.2a	11.1±0.2a	13.4±0.2a	16.0±0.2a	0.56±0.2a	1.00±0.2a	0.65±0.2a	0.85±0.2a
SA 0.069 g·L ⁻¹	3.9±0.7a	6.4±1.0b	11.3±1.2a	12.2±1.3b	0.42±0.1a	0.62±0.1b	0.52±0.1a	0.63±0.1b
CK-1	4.4±0.6a	4.4±0.7c	11.5±1.4a	11.5±1.2b	0.39±0.1a	0.16±0.1c	0.53±0.1a	0.49±0.1c
CK-2	4.4±1.0a	9.2±1.1a	11.4±1.2a	16.3±1.5a	0.39±0.1a	0.82±0.2a	0.54±0.1a	0.78±0.1a
JA 2.1 mg·L ⁻¹	4.9±0.7a	7.2±1.0c	11.5±1.2bc	12.1±2.2bc	0.53±0.1a	0.65±0.1b	0.68±0.1a	0.76±0.1a
CK-1	4.7±0.2a	4.7±0.4b	13.3±1.8a	13.3±1.7b	0.51±0.1a	0.18±0.1c	0.68±0.1a	0.73±0.1a
CK-2	5.1±1.3a	9.2±1.6a	12.0±1.4b	16.8±2.2 a	0.51±0.1a	0.89±0.1a	0.66±0.1a	0.78±0.1a
PGA 0.1 g·L ⁻¹	6.9±1.1a	8.8±1.4b	14.6±2.3a	12.4±1.7b	0.50±0.1a	0.44±0.1b	0.69±0.1a	0.70±0.1b
CK-1	6.3±1.3a	7.7±1.4c	11.9±1.5c	11.1±1.0c	0.51±0.1a	0.42±0.1c	0.61±0.1a	0.60±0.1b
CK-2	6.8±0.8a	9.5±0.9a	13.5±1.3b	15.2±1.9a	0.50±0.1a	0.84±0.1a	0.70±0.1a	0.84±0.1a

注:同一种子引发剂处理下的不同符号 a, b 和 c 表示各处理与对照的差异显著性,相同符号表示差异不显著,符号不同表示差异显著。下同。

表 2 复合种子引发处理对低温胁迫下水稻幼苗生长的影响
Table 2 Growth of rice seedling after seed treatment with inorganic salt mixture combined with γ-PGA under chilling stress

处理 Treatments	芽鲜重 Shoot FW/g		根鲜重 Root FW/g		存活率 Survival rate/%
	0 d	R3 d	0 d	R3 d	
CaCl ₂ +P	0.21±0.07a	0.18±0.05ab	0.22±0.06a	0.22±0.05a	70.6±8.45b
MR+P	0.22±0.05a	0.21±0.06b	0.23±0.06b	0.21±0.06a	90.4±9.43c
SA +P	0.22±0.06a	0.18±0.05ab	0.22±0.08a	0.22±0.06a	65.8±7.08b
JA +P	0.20±0.04a	0.17±0.06a	0.21±0.06a	0.18±0.07a	47.2±8.19a
CK-1	0.19±0.05a	0.16±0.05a	0.20±0.06a	0.19±0.06a	41.8±6.65a
CK-2	0.20±0.06a	0.29±0.08c	0.21±0.07a	0.23±0.06b	100.0±2.08d

2.3 复合引发处理对低温下水稻幼苗可溶性糖和 MDA 含量的影响

经分析发现了各种复合引发处理对水稻幼苗在低温胁迫下的生理生化指标的变化。从表 3 看出,低温胁迫处理前,种子引发处理的水稻幼苗可溶性糖含量较未进行种子引发的对照幼苗有较大提高。在不同天数低温胁迫下,各个引发处理幼苗可溶性糖呈现上升趋势。其中,低温处理第 2 d 时,2.1 mg·L⁻¹ SA 与 0.1 g·L⁻¹ γ-PGA 复合引发处理幼苗的可溶性糖含量最高。低温处理后恢复 3 d 时,无机盐混合试剂与 0.1 g·L⁻¹ γ-PGA 复合引发处理幼苗的可溶性糖含量最高。

