文章编号：1000-5773(2003)04-0283-07

高静水压对水稻种子萌发及同工酶的影响*

白成科[1]，李桂双[1]，段 俊[1]，彭长连[1]，段中岗[1]，翁克难[2]，徐世平[2]

(1. 中国科学院华南植物研究所，广东广州 510650；
2. 中国科学院广州地球化学研究所，广东广州 510640)

摘要：利用不同静水压力和不同保压时间处理了籼稻粤香占种子，研究发现，随着压力的增加和保压时间的延长，水稻发芽率和成苗率明显下降，高压处理后的水稻在苗期的生长受到明显抑制，大约生长 30 d 株高才赶上对照；聚丙烯酰胺凝胶电泳显示高静水压力抑制了种子幼苗的酯酶(Esterase)同工酶的表达，但对其它几种同工酶如过氧化物酶(Peroxidase)、超氧化物歧化酶(Superoxider Dismutase)和苹果酸酶(Malic Enyme)等影响较小。利用同一压力和保压时间处理，不同类型的水稻(Oryza sativa L.)品种种子，其中包括籼稻(粤香占和南京 11)、粳稻(秋光和台中 65)和中间类型 Bulu 稻(Bulu Gendjah 和 Bulu Rusa)，结果发现所有类型水稻种子的发芽率和成苗率都显著降低，但因水稻类型的不同其影响程度也不同，籼型水稻南京 11 和粤香占的耐压性最弱，粳型水稻秋光和台中 65 最强，中间型 Bulu 水稻 Bulu Gendjah 和 Bulu Rusa 居中。上述结果表明，静水高压能够显著降低水稻的种子的发芽率和成苗率，抑制幼苗前期的生长和酯酶同工酶的表达。

关键词：高静水压力；水稻种子；同工酶
中图分类号：O521.21 **文献标识码**：A

1 引 言

高压生物学是近年由高压物理学和生物学发展起来的一门交叉学科，由于分子生物学和高压物理学技术的不断深入和迅速发展，高压分子生物学已成为国际上研究的热点之一[1]。Shantha 等[2]研究发现高压不但可以改变蛋白质三、四级结构，对酶的活性也产生了一定的影响；另有研究发现在高压处理和诱导下细菌能够产生“压力蛋白”[3]。静水高压处理对于生物细胞膜的流动性、透性以及细胞的显微结构都具有明显的影响甚至破坏作用[4]。高压环境对于在常压环境下生长的生物来说是一种逆境，能产生伤害甚至致死作用，生活中常用来进行(高压)灭菌和食品加工等[5]。种子的萌发是植物一生中新陈代谢重新启动和生命开始的重要阶段，我们以前的研究表明，高压处理可以诱导水稻产生突变体[6,7]，本研究继续利用高静水压处理水稻种子，通过统计发芽率和成苗率，跟踪调查其幼苗期的生长和同工酶的变化来研究高静水压对高等植物生长发育的影响，进一步揭示高压诱变的生物学效应。

2 材料与方法

2.1 材料和目的

本研究主要以籼稻品种粤香占为材料，经高静水压处理后，测定其发芽率、成苗率、株高和同工酶等

* **收稿日期**：2003-03-05；**修回日期**：2003-06-09
基金项目：国家自然科学基金(30070426)；中国科学院农办重点资助项目；国家重点基础研究发展规划项目(G1998010100)
作者简介：白成科(1976—)，男，博士研究生，主要研究方向：植物遗传育种.

各项指标,旨在研究高静水压对水稻的影响。同时选取有代表性的籼稻品种(南京11和粤香占),粳稻品种(秋光和台中65),中间类型Bulu稻(Bulu Gendjah和Bulu Rusa)为材料,经相同压力(75 MPa)和保压时间处理后,统计发芽率和成苗率,旨在研究高静水压对不同类型水稻发芽率和成苗率的影响。

2.2 高压处理方法

不同压力或同一压力处理:把精选的水稻种子浸种10 h,然后在不同压力(50、75、100 MPa)条件下在静水高压处理器中保压10 h卸压,未处理的种子作对照,同时浸种发芽。

