

外源壳寡糖提高鲁梅克斯对铜胁迫的耐受性研究

王丽娟, 于星宇, 冯 旭, 李凤兰*, 胡宝忠*

(东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘 要:铜元素对植物的生长至关重要, 但土壤中过量的铜不但影响农作物的产量和品质, 还会通过食物链威胁到动物及人类的健康。因此, 寻找有效缓解铜胁迫对植物生长的抑制及降低植物中铜含量的方法对农业生产有重要意义。本研究通过盆栽试验探讨了外源施加不同浓度的壳寡糖对铜胁迫下鲁梅克斯生长、抗氧化系统及对铜元素富集和转运的影响, 为铜污染土地中农作物的种植提供新的策略。结果表明: 外源壳寡糖显著提高了铜胁迫下鲁梅克斯的叶绿素含量和抗氧化酶SOD、POD及CAT的活性, 并且降低了植株对铜的富集及转运系数, 进而提高了鲁梅克斯对铜胁迫的耐受性并降低了茎叶中的铜含量。壳寡糖的施用浓度要控制在合理的水平, 50 ~ 100 mg/L 的浓度较为适宜。

关键词:鲁梅克斯; 铜胁迫; 壳寡糖(COS); 耐受性

中图分类号: S548; Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2020)03-0060-05

Study on the Effect of Exogenous Chitooligosaccharides on the Tolerance of Rumex to Copper Stress

WANG Lijuan, YU Xingyu, FENG Xu, LI Fenglan*, HU Baozhong*

(College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Copper is very important to plant growth, but excessive copper in soil not only affects the yield and quality of crops, but also threatens the health of animals and humans through the food chain. Therefore, it is important for agricultural production to find effective ways to alleviate the inhibition of copper stress on plant growth and reduce copper content in plants. In this study, pot experiments were conducted to investigate the effects of different concentrations of chitooligosaccharide on Rumex growth, antioxidant system and copper enrichment and transport under copper stress, providing a new strategy for crop cultivation in copper-contaminated soil. The results showed that exogenous chitooligosaccharide significantly increased chlorophyll content and antioxidant enzymes activities of SOD, POD and CAT under copper stress, and reduced the accumulation and transport coefficients of copper, thus improving the tolerance of Rumex to copper stress and reducing copper content in stems and leaves. The application concentration of chitooligosaccharide should be controlled at a reasonable level, and the concentration of 50 ~ 100 mg/L is more suitable.

Key words: Rumex; Copper stress; Chitooligosaccharide (COS); Tolerance

铜(Cu)是植物生长的必须元素之一, 在叶绿素合成、碳水化合物积累和器官发育等进程中发挥重要的作用, 其同样是植物中各种抗氧化酶的核心元素^[1]。Cu在自然界具有广泛的分布, 正常

土壤中Cu的平均含量为20 ~ 30 mg/kg。然而, 近年来工业快速发展所带来的废弃物、污水的处理不当和农药滥用等因素致使我国大面积土地受到Cu的污染, 在污染源附近土壤中的Cu含量甚至高达10 g/kg以上^[2]。我国耕地中Cu污染的现象也普遍存在, 土壤中的Cu不能被环境所分解, 并且会被农作物富集。过量的Cu不但影响作物的元素吸收和生长发育, 造成减产, 并且会通过食物链直接影响动物和人类的健康^[3-5]。因此, 迫切需要开发能有效提高作物对Cu胁迫的耐受性并降低Cu含量的技术手段。

减少植物中Cu含量的常规手段是通过化学

收稿日期: 2019-04-08

基金项目: 国家国际科技合作专项(2013DFR30270); 黑龙江省应用技术与开发技术新创办企业项目(GC15F010)

作者简介: 王丽娟(1967-), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为植物生理与分子生物学。