表 3 结果还表明,SA 复合处理、JA 复合处理和低温对照的 MDA 含量随低温胁迫时间的延长呈增

加趋势,其他复合处理在低温处理 2 d 时 MDA 含量降低,而常温恢复 3 d 后 MDA 含量升高。在各种复合引发的水稻幼苗低温处理第 0 d 和第 1 d,各种复合引发处理和低温对照差别表现出部分显著性。在低温处理第 2 d 和恢复第 3 d,各种复合引发处理和低温对照的 MDA 含量差别明显增大,表明低温处理对水稻的生理代谢有一定的抑制作用。但是,从总的趋势来看,无机盐混合试剂与 0.1 g·L⁻¹ γ-PGA 复合引发时 MDA 含量的变化幅度最小,表明这种复合引发处理提高了水稻幼苗生物膜的稳定性和抗冷能力。

2.4 复合引发处理对低温胁迫下水稻幼苗 APX 和 SOD 酶活性的影响

为了评价复合引发处理对水稻幼苗低温胁迫的减缓效应的生理特性,在不同复合引发处理后,测定

表 3 复合种子引发处理对低温胁迫下水稻幼苗可溶性糖和 MDA 含量的影响

Table 3 Soluble sugar and MDA contents of rice seedlings after seed treatment with inorganic salt mixture combined with γ -PGA under chilling stress

处理 Treatments	可溶性糖含量 Soluble sugar contents/mg·g ⁻¹				丙二醛含量 MDA contents/nmol·g ⁻¹			
	0 d	1 d	2 d	R3 d	0 d	1 d	2 d	R3 d
CaCl ₂ +P	14.2±2.8bc	16.7±5.3ab	17.5±5.6ab	20.1±6.8ab	5.7±1.2a	13.6±5.6c	10.8±3.1c	27.4±7.6bc
MR+P	15.7±3.4c	25.2±6.5c	19.6±4.1bc	22.5±6.0c	5.9±1.2a	9.2±2.1a	6.4±1.5a	14.9±4.3a
SA+P	14.2±2.9bc	22.9±5.3bc	19.5±4.5bc	22.4±4.7c	5.9±1.4a	9.7±2.1a	13.6±2.3cd	18.6±3.8a
JA+P	11.9±2.5ab	21.8±5.6bc	23.40±5.2c	20.1±4.8b	4.2±1.0a	12.5±2.2b	18.6±3.3e	46.8±6.5d
CK-1	10.9±2.7a	22.0±2.3bc	20.72±2.5bc	18.5±2.9ab	7.6±1.4b	10.6±2.0a	13.6±2.8cd	32.1±7.1c
CK-2	12.4±2.2ab	13.2±2.6a	13.0±2.3a	16.8±3.5a	7.7±2.1b	9.2±2.4a	8.7±2.4ab	19.8±3.3a

了水稻幼苗在低温胁迫处理 0 d、1 d、2 d 和 R3 d 后的抗氧化酶 APX 和 SOD 酶活性的变化。图 1 结果表明,与对照相比,不同复合引发剂处理后的水稻幼苗 APX 酶活呈现先升后降的趋势。低温处理 2 d 和 25 °C 恢复 3 d 时 APX 酶活性变化不大。在低温处理 1 d 时,无机盐混合试剂复合和 SA 复合处理的 APX 酶活性最高,分别比对照提高了 56.8% 和 48.6%。SOD 酶活性随低温时间延长呈降低趋势,25 °C 恢复 3 d 时 SOD 酶活性升高,但各种处理之间 SOD 酶活性差别不大。在低温胁迫期间,无机盐混合试剂复合和 CaCl₂ 复合引发处理的水稻幼苗 SOD 酶活性较低温对照分别增加了 1.36% 和 30.17%。

2.5 无机盐混合试剂与 γ -PGA 复合种子引发处理对水稻幼苗低温响应基因表达的影响

2.5.1 RNA 纯度及完整性

为了研究无机盐混合试剂与 0.1 g·L⁻¹ γ -PGA 复合引发对水稻幼苗抗冷性的分子效应,从无机盐混合试剂与 γ -PGA 复合处理、0.1 g·L⁻¹ γ -PGA 单一处理和未引发处理的水稻幼苗低温胁迫 0 h、12 h、24 h 和 48 h 后的地上部提取总 RNA,逆转录后分别进行了