不同保压时间处理:对精选的水稻种子,不浸种直接分批在75 MPa高静水压力下处理2、4、8、16、32、46 h,未处理的种子作对照,同时浸种。

以上处理和对照各设三个重复,每个重复种子量约600粒。高静水压处理后,把种子用自来水冲洗干净,均匀撒播在铺有已消毒滤纸的白瓷托盘或培养皿上,再盖两层滤纸,38 ℃高温催芽24 h,然后室温发芽(始终保持滤纸湿润),期间每天至少淘洗种子一次,防止处理过的种子腐烂。

2.3 发芽率和成苗率测定

由于高静水压处理后的种子发芽缓慢,出现大量透明的"玻璃芽"。在萌发一周后统计发芽率时,芽长超过种子长度一半的按发芽统计,并把发芽的种子均匀撒播于装有田泥的桶中,撒播10 d后,芽明显生长且具有绿色叶片的种苗按成活进行统计成苗率。发芽率和成苗率按以下公式计算:发芽率=发芽的种子数/总粒数,成苗率=移栽桶中成活的幼苗数/总粒数。

2.4 同工酶测定

2.4.1 酶液的提取

分别取静水高压处理后3、5、10 d的水稻种子3粒(去壳),加提取液200 μl(0.03 mol/l、pH=8.0的Tris-马来酸;0.1%巯基乙醇),冰浴研磨,用200 μl提取液淋洗转入0.5 ml的离心管中,在Eppendorf Centrifuge 5402离心机上4 ℃、10000 g离心10 min,上清液置冰箱备用,对照设3个重复,处理设6个重复。蛋白质含量的测定按Bradford的测定方法进行[8]。

2.4.2 垂直板不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳

垂直板不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳按照孙立新等[9]的方法进行,浓缩胶4%,分离胶7.5%,加样时每孔样品含蛋白质量相等。染色后凝胶在UVP系统下拍照、封胶、晾干保存。

3 结果与分析

3.1 高静水压力对水稻种子发芽率和成苗率的影响

3.1.1 不同压力对水稻种子发芽率和成苗率的影响

利用不同的静水压力处理浸种的水稻粤香占种子,其发芽率和成苗率发生明显变化(图1)。50 MPa下处理的发芽率和成苗率相比对照(0 MPa)分别下降了2%和71%,75 MPa分别下降了14.5%和71%,当压力达100 MPa时,发芽率和成苗率急剧下降至未处理对照的4%和1%。表明水稻种子受高压处理后,随着静水压力的增加,其发芽率和成苗率逐渐下降,但成苗率下降优为明显。

3.1.2 不同保压时间对水稻种子发芽率和成苗率的影响

由图2知,75 MPa静水压力处理0至8 h,发芽率和成苗率几乎呈直线下降,但处理16 h时,发芽率和成苗率较处理8 h有所增加,处理16 h后,发芽率和成苗率又下降,处理约46 h时水稻粤香占种子的发芽率和成苗率几乎为零。

3.1.3 静水高压对不同水稻品种发芽率的影响

不同类型水稻品种种子浸种10 h后,在75 MPa高静水压条件下处理10 h,结果发现所有品种的发芽率和成苗率都下降(图3),籼稻品种南京11和粤香占的发芽率较对照下降最大(分别下降68.5%和44.4%),成苗率下降非常明显,分别下降了93.4%和91.5%;而Bulu稻(Bulu Gendjah和Bulu Rusa)

的发芽率下降相对较小(12.42%和 12.46%),成苗率较对照分别下降 46.38%和 44.52%;粳稻秋光和台中 65 的发芽率和成苗率下降最小,发芽率仅分别下降了 15%和 6.38%,成苗率分别下降了 34.5%和 33.16%。这说明籼型水稻南京 11 和粤香占的耐压性最弱,粳型水稻秋光和台中 65 最强,中间型 Bulu 水稻 Bulu Gendjah 和 Bulu Rusa 居中。