通讯作者: 李凤兰, 女, 博士, 副教授, E-mail: lifenglan@neau.edu.cn

胡宝忠, 男, 博士, 教授, E-mail: bzhu@neau.edu.cn

和生物修复降低土壤中Cu的含量,但这些方法成本非常高昂并且会消耗大量的资源,因此还需要新的有效方法^[6-7]。近年来的许多研究显示,外源施加化学调节剂能够诱导植物对重金属胁迫的抗性并减少重金属的积累^[8-9]。壳寡糖(Chitooligosaccharide, COS)是壳聚糖的水解产物,具有良好的生物相容性并在工业、医药和食品领域有广泛的应用^[10-11]。COS同样在调控植物防御外界胁迫的途径中发挥重要的作用。据报道, COS可以提高植物对非生物胁迫的耐受性,包括盐胁迫、干旱和重金属胁迫,并且提高植物中抗氧化酶的积累^[12-13]。外源喷施COS显著提高了镉(Cd)胁迫下油菜(*Brassica rapa*)中抗氧化酶的活性并降低了Cd积累^[14]。外源COS能缓解Cd胁迫对小麦(*Triticum aestivum*)幼苗和大白菜(*Brassica pekinensis*)种子的毒性^[15-16]。因此, COS可能在缓解Cu对农作物的毒性和降低农作物中Cu积累的过程中发挥重要的作用。

研究显示,叶类植物对重金属元素有更好的富集和吸收^[17-18]。鲁梅克斯(*Rumex patientia*)作为一种优质牧草在中国北方种植广泛,其茎叶是制作饲料的主要部位。因此,提高鲁梅克斯在Cu胁迫下的耐受性并降低植株中的Cu含量对于畜牧业生产具有重要的意义。本试验研究了外源COS对Cu胁迫下鲁梅克斯的生长、抗氧化酶系统和Cu积累的影响,为提高农作物的重金属耐受性提供新的方法策略和理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

鲁梅克斯品种为Щавель Чемпион,种子采购于乌克兰。COS由东北农业大学植物资源与分子生物学实验室提供。

1.2 试验方法

选取饱满一致的鲁梅克斯种子经10% H₂O₂消毒1 min后用蒸馏水清洗5次备用。选用大小为10 cm×10 cm的无孔花盆用于盆栽试验。处理组每盆盛放500 g含Cu量为200 mg/kg(预实验显示在此浓度下鲁梅克斯能够正常发芽并生长)的灭菌营养土, CuSO₄用于模拟Cu污染源,对照组(CK)为正常灭菌营养土。将鲁梅克斯种子种植于花盆中并于光照培养箱中进行培养,条件为16/8 h光照周期, 25/18℃昼夜温度。种植后第30天对处理组外源喷施COS溶液,设置5个浓度,分别为0、25、50、100、200 mg/L^[14]。每隔1 d用50 mL蒸

馏水或COS溶液喷洒植物, 10 d后取样用于试验。所有处理均重复3次并随机取样(n=6)。

1.3 鲁梅克斯生长指标和叶绿素含量的测定

分别测量每个处理组鲁梅克斯植株的株高、鲜重和干重(全株、地上和地下部分),并计算根冠比(根冠比=地下干重/地上干重)。叶绿素的测定采用江苏科铭生物®植物叶绿素测定试剂盒,方法参照说明书。

1.4 MDA含量和抗氧化酶活性测定

分别测定每个处理组鲁梅克斯植株中丙二醛(MDA)的含量和超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)的活性,试剂盒由江苏科铭生物®提供。

1.5 根际土壤及植株中Cu含量的测定

采用电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-OES, Optima, 7000)测定每个处理组鲁梅克斯植株根际土壤、根和茎叶中Cu的含量。将干燥至恒重的粉末状样品置于混合酸(HNO₃和HClO₄体积比4:1)中消化后用于测定^[14]。分别计算植株根部对Cu的富集系数及植株对Cu的转运系数。

植株根部对Cu的富集系数=植株根部Cu含量/根际土壤中Cu含量

植株对Cu的转运系数=植株地上部分Cu含量/植株地下部分Cu含量

1.6 数据分析

采用Excel 2010对数据进行整理, GraphPad Prism 5用于显著性分析及做图。

2 结果与分析

2.1 外源COS对Cu胁迫下鲁梅克斯生长的影响

如表1所示, Cu处理显著抑制了鲁梅克斯植株的生长,株高、鲜重及干重均显著低于CK处理($P<0.05$)。外源施用COS对Cu胁迫下植株的生长具有一定的促进作用,不同浓度的COS均增加了植株的株高、鲜重和干重,但相比于Cu处理组均不显著($P>0.05$)。外源COS处理,植株的根冠比显著低于Cu处理。