RT-PCR 分析。

分光光度法测定表明,提取的水稻幼芽总 RNA 浓度较高, A₂₆₀/A₂₈₀ 均在 2.1~2.2 之间。图 2 结果显示,12 份材料的 RNA 电泳条带清晰,弥散轻微,说明提取的总 RNA 完整性好,其中 28 S 比 18 S 条带亮度明显大,5 S 条带很微弱。在电泳图上没有看到 DNA 条带的污染。因此,所提取的 RNA 符合后续 RT-PCR 实验的要求。

2.5.2 无机盐混合试剂和 γ -PGA 复合引发处理水稻幼苗在低温胁迫下低温响应基因的转录变化

如前所述,选择 6 个参与水稻低温响应的基因,评价无机盐混合试剂与 γ -PGA 复合引发的分子效应。如图 3 所示,在低温胁迫下,混合试剂和 γ -PGA 复合引发、 γ -PGA 单一引发和对照水稻幼苗的 *Os-ICE1* 基因转录变化不明显,暗示 *OsICE1* 基因表达可能受转录后水平调节。在低温胁迫下,无机盐混合试剂和 γ -PGA 复合引发、 γ -PGA 单一引发和未引发对照的水稻幼苗 *OsDREB1B* 基因转录随低温胁迫时间延长而迅速增加。无机盐混合试剂和 γ -PGA 复合引发和 γ -PGA 单一种子引发处理的高于对照,低温处

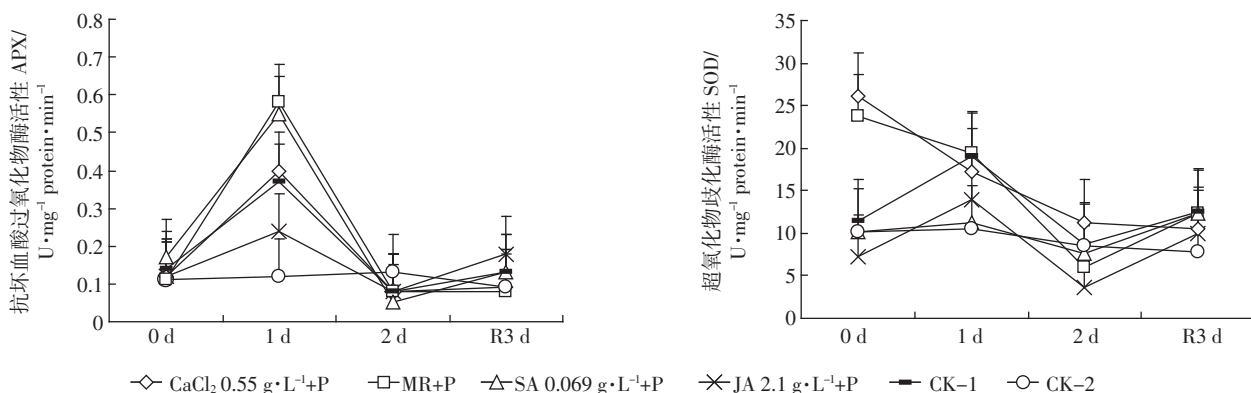


图 1 复合种子引发处理对低温胁迫下水稻幼苗 APX 和 SOD 酶活性的影响

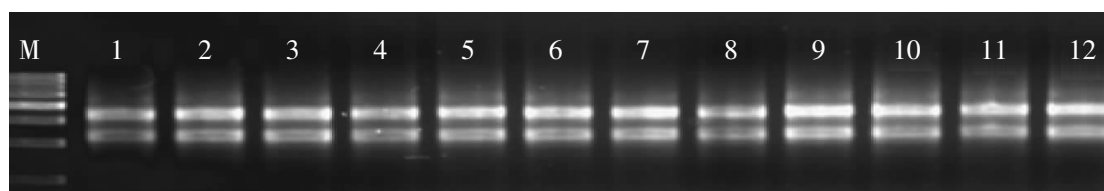
Figure 1 Activity of APX and SOD enzymes of rice seedlings after seed treatment with inorganic salt mixture combined with γ -PGA under chilling stress