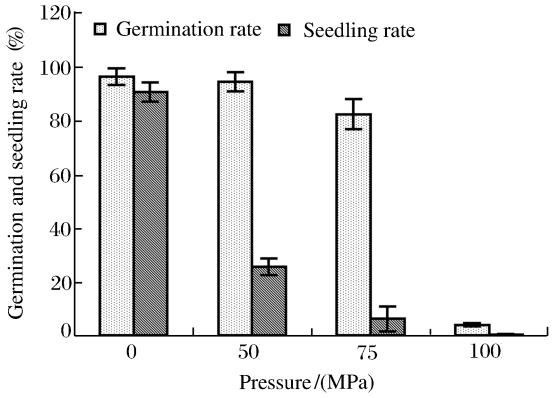


图 1　不同静水压力对水稻种子发芽率和成苗率的影响

Fig. 1　Effect of high hydrostatic pressure on germination rate and seedling rate in rice seeds

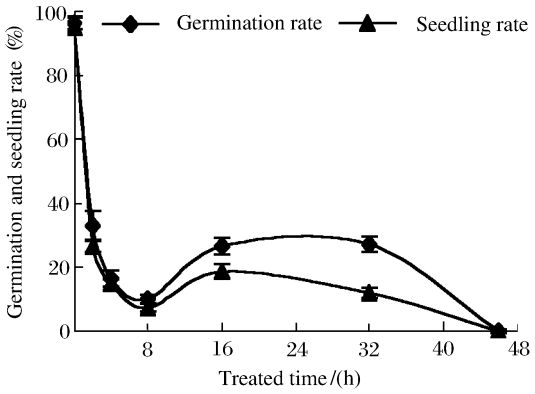


图 2　不同保压时间对水稻种子发芽率和成苗率的影响

Fig. 2　Effect of different treated time by high hydrostatic pressure for on germination rate and seedling rate in rice seeds

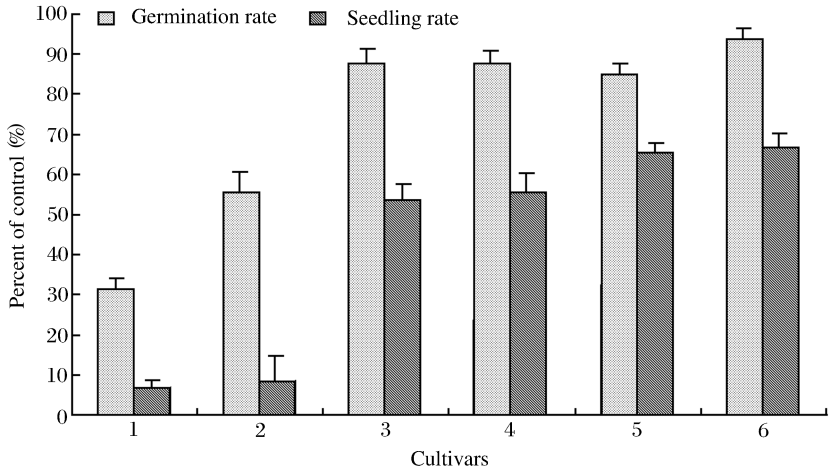


图 3　静水高压对不同品种发芽率和成苗率的影响

1. 南京 11;2. 粤香占(籼稻);3. Bulu Gendjah;4. Bulu Rusa(中间类型);5. 秋光;6. 台中 65(粳稻)

Fig. 3　Effect of high hydrostatic pressure on germination rate and seedling rate in different rice cultivars

1. Nanjing 11;2. Yuexiangzhan(Indica Rice);3. Bulu Gendjah;4. Bulu Rusa (Transition Type);
5. Qiuguang;6. Taizhong 65 (Japonice Rice)

3.2　静水压力对水稻苗期生长的影响

3.2.1　不同压力对水稻苗期的影响

对不同静水压力处理后萌发的秧苗,进行为期 30 天 d 的株高跟踪调查,结果发现,静水高压处理严重抑制了水稻幼苗前期的生长(图 4),在幼苗生长的前 20 d,处理的幼苗株高一直低于未处理的对照,

且随着压力的增加，这种抑制程度有增加的趋势，但是在 20～25 d，处理的幼苗株高增加较对照快，25 d 以后高静水压处理后的幼苗植株赶上对照，高压对植株的生长抑制效应消失。