2.2 外源COS对Cu胁迫下鲁梅克斯叶绿素含量的影响

如图1所示,在Cu胁迫下,植株中叶绿素的含量比CK处理显著降低了41.1%。外源施用COS能使鲁梅克斯中叶绿素的含量在Cu胁迫下也维持较高的水平,且50 mg/L的浓度效果最为显著

表1 外源COS对Cu胁迫下鲁梅克斯生长的影响

处理	株高 (cm)	鲜重 (g)	干重 (g)	根冠比
CK	8.93±0.7a	0.54±0.02a	0.17±0.03a	0.78±0.09c
Cu	6.2±0.61b	0.4±0.03b	0.12±0.02b	1.21±0.08a
Cu+25COS	6.37±0.51b	0.43±0.05b	0.12±0.01b	1.01±0.07b
Cu+50COS	7.13±0.38b	0.44±0.1b	0.15±0.02ab	0.82±0.05c
Cu+100COS	8.03±0.45ab	0.51±0.02ab	0.14±0.01ab	0.81±0.06c
Cu+200COS	7.97±0.61ab	0.46±0.07b	0.13±0.01b	0.85±0.03c

注:表中数据均为平均值±标准差(n=6),同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同

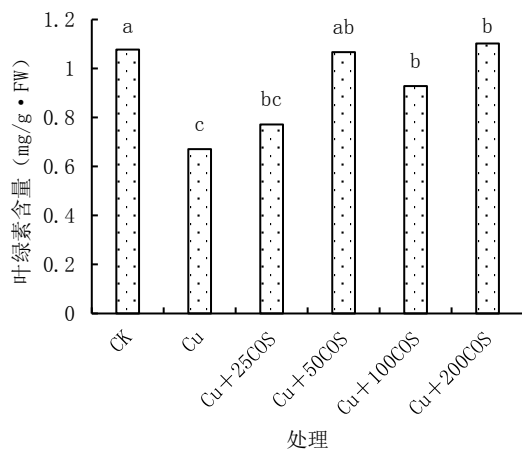


图1 外源COS对Cu胁迫下鲁梅克斯叶绿素含量的影响

($P<0.05$),该浓度的COS处理使植株中叶绿素含量比Cu处理提高了55.71%。

2.3 外源COS对Cu胁迫下鲁梅克斯抗氧化系统的影响

为了进一步观察Cu处理对鲁梅克斯的毒性,通过测定植株中MDA含量来观察质膜的过氧化程度,结果如图2A所示。与CK相比,Cu处理下植株中MDA含量显著增加了4.3倍($P<0.05$)。而与Cu处理相比,外源COS的施加对MDA含量的降低有显著作用。当施加COS浓度为50、100、200 mg/L时,植株中MDA的含量较Cu处理分别显著下降了52.43%、68.13%和59.69%。COS可能在清除自由基的进程中起了重要作用。Cu胁迫会导致植株中活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)的积累,COS对Cu胁迫下植株中抗氧化酶活性的影响结果见图2B~2D。在Cu处理下植株中SOD和CAT的活性均显著上升,而外源COS能进一步提高这两种抗氧化酶的活性。在100 mg/L的COS处理下,SOD和CAT的活性较Cu处理分别提高29.32%和28.79%。Cu处理下植株中POD的活性呈下降趋势,但不显著。COS处理均显著提高了POD的活性($P<0.05$),100 mg/L的COS效果