理 48 h 转录表达量明显高于低温对照。说明种子引发处理能诱导 *OsDREB1B* 基因在低温下的转录,从而提高水稻幼苗的耐冷性。在低温处理下,无机盐混合试剂和 γ -PGA 复合引发处理、 γ -PGA 单一引发处理和低温对照的水稻幼苗 *OsCDPK7* 基因转录水平随着低温胁迫时间的延长,表达量逐渐增加,无机盐混合试剂和 γ -PGA 复合引发和 γ -PGA 单一引发均高于低温对照。在低温处理下,无机盐混合试剂和 γ -PGA 复合引发处理、 γ -PGA 单一引发处理和低温对照的水稻幼苗 *OsFAE2* 基因转录水平逐渐增加,说明低温诱导了 *OsFAE2* 基因表达,可能促进脂肪酸的生物合成,用于受损细胞膜的修复。在低温胁迫下,无机盐混合试剂和 γ -PGA 复合引发、 γ -PGA 单一引发和未引

发处理对照的水稻幼苗 *OsMYBS3* 基因转录水平随低温胁迫时间延长而逐渐增加,3 个处理间表达模式差异不大,表明该基因诱导表达不受种子引发的影响。在低温处理下,无机盐混合试剂和 γ -PGA 复合引发、 γ -PGA 单一引发和未引发处理对照的水稻幼苗 *OsLIP19* 基因转录水平随低温胁迫时间延长而增加。但是,在未引发处理对照幼苗中表达量高于引发处理幼苗,说明低温逆境诱导了基因 *OsLIP19* 基因的表达,但引发处理对 *OsLIP19* 转录水平有一定的抑制作用。

3 讨论

近年来,以生物大分子作为种子引发剂在农业生产上的应用逐渐引起研究者的关注^[24]。目前有研究发

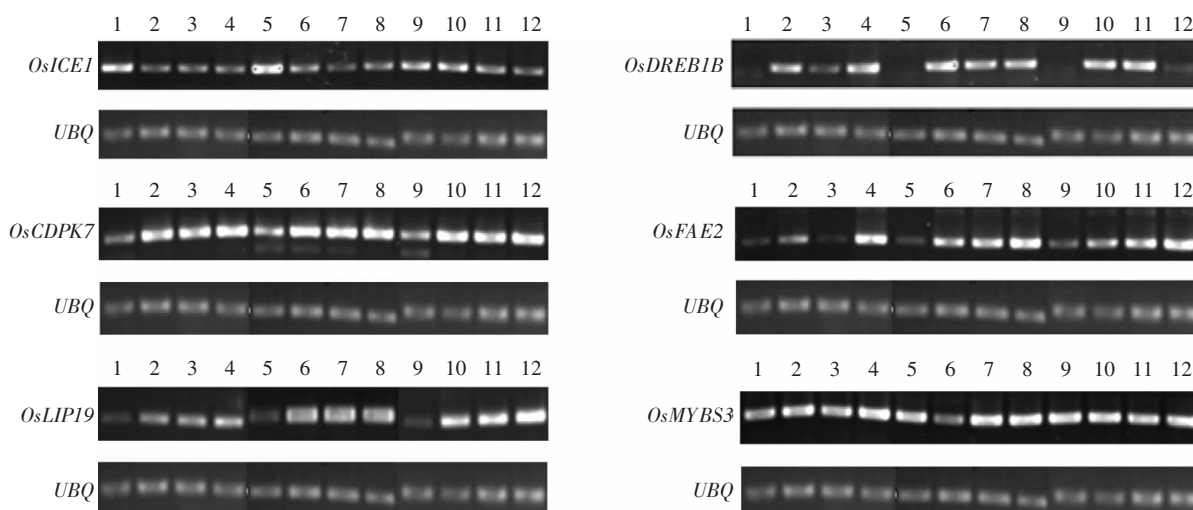


1—12 泳道分别表示无机盐混合试剂与 γ -PGA 复合处理(泳道:1、2、3、4)、 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ γ -PGA 单一处理(泳道:5、6、7、8)和未引发处理(泳道:9、10、11、12)下水稻幼苗在低温胁迫处理 0、12、24 h 和 48 h 后的总 RNA