3.2.2 *不同保压时间对水稻幼苗生长的影响*

从图 5 可以看出，在处理后 25 d 以前，随着保压时间的延长，水稻幼苗生长受的影响有明显增加的趋势，但随着生长天数的增加，株高的差异逐渐缩小，在生长大约 30 d，处理的幼苗和对照在株高上的差异消失。

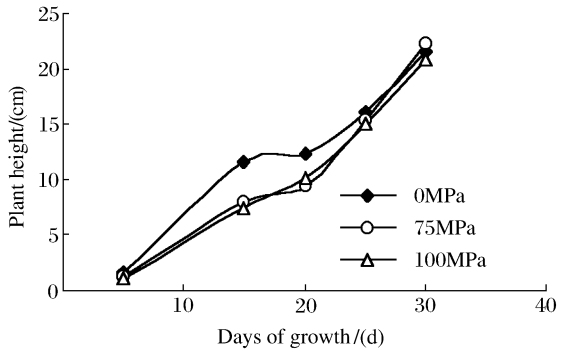


图 4 不同静水压力对水稻幼苗生长的影响

Fig. 4 Effect of high hydrostatic pressure on rice seedling growth

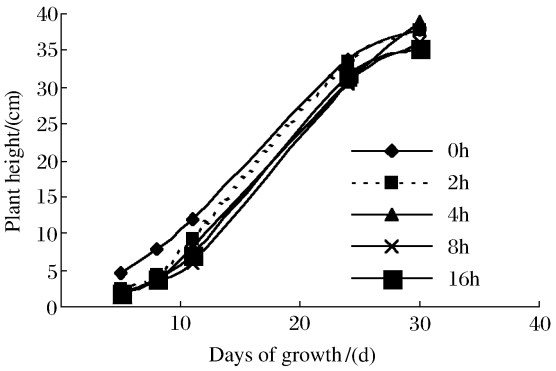


图 5 不同保压时间对水稻幼苗生长的影响

Fig. 5 Effect of different treated time by high hydrostatic pressure on rice seedling growth

3.3 高静水压对水稻种子萌发时同工酶表达的影响

水稻粤香占种子处理后 3 d，处理比对照少一条酯酶同工酶带(图 6 (a))，而且处理的酶带比对照的要弱，表明部分同工酶的表达量比对照少，随着萌发时间的延长，酯酶的表达逐渐加强；当处理后 5 d 时，处理后 3 d 时较对照缺少的那条带开始出现(图 6(b))，当处理后 10 d 时，这条酶带清晰可见，此时的酶谱与对照在条带数和表达量上均无明显差异(图 6(c))。同时对 POX、SOD 和 MAL 等同工酶的研究显示，这些酶在这几个时期与对照相比，都没有明显差异。这一结果表明静水高压处理影响了酯酶同工酶(EST)的表达，但对 POX、SOD 和 MAL 等同工酶的表达没有明显的影响。

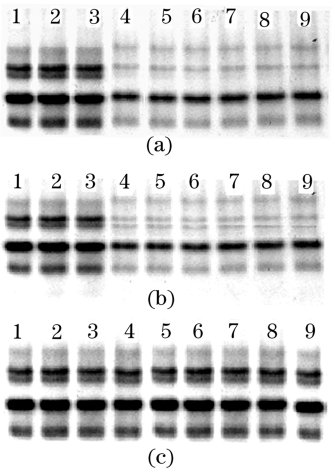


图 6 静水高压处理后酯酶的聚丙烯酰胺凝胶酶谱 (a)、(b)、(c)分别为处理后 3、5、10 d 水稻幼苗酯酶同工酶酶谱(1～3：对照；4～9：高静水压处理)

Fig. 6 Zymogram of EST with poly-acrylamide gel after the rice seeds were treated by high hydrostatic pressure (a), (b) and (c) are the EST Zymogram of the 3th, 5th and 10th rice seedlings; (1～3: Control; 4～9: Treated by high hydrostatic pressure)

4 讨 论

水稻种子的萌发要经过一个吸水膨胀、露白和萌发三个阶段，一般影响种子发芽的外界因素包括温度、湿度和氧气等[10]。水稻粤香占种子无论是在不同压力处理还是在不同保压时间条件下，由于静水高压破坏程度不同和种子活力个体间存在差异，所以部分种子失去活性不能发芽，部分种子却能够