最好。

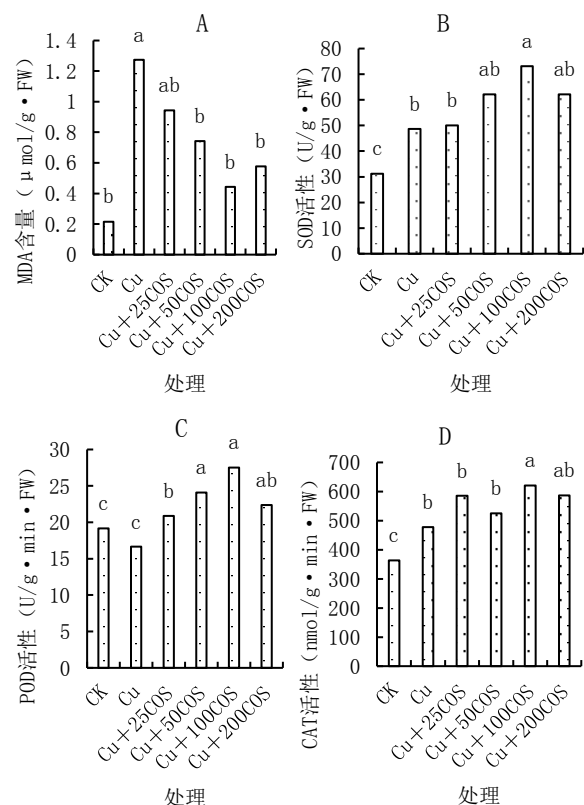


图2 外源COS对Cu胁迫下鲁梅克斯抗氧化系统的影响

2.4 外源COS对Cu胁迫下鲁梅克斯根际土壤中Cu含量的影响

植物根部对土壤中的重金属具有一定富集作用,COS对鲁梅克斯根际土壤中Cu含量的影响结果如图3所示。Cu处理下植株根际土壤中Cu的含量为0.738 mg/g,是处理Cu浓度的3.69倍,表明鲁梅克斯对土壤中Cu有显著的富集作用。COS处理能降低植株根际土壤中的Cu含量,与Cu处理相比,50、100、200 mg/L的COS处理分别使根际土壤中Cu的含量显著下降20.3%、35.02%和28.07%。

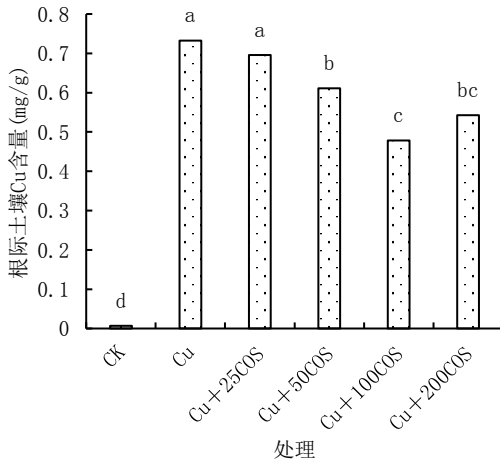


图3 外源COS对Cu胁迫下鲁梅克斯根际土壤Cu含量的影响

2.5 外源COS对Cu胁迫下鲁梅克斯植株中Cu含量的影响

不同处理下鲁梅克斯根部和茎叶中Cu含量的测定结果如图4所示。Cu处理下植株根部和茎叶中Cu的含量分别为0.513 mg/g和0.265 mg/g,均高于处理土壤中Cu的浓度。与Cu处理相比,COS处理显著抑制了植株对Cu的富集($P<0.05$)。在25、50、100 mg/L的COS处理下,根部Cu含量较CK相比分别下降了25.01%、38.83%和51.71%(图4A)。在100 mg/L的COS处理下,植株茎叶中Cu的含量最低,为0.078 mg/g(图4B)。

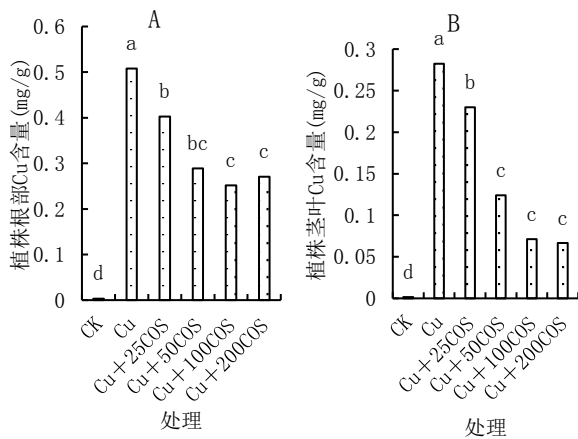


图4 外源COS对Cu胁迫下鲁梅克斯植株中Cu含量的影响

2.6 外源COS对Cu胁迫下鲁梅克斯Cu富集及转运的影响

不同处理下鲁梅克斯根部对Cu的富集系数及植株对Cu的转运系数结果如图5所示。不同浓度的COS处理均降低了植株根部对Cu的富集系数,但只有浓度为100 mg/L的COS效果显著。