1—12 lanes denote inorganic salt mixture plus $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ γ -PGA (lanes: 1, 2, 3, 4), $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ γ -PGA alone (lanes: 5, 6, 7, 8) or non-treatment (lanes: 9, 10, 11, 12) followed by 0, 12, 24 and 48 h of chilling stress at 6°C , respectively

图 2 水稻幼苗低温胁迫下地上部总 RNA 电泳检测

Figure 2 Electrophoretic detection of total RNA extracted from rice seedlings after seed treatment



1、2、3 和 4 泳道分别表示混合试剂复合引发处理幼苗经过低温处理 0 h、12 h、24 h 和 48 h;5、6、7 和 8 泳道分别表示 γ -PGA 引发剂处理幼苗经过低温处理 0 h、12 h、24 h 和 48 h;9、10、11 和 12 泳道分别表示未进行引发处理的幼苗经过低温处理 0、12、24 h 和 48 h
1, 2, 3 and 4 lanes denote 0, 12, 24 and 48 h chilling stress of the rice seedlings after seed treatment by inorganic salt mixture combined with γ -PGA, 5, 6, 7 and 8 lanes for γ -PGA alone and 9, 10, 11 and 12 lanes for non-priming control, respectively

图 3 低温处理下水稻幼苗 6 个低温响应基因的转录水平变化

Figure 3 Changes in the transcript levels of 6 cold-responsive genes in rice seedlings under chilling stress

现, γ -PGA 引发处理可以提高水稻幼苗的耐旱性和渗透调节能力^[15]。但由于 γ -PGA 易降解的特性, 目前还未见 γ -PGA 与其他类型种子引发剂复合处理在农业生产中应用的报道。本试验结果表明, 其他种子引发剂与 γ -PGA 复合引发水稻种子处理可以提高幼苗的耐冷性。因此, 本方法在早稻直播中具有潜在的应用价值, 与传统的水稻育苗移栽相比, 该法省去了育秧和移栽等环节, 具有省工、节本、增效等效果。

从种子引发处理的调控机制来看, 本法提高幼苗耐冷性的原因可能涉及到渗透调节物质、抗氧化酶活性和耐冷性基因的表达等方面。首先, 从生理指标变化来看, 在低温胁迫下, 不同复合引发处理提高了水稻幼苗的耐冷性, 其幼苗的可溶性糖含量增加, 膜脂过氧化产物 MDA 含量降低, 保护性酶 APX 和 SOD 酶活性不同程度地增加。从综合指标表现来看, 混合试剂复合处理效果最好, SA 复合处理效果次之。其次, 本试验初步探讨了复合型种子引发剂的分子效应, 除 *OsICE1* 外, *OsDREB1B*、*OsCDPK7*、*OsMYBS3*、*OsFAE2* 和 *OsLIP19* 基因均被低温逆境诱导表达。而且, *OsDREB1B* 和 *OsCDPK7* 基因受引发剂诱导表达, *OsMYBS3*、*OsFAE2* 基因的表达不受种子引发剂的影响, *OsLIP19* 基因表达受种子引发的抑制。前人研究认为, 水稻幼苗在低温胁迫下, *OsICE1* 基因转录水平变化不大, 但是 *OsICE1* 蛋白被激活后, 可以诱导转录因子 *OsDREB1B* 基因的表达。已有研究表明, *ICE1-DREB1B-target gene* 是水稻适应低温胁迫信号传导的主要转录调控途径^[25]。本文的结果进一步证明, *ICE1-DREB1B* 转录途径也受到 γ -PGA 种子引发剂处理的激活, 其下游的 *OsCDPK7* 基因被转录激活。然而, *OsLIP19* 基因转录水平降低, 暗示该基因对种子引发剂的调控与 *OsLIP19* 低温调控途径不同^[19]。随后, 在低温胁迫下活性氧清除酶 APX 和 SOD 活性被诱导合成而增强, 水稻幼苗生物膜的损伤程度因而减轻, 从而缓解了低温冷害对水稻幼苗生长的抑制作用。目前, 我们正在深入研究 γ -PGA 种子引发处理增强水稻幼苗耐冷性的分子机制。