逐渐修复静水高压的破坏作用,最终发芽、成苗和生长,并追上对照(图 4 和图 5)。产生这一结果的原因与静水高压破坏了种子的细胞膜、细胞显微结构有关(另文发表),更重要的生理原因,可能与生物体内的生化反应是在一定的温度和压力环境条件下进行的,萌动的种子处在静水高压的环境下,会改变一些化学反应的速度和平衡,抑制了与种子萌动、幼苗生长等相关的酶的表达(如文中的酯酶同工酶),当解除高静水压这一逆境胁迫后,生物的自身修复功能逐渐消除高静水压带来的抑制作用。至于种子不浸种直接保压不同时间,发芽率和成苗率在处理 0～16 h 出现"峰值"现象,其具体原因尚不清楚,我们正在探索中。相同的高静水压处理条件对不同类型水稻种子的发芽率和成苗率影响不同,粳型水稻品种秋光和台中 65 表现出了比籼型品种南京 11 和粤香占具有更高的耐压性,中间类型的 Bulu 稻(Bulu Gendjah 和 Bulu Rusa)居于二者之间,这可能是因为其本身的品种特性所决定的。目前的研究表明,粳稻比籼稻具有更高的抗逆境能力[11],而高静水压处理对水稻种子的萌发也是一种逆境条件,这可能是粳稻比籼稻具有耐高压性的原因之一,具体机理还有待于从代谢途径和遗传物质表达方面进行进一步研究。

植物种子的萌发及其幼苗的生长是一个复杂的生命过程,有多种酶,如淀粉酶、酯酶、过氧化物酶等参与了这一过程[12]。酶作为蛋白质的一种,是基因表达的产物和生物体内各种生化反应的催化剂,在生物新陈代谢过程中有至关重要的作用[13]。Panick 等[14]和 Desai[15]利用静水高压处理 RNA 酶和 trp 阻遏物,结果发现高压对它们的解叠和重折叠具有明显的诱变作用。Kayo 等[16]对深海中细菌 Shewaneua sp DB6075 和 Shewaneua sp DSS12 的天门冬氨酸 β-D 半醛脱氢酶基因(ASD)进行克隆与测序,发现 DB6075 中的 ASD 基因只有在高压条件下才能表达,而 DSS12 中的 ASD 基因在任何压力下均能表达。Malone 等[17]利用高压处理后的细胞榨出液进行聚丙烯酰胺凝胶双向电泳,出现两条水解酶的特征带,表明高压激活了细胞内部部分水解酶,因此推断这是细胞膜透性增加和细胞溶解加速的主要原因。高静水压处理水稻种子后,萌发 3 d 时酯酶同工酶明显比对照少一条带,5 d 时缺少的酶带开始出现,10 d 时与对照没有差异。这一现象表明,静水高压影响了水稻粤香占种子酯酶同工酶的表达,其机理可能与 Malone 等研究的高压激活了水解酶表达相似,而与 Kayo 研究的 ASD 基因只有在高压下才能表达相反,去除外界压力,部分酯酶基因才能表达。酯酶同工酶是催化酯类化合物水解的酶,它催化羧酸酯类的酯键的水解和合成,水解产物直接或间接进入三羧酸循环等重要新陈代谢环节,对植物的生长和发育具有非常重要的作用。水稻酯酶同工酶的遗传学研究表明,水稻有 1^A、6^A、7^A、12^A 和 13^A 五条酯酶主带,由三个位点 7 个等位基因操纵[18]。萌发 5 d 以前处理明显比对照少一条酶带(图 6),说明静水高压可能影响了等位基因的表达,这可能是高压处理后水稻种子发芽率和成苗率显著降低的重要生理原因。Siegal 等曾经指出,环境对作物生长发育的影响是通过诱发酶的变化来实现的[19]。我们以前的研究表明,高静水压可以诱变水稻产生变异,并进行了突变体的筛选和光合特性等的研究,发现高压不但影响水稻当代的光合特性,而且对后代的生理特性和遗传变异产生影响[20～22]。高静水压是否也存在"静水高压(外界)→基因→酶→代谢→结构与功能→生物学效应产生"这一新的诱变途径,还有待于进一步深入研究。

本试验在处理材料过程中得到中国科学院广州地球化学研究所高温高压实验室律广才老师的帮助,特此致谢。

References:

[1] Winter R. High Pressure Effects in Molecular Biophysics [A]. Proceedings of the International School of Physics "Enrico Fermi", Course CXLVII on High Pressure Phenomena [C]. Amsterdam: IOS, 2002. 413－453.