在该浓度下,植株根部对Cu的富集系数比Cu处理下降了25.74%(图5A)。25 mg/L的COS处理对Cu的转运系数无显著影响($P>0.05$),但随着处理浓度的增加,植株对Cu的转运系数逐渐下降。在200 mg/L的COS处理下,Cu的转运系数最低,为0.271 5(图5B)。

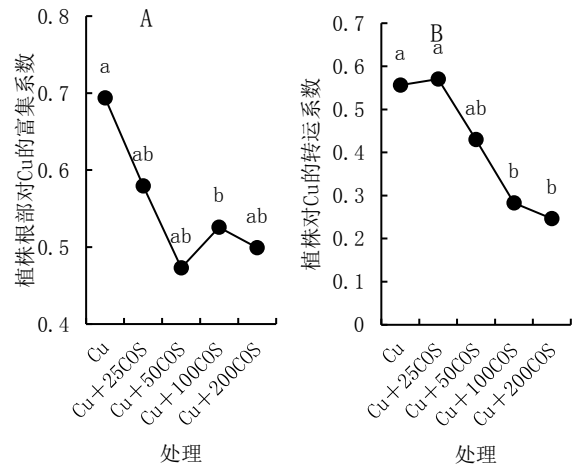


图5 外源COS对Cu胁迫下鲁梅克斯Cu富集及转运的影响

3 讨论

土壤中过量的Cu会显著抑制植物的生长,Cu会富集在根部并降低根系对其他营养元素的吸收,直接抑制脱羧酶的活性,影响谷氨酸的合成^[19]。Cu所导致的根部损伤使植株对水分和营养吸收的效率降低,地上部分生长受到限制^[20]。此外,过量的Cu²⁺会取代Fe²⁺和Mg²⁺与叶绿体蛋白质-SH的结合,进而使叶绿体的结构和功能受损,叶绿素的合成减少^[14]。研究表明,叶绿体是COS作用的靶点之一,其对重金属胁迫下植物中的叶绿素具有积极保护作用^[14]。本试验中,200 mg/kg的Cu处理显著抑制了鲁梅克斯的生长并降低了叶绿素的含量,根冠比与CK相比显著增加。外源COS显著改善了Cu胁迫对鲁梅克斯生长的限制并提高了叶绿素含量,表明COS在调节Cu胁迫下植物耐受性中发挥积极的作用。

Cu胁迫所导致细胞中ROS的增加会使质膜过氧化程度加剧,MDA含量增加,并激活抗氧化酶系统。在Cu胁迫下,鲁梅克斯植株中MDA的含量与CK相比显著增加,且SOD及CAT的活性均显著提高。COS可以增加非生物胁迫下植物中抗氧化酶的活性以维持质膜的稳定^[21]。本研究得到了相似的结果,外源COS能显著增加Cu胁迫下

植株中 SOD、POD 和 CAT 的活性并显著降低了 MDA 的含量,证明了 COS 对维持 Cu 胁迫下植物质膜稳定及 ROS 清除有重要的作用,进而提高植株对 Cu 胁迫的耐受性。

除了缓解重金属对农作物的毒性,如何降低农作物中重金属的含量仍是需要解决的关键问题。本研究的结果显示,COS 的外源施用能显著降低 Cu 胁迫下鲁梅克斯根际土壤、根部和茎叶中的 Cu 含量,且植株根部对 Cu 的富集系数和植株对 Cu 的转运系数均显著降低。表明 COS 能够抑制鲁梅克斯根部对土壤中 Cu 的富集和吸收,并且减少 Cu 由根部向茎叶的转运,进而降低整个植株中的 Cu 含量。鲁梅克斯作为牧草,其茎叶是主要的饲料来源,因此本研究的结果对 Cu 含量超标土壤中的鲁梅克斯种植具有重要的指导意义。高浓度(200 mg/L)的 COS 并不能进一步提高鲁梅克斯对 Cu 的耐受性和降低植株中 Cu 的积累。Dzung 等研究表明高浓度的 COS 能抑制植物的光合作用,从而对植物的生长产生负面的影响^[22]。施用过量的 COS 并不能对 Cu 胁迫下鲁梅克斯的生长有更好的改善作用且会增加成本,因此在实际生产中要将 COS 施用浓度控制在合适的水平,50~100 mg/L 的浓度较为适宜。