4 结论

(1) CaCl_2 、无机混合试剂、SA 和 JA 分别与 γ -PGA 复合引发处理低温敏感型早稻品种华矮 21 种子, 可以不同程度地提高水稻幼苗的生长和耐冷性。其中, 无机盐混合试剂与 γ -PGA 复合处理的引发效果最好。

(2) 上述 4 种不同复合引发剂引发处理水稻种子后, 水稻幼苗的可溶性糖增加, MDA 含量降低, APX 和 SOD 酶活性在低温处理和回复生长后不同程度地明显增强。

(3) 无机盐混合试剂与 γ -PGA 复合引发处理诱导水稻幼苗 *OsDREB1B* 和 *OsCDPK7* 基因在低温胁迫下增强表达。但是, *OsLIP19* 基因的表达受到了一定程度的抑制。

参考文献:

- [1] 金铭路, 杨春刚, 余腾琼, 等. 中国水稻微核心种质不同生育时期耐冷性鉴定及其相关分析[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(4): 540-546.
- [2] JIN M L, YANG C G, YU T Q, et al. Evaluation of cold tolerance at different growing period for mini core collection of rice (*Oryza sativa* L.) in China[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2009, 10(4): 540-546.
- [3] 张建华, 廖新华, 戴陆园, 等. 稻种资源芽期和苗期的耐冷性评价[J]. 中国农学通报, 1996, 12(5): 10-13.
- [4] ZHANG J H, LIAO X H, DAI L Y, et al. Evaluation on rice resources for cold tolerance at both budding stage and seedling stage [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 1996, 12(5): 10-13.
- [5] 阮松林, 薛庆中. 植物的种子引发[J]. 植物生理学报, 2002, 38(2): 198-202.
- [6] RUAN S L, XUE Q Z. Plant seed priming[J]. *Plant Physiology Journal*, 2002, 38(2): 198-202.
- [7] 陈秉初, 吴美仙, 汪久康. PEG 预处理对早稻种子活力和抗寒能力的影响[J]. 植物生理学报, 1992, 29(3): 198-201.
- [8] CHEN B C, WU M X, WANG J K. An improvement of vigor and chilling resistance of early rice seedling by PEG pretreatment[J]. *Plant Physiology Journal*, 1992, 29(3): 198-201.
- [9] 李美茹, 刘鸿先, 王以柔. 钙对水稻幼苗抗冷性研究[J]. 植物生理学报, 1996, 32(4): 379-384.
- [10] LI M R, LIU H X, WANG Y R. Effect of calcium on the cold-resistance of rice seedlings[J]. *Plant Physiology Journal*, 1996, 32(4): 379-384.
- [11] 由继红, 陆静梅, 杨文杰. 钙对玉米幼苗的抗寒性及膜 H^+ -ATPase 活性的影响[J]. 东北师大学报(自然科学版), 2002(3): 79-82.
- [12] YOU J H, LU J M, YANG W J. Effects of calcium on chilling resistance and membrane H^+ -ATPase activities of corn seedlings[J]. *Journal of Northeast Normal University(Natural Science Edition)*, 2002(3): 79-82.
- [13] Janda T, Szalai G, Tari I. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants[J]. *Planta*, 1999, 208: 175-180.
- [14] 向 华, 饶力群, 肖立锋. SA 对水稻种子萌发及其生理生化影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2003, 29(1): 12-14.
- [15] XIANG H, RAO L Q, XIAO L F. Effect of salicylic acid on the seed germination and physiology and biochemistry of the seed of rice[J]. *Journal of Hunan Agricultural University(Natural Science Edition)*, 2003, 29(1): 12-14.