[2] Panick G, Winter R. Pressure-Induced Unfolding/Refolding of Ribonuclease A-a Statics and Kinetik Fourier-Transform Infrared Spectroscopy Study [J]. Biochemistry, 2000, 39: 1862－1869.

[3] Shantha D S, Doulas M C, Ana J, et al. High Resolution NMR Study of the Pressure-Induced Unfolding of Lysozyme [J]. Biochemistry, 1992, 31: 7773－7778.

[4] Whelch T J, Farewell A, Neidhandt F C, et al. Stress Response of E Coli to Elevated Hydrostatic Pressure [J]. J Bacteriol, 1993, 175: 7170－7177.

[5] Arroyo G, Sanz P D, Prestamo G. Effect of High Pressure on the Reduction of Microbial Populations in Vegetables [J]. J Appl Microbiol, 1997, 82 (6): 735－742.

[6] Xu S P, Liao Y P, Weng K N, et al. Pressure Induced Rice Mutation and Effects of High Hydrostatic Pressure on the Growth and Development of Rice [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2001, 15(4): 241－247. (in Chinese)
徐世平, 廖耀平, 翁克难, 等. 水稻压致变异和高压对水稻生长发育的影响 [J]. 高压物理学报, 2001, 15(4): 241－247.

[7] Xu S P, Liao Y P, Xiao W S, et al. Effects of High Pressure on the Growth and Development of Rice [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 1999, 13(Suppl): 58－63. (in Chinese)
徐世平, 廖耀平, 肖万生, 等, 高压对水稻生长发育的影响 [J]. 高压物理学报, 1999, 13(增刊): 58－63.

[8] Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248－254.

[9] Sun X L, Cai H W, Wang X K. A Method for Studing Electrophoretic Variation of Isozymess in Rice with Poly-Acrylamide Gel [J]. Chinese Journal Rice Science, 1996, 10(1): 43－50. (in Chinese)
孙新立, 才宏伟, 王象坤. 水稻同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳方法探索 [J]. 中国水稻科学, 1996, 10(1): 43－50.

[10] Pan R C. The Rice Physiology [M]. Beijing: Science Press, 1979. 218－224. (in Chinese)
潘瑞炽. 水稻生理 [M]. 北京: 科学出版社, 1979. 218－224.

[11] Jiao D M, Ji B H. Changes of the Photosynthetic Electron Transport and Pthotosynthetic Enzyme Activities of Two Rice Varieties under Photooxidation Condition [J]. Acta Agronomica Sinica, 1996, 22(1): 43－49. (in Chinese)
焦德茂, 季本华. 光氧化条件下两个水稻品种光合电子传递和光合酶活性的变化 [J]. 作物学报, 1996, 22(1): 43－49.

[12] Pan R C, Ji B H. Plant Physiology (3rd ed) [M]. Beijing: High Education Press, 1998: 237－240. (in Chinese)
潘瑞炽, 董愚得. 植物生理学(第3版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1995. 237－240.

[13] Shen T, Wang J Y. Plant Biochemistry (2nd ed) [M]. Beijing: High Education Press, 1990. 234－236. (in Chinese)
沈 同, 王镜岩. 生物化学. 上册(第2版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990. 234－236.

[14] Panick G, Winter R. Pressure-Induced Unfolding/Refolding of Ribonuclease a－a Static and Kinetik Fourier-Transform Infrared Spectroscopy Study [J]. Biochemistry, 2000, 39: 1862－1869.

[15] Desai G, Panick G, Zein M, et al. Pressure-Jump Studies of the Folding/Unfolding of *trp* Repressor [J]. J Mol Biol, 1999, 288: 461－475.