4 结 论

本研究结果表明,外源施用 COS 显著提高了 Cu 胁迫下鲁梅克斯的叶绿素含量和抗氧化能力,并且抑制了植株对 Cu 的富集及转运,进而提高了鲁梅克斯对 Cu 胁迫的耐受性并降低了茎叶中的 Cu 含量。

参考文献:

- [1] Clarkson D T, Hanson J B. The Mineral Nutrition of Higher Plants[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1980, 31(4):239-298.
- [2] 王 萌,李杉杉,李晓越,等.我国土壤中铜的污染现状与修复研究进展[J].地学前缘,2018,25(5):305-313.
- [3] 郝汉舟,靳孟贵,李瑞敏,等.耕地土壤铜、镉、锌形态及生物有效性研究[J].生态环境学报,2010,19(1):92-96.
- [4] 尹相博,杨梦璇,王 冰,等.铜胁迫对红小豆萌发的影响[J].东北农业科学,2013,38(5):10-11,35.
- [5] 梁烜赫,曹铁华,张 磊,等.吉林省农田重金属含量及其在作物中的累积[J].东北农业科学,2011,36(6):59-62.
- [6] Qiu Q, Wang Y T, Yang Z Y, et al. Effects of phosphorus supplied in soil on subcellular distribution and chemical forms of cadmium in two Chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis* L.) cultivars differing in cadmium accumulation[J]. Food & Chemical Toxicology, 2011, 49(9):2260-2267.
- [7] 李晓云,史良图,王海文,等.微生物在污染蔬菜土壤修复中的作用[J].吉林农业科学,2007,32(4):26-28,34.
- [8] Ali B, Gill R A, Yang S, et al. Hydrogen sulfide alleviates cadmium-induced morpho-physiological and ultrastructural changes in *Brassica napus*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 110:197-207.
- [9] Liu Z P, Ding Y F, Wang F J, et al. Role of salicylic acid in resistance to cadmium stress in plants[J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(4): 719-731.
- [10] Katiyar D, Hemantaranjan A, Singh B. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review[J]. Indian Journal of Plant Physiology, 2015, 20(1): 1-9.
- [11] Massimo M, Raffaella C. Chitosan Effects on Plant Systems[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(7): 996.
- [12] Yang F, Hu J J, Li J L, et al. Chitosan enhances leaf membrane stability and antioxidant enzyme activities in apple seedlings under drought stress[J]. Plant Growth Regulation, 2009, 58(2): 131-136.
- [13] Zou P, Li K C, Liu S, et al. Effect of chitooligosaccharides with different degrees of acetylation on wheat seedlings under salt stress[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 126: 62-69.
- [14] Zong H, Li K, Liu S, et al. Improvement in cadmium tolerance of edible rape (*Brassica rapa* L.) with exogenous application of chitooligosaccharide[J]. Chemosphere, 2017, 181: 92-100.
- [15] Ma L J, Zhang Y, Bu N, et al. Physiological Characters of Oligochitosan on Alleviating Cd Toxicity of Wheat Seedling[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 33:31-34.
- [16] Xiao L, Kuang Y L, Qin C Q. Influence of Oligochitosan on Some Physiological and Biochemical Characteristics of Chinese Cabbage under the Stress of Cadmium[J]. Northern Horticulture, 2012(17): 27-30.
- [17] Liu X M, Song Q J, Tang Y, et al. Human health risk assessment of heavy metals in soil-vegetable system: a multi-medium analysis[J]. The Science of the Total Environment, 2013, (463-464): 530-540.
- [18] Xu L L, Dong Y J, Kong J, et al. Effects of root and foliar applications of exogenous NO on alleviating cadmium toxicity in lettuce seedlings[J]. Plant Growth Regulation, 2014, 72(1):39-50.
- [19] 刘明美.土壤 Cu²⁺污染对植物生长影响的研究进展[J].畜牧与饲料科学,2009,30(4):34-35.
- [20] 陈同斌.土壤化学性质对 Cu 的植物吸收效应和土壤有效 Cu 测定的影响[J].应用生态学报,1998(1):3-5.
- [21] Jabeen N, Ahmad R. The activity of antioxidant enzymes in response to salt stress in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings raised from seed treated with chitosan[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(7):1699-1705.
- [22] Dzung N A, Khanh V T P, Dzung T T. Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 84(2):751-755.

(责任编辑:王丝语)