- [9] 黄丽华, 黄晓伟, 麦焕钿. SA 对玉米幼苗抗寒性的影响[J]. 作物杂志, 2005(5): 16–18.
HUANG L H, HUANG X W, MAI H D. Effect of salicylic acid on the cold tolerance of maize seedlings[J]. *Crop Magazine*, 2005(5): 16–18.
- [10] 段小华, 邓泽元, 宾金华. 茉莉酸甲酯对水稻幼苗抗冷性的影响[J]. 植物生理学报, 2009, 45(9): 881–884.
DUAN X H, DENG Z Y, BIN J H. Effects of methyl jasmonate on cold resistance of rice seedlings[J]. *Plant physiology Journal*, 2009, 45(9): 881–884.
- [11] 李训贞, 梁满中, 周广治, 等. 水稻抗寒剂的效应及其施用技术[J]. 生命科学研究, 2001, 5(1): 80–83.
LI X Z, LIANG M Z, ZHOU G Q, et al. Effect of application of cold resistant agents on paddy rice[J]. *Life Science Research*, 2001, 5(1): 80–83.
- [12] 贺长征, 胡晋, 朱志玉, 等. 混合盐引发对水稻种子在逆境条件下发芽及幼苗生理特性的影响[J]. 浙江大学学报, 2002, 28(2): 175–178.
HE C Z, Hu J, ZHU Z Y, et al. Effect of seed priming with mixed-salt solution on germination and physiological characteristics of seedling in rice[J]. *Journal of Zhejiang University*, 2002, 28(2): 175–178.
- [13] 李晶博, 李丁, 邓毛程, 等. γ -聚谷氨酸的特性、生产及应用[J]. 化工进展, 2008, 27(11): 1789–1799.
LI J B, LI D, DENG M C, et al. Properties, production and application of γ -polyglutamic acid[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2008, 27(11): 1789–1799.
- [14] 王建平, 王晓丽, 王昌平, 等. 聚- γ -谷氨酸对烟草种子萌发及苗期生长的影响[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(3): 340–343.
WANG J P, WANG X L, WANG C P, et al. Effects of Poly- γ -glutamic acid on tobacco seed germination and its seedling growth[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, 26(3): 340–343.
- [15] 朱安婷, 蒋友武, 谢国生, 等. 外源聚- γ -谷氨酸对水稻幼苗耐旱性和渗透调节的影响[J]. 核农学报, 2010, 24(6): 1269–1273.
ZHU A T, JIANG Y W, XIE G S, et al. Effects of exogenous poly γ -glutamic acid on drought tolerance and osmotic adjustment of rice seedlings[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2010, 24(6): 1269–1273.
- [16] Ito Y, Katsura K, Maruyama K, et al. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice[J]. *Plant & cell physiology*, 2006, 47(1): 141–153.
- [17] Nakamura J, Yuasa T, Huong T T, et al. Rice homologs of inducer of CBF expression (OsICE) are involved in cold acclimation[J]. *Plant Biotechnology*, 2011, 28: 303–309.
- [18] Saijo Y, Kinoshita N, Ishiyama K, et al. A Ca^{2+} -dependent protein kinase that endows rice plants with cold- and salt-stress tolerance functions in vascular bundles[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2001, 42(11): 1228–1233.
- [19] Su C F, Wang Y C, Hsieh T H, et al. A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(1): 145–158.
- [20] Wen J Q, Oono K, Imai R. Two novel mitogen-activated protein signaling components, OsMEK1 and OsMAP1, are involved in a moderate low-temperature signaling pathway in rice[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(4): 1880–1891.
- [21] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 二版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 202–204, 280–282.
WANG X K. Plant physiology and biochemistry theory and techniques [M]. 2nd edition. Beijing: Higher Education Press, 2006: 202–204, 280–282.
- [22] Chao Y Y, Hong C Y, Kao C H. The decline in ascorbic acid content is associated with cadmium toxicity of rice seedlings[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(5): 374–381.
- [23] Shah K, Nahakpam S. Heat exposure alters the expression of SOD, POD, APX and CAT isozymes and mitigates low cadmium toxicity in seedlings of sensitive and tolerant rice cultivars[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 57: 106–113.
- [24] 丘德文. 植物免疫与植物疫苗-研究与实践[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 100–118.
QIU D W. Plant immunity and plant vaccine—research and practice[M]. Beijing: Science Press, 2008: 100–118.
- [25] Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J K. Cold stress regulation of gene expression in plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(10): 444–51.