[16] Kayo C, Smorawinaka M, Li L, et al. Comparison of the Gene Expression of Aspartate Bate-D-Smialdehyde Dehydrogenase at Elevated Hydrostatic Pressure in Deep-Sea [J]. Bacteria J Biochem, 1997, 121(4): 717－723.

[17] Malone A S, Shellhammer T H, Courtney P D. Effects of High Pressure on the Viability, Morphology, Lysis, and Cell Wall Hydrolase Activity of Lactococcus Lactis Subsp Cremoris [J]. Appl Environ Microb, 2002, 68(9): 4357－4363.

[18] Hu N S, Wan G X. The Technology and Application of Isoenzyme [M]. Changsha: Hunan Technology Press, 1985. 96－99. (in Chinese)
胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985. 96－99.

[19] Siegal B Z, Galston A W. The Isoperoxidases of Pisum Sativum [J]. Plant Physiol, 1967, 42: 221－226.

[20] Bai C K, Li G S, Peng C L, et al. Preliminary Study of Rice Mutants Induced by High Hydrostatic Pressure [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2003, 11(2): 132－136. (in Chinese)
白成科, 李桂双, 彭长连, 等. 高静水压诱导水稻变异的初步研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(2): 132－136.

[21] Bai C K, Li G S, Peng C L, et al. High Hydrostatic Pressure Induced Changes of Chlorophyll Fluorescence Rice Mutant Lines [J]. Chinese Journal Rice Sciene, 2003, 17(3): 228－232. (in Chinese)

白成科,李桂双,彭长连,等.高静水压诱变水稻突变株系的叶绿素荧光特性变化[J].中国水稻科学,2003,17(3):228－232.

[22] Li G S,Bai C K,Duan J. Effect of High Hydrostatic Pressure Treatment on Physiological Characteristics of Rice Plants (Oryza sativa L.) [J]. Chinese Journalof High Pressure Physics,2003,17(2):122－128. (in Chinese)
李桂双,白成科,段　俊,等.静水高压处理对水稻植株生理特性的影响[J].高压物理学报,2003,17(2):122－128.

Effect of High Hydrostatic Pressure on Seeds Germination and Seedling Isoenzyme in Rice(Oryza sativa L.)

BAI Cheng-Ke[1],LI Gui-Shuang[1],DUAN Jun[1],PENG Chang-Lian[1]
DUAN Zhong-Gang[1],WENG Ke-Nan[2],XU Shi-Ping[2]

(1. *South China Institute of Botany,Chinese Academy of Sciences,Guangzhou* 510650,*China*;
2. *Guangzhou Institute of Geochemistry,Chinese Academy of Sciences,Guangzhou* 510640,*China*)

Abstract: Three indica rice cultivars seeds, Yuexiangzhan were treated by different high hydrostatic pressure or were kept for different time. As comparison to control, both germination rate and seedling rate decreased considerably with pressure or treated time increasing. Plant growth was inhibited in treated materials during the early growth stage of seedling, but the plant height of treated cultivars could exceed that of control after sowing 30 d. The expression of some isoenzymes, esterase(EST), peroxidase(POX), superoxide dismutase(SOD) and malic enzyme(ME), was studied by polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE), the results indicated that the expression of EST was restrained, whereas the other isoenzymes was affected lettle on expression of POX, SOD and ME. Three types of rice (Oryza sativa L.) cultivars seeds, indica cultivars(Nanjing 11 and Yuexiangzhan), japonica cultivars (Qiuguang and Taizhong 65) and intermediate type between indica cultivars and japonoca cultivars (Bulu Gendjah and Bulu Rusa), were treated by 75 MPa pressure for 10 h. The germination rate and seedling rate of three types rice all decreased. But the decrease was most significant in two indica cultivars(Nanjing 11 and Yuexiangzhan), whereas was least in two japonica cultivars(Qiuguang and Taizhong 65). The results implied that different types of rice cultivars exhibited different responses to high hydrostatic pressure. Japinica cultivars were higher resistance to high pressure than other types of cultivars. The above results showed that high hydrostatic pressure could affect the seeds germination, seedling growth and expression of EST.

Key words: high hydrostatic pressure; rice seeds; isoenzyme