

甲基紫精抑制水稻种子活力和幼苗生长

林桂珠 彭长连 林植芳

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 5-10 $\mu\text{mol/L}$ 的甲基紫精(MV)处理未吸胀或已萌动的杂交水稻种子1 d后, 种子发芽率与对照差异不大, 但活力指数和伸长生长受到显著抑制, 尤其胚根的生长受抑更甚, 使胚芽/胚根长度比值提高1.4-11.0倍。组织的电解质渗漏率增大, 胚芽鞘不能转绿, 仅含少量或几乎不含叶绿素, 随后逐步死亡。MV处理三叶期叶片切段或完整幼苗根部皆引起膜渗漏, 叶绿素降解, 光合速率下降和呼吸速率上升。杂交稻“优杂”对MV的敏感性稍低于父本“七桂早”和母本“Lemont”, 与“Lemont”较接近。MV既可降解已形成的叶绿素又可抑制叶绿素的形成。

关键词 甲基紫精; 水稻; 种子活力; 胚芽鞘失绿现象; 叶绿素氧化褪色

中图分类号 Q945.3

THE INHIBITION OF SEED VIGOR AND SEEDLING GROWTH OF RICE BY METHYL VIOLOGEN

Lin Guizhu Peng Changlian Lin Zhifang

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract Dry or germinated seeds from hybrid rice “Youza” and its parents “Qiguizao” (δ) and “Lemont” (σ) were treated by 5-10 $\mu\text{mol/L}$ of methyl viologen (MV) for 24 hours. Seed vigor and seedling growth were inhibited pronouncedly but germination rate was not disturbed. The ratio of coleoptile/radicle length increased by 1.4- to 11.0-fold over the control because the depression of radicle growth was more serious than that of plumule. Tissue electrolyte leakage was enhanced and subsequent greening did not occur, then seedlings were dead in the following few days. MV treatment with leaf segments or roots of intact rice seedlings at 3-leaf stage caused membrane leakage, chlorophyll degradation, the decline of photosynthesis and the increase of dark respiration. The response of hybrid rice Youza to MV was slightly less susceptible than its parents. The results suggest that MV can enter the different organs of rice and display its toxicity. MV seems to induce not only the oxidative degradation of chlorophyll but also the limitation of chlorophyll formation.

Key words Methyl viologen; Rice; Seed vigor; Chlorosis phenomenon of coleoptile; Oxidative bleaching of chlorophyll

甲基紫精 (Methyl viologen, 简称 MV) 是除草剂百草枯 (paraquat) 的有效成份, 可导致植物形成超氧自由基 $O_2^{\cdot-}$ 的外源氧化剂。MV 对植物的毒性在于可从叶绿体 PSI 还原端和线粒体电子传递链上接受电子并将其传递给氧分子, 从而加速了 $O_2^{\cdot-}$ 产生, 再通过一系列复杂反应, 促使 $OH\cdot$ 的形成, 诱导细胞内出现氧化逆境^[1-3]。Babbs 等已较详细地描述了 MV (或 paraquat) 诱导自由基产生的模式^[1]。我们也在经 MV 处理的水稻、玉米、甘蔗等叶片中检测到 $O_2^{\cdot-}$ 产生与 MV 施用浓度的关系 (另文发表)。Salin 指出由于 MV 作除草剂的广泛用途, 在氧自由基和氧中间产物的产生中担负着重要的生理作用^[4], 因而多年来关于 MV 作用机理及植物对其抗性机理的研究倍受关注。过去的研究皆以叶片和离体细胞或叶绿体为对象, 未注意 MV 对种子萌发生长的可能影响。Fuerst 和 Vaughn 认为 paraquat 仅施用于叶片才具有除草活性, 它在植物中没有出现大量的转运^[5], 随后 Hart 等用 ^{14}C 标记的 paraquat 处理完整玉米幼苗的根部, 发现其进入根细胞后约有 5%—6.4% 可转运到地上部^[6]。本文以适应于高光并具有高产优质特性的杂交水稻“优杂”及其具有不同光生态型的亲本为材料, 探讨种子经 MV 处理后, 种子活力、幼苗生长及一些生理特性的变化, 并相应以叶片和完整幼苗根部的 MV 处理为佐证, 比较不同水稻品种对 MV 敏感性差别。

1 材料与方法

植物材料 杂交水稻“优杂” (hybrid rice Youza), 父本七桂早 (Qiguizao, ♂), 母本 Lemont (美国稻, ♀) 的种子由广东省农业科学院水稻研究所屠曾平研究员惠赠。

MV 处理 干种子或已萌动露白的种子用 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ MV 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 24 h。部分试验则将三叶期的完整幼苗根部或叶片切段浸于 10 $\mu\text{mol/L}$ MV 溶液中。以未处理的种子为对照。

测定方法 用简化活力指数 (发芽率 \times 根长 cm) 表示种子活力。用 80% 丙酮提取液测定叶绿素含量。组织浸出液在煮沸前后用 DDS-11 电导率仪测定电导度, 其相对百分率表示膜的渗漏状况。用氧电极法测定光合和呼吸速率, 25 $^{\circ}\text{C}$, 光合速率测定时的光强为 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

2 实验结果

2.1 MV 对水稻种子发芽率、种子活力和幼苗生长的影响

3种水稻种子的发芽率几乎不受 MV 的影响, 但种子活力显著降低, 受抑幅度达 70%—91% (表 1), 10 $\mu\text{mol/L}$ MV 对种子活力的抑制比 5 $\mu\text{mol/L}$ MV 大。萌发 4 d 的胚根生长受 MV 抑制的程度大于胚芽鞘, 因而胚芽鞘长度/胚根长度比值比对照高了 1.4—3.7 倍。

已萌动的水稻种子比干种子对 MV 处理更为敏感, 处理 24 h 后胚根的生长极为缓慢, 3 d 后测定的种子活力指数仅为对照的 5%—14%。胚芽鞘的生长受 MV 影响较小, 长度约为对照的 50%—82%, 故胚芽鞘/胚根比高于对照达 3.5—11 倍 (表 2)。从表 1 与表 2 可见, 杂交稻优杂比其亲本对 MV 的敏感性较低, 与父本七桂早的差别较大, 显示了一定程度的杂交优

势。然而, 在继续培养几天后, 3种水稻的胚芽鞘一直呈黄白色, 缺乏转绿的能力, 生长停止而逐渐死亡。

表1 水稻种子吸涨过程中MV处理对发芽率、种子活力和胚芽鞘/胚根比的影响

Table 1 Effect of MV treatment on germination rate, vigor and ratio of coleoptile/radicle during seed imbibition of rice

品种 Cultivas	MV ($\mu\text{mol/L}$)	发芽率 Germination rate (%)	活力指数 Vigor index	胚根长度 Radicle length (R) (mm)	胚芽鞘长度 Coleoptile length (C) (mm)	C/R
Lemont	0	99.0	2.24(100)	22.7	9.0	0.396
	5	99.0	0.59(26.3)	6.0	10.3	1.717
	10	97.1	0.39(17.4)	4.0	7.5	1.875
七桂早	0	97.5	3.64(100)	39.1	20.9	0.535
	5	96.3	0.41(11.8)	4.4	8.2	1.864
Qiguizao	10	98.6	0.33(9.1)	3.3	8.2	2.485
	0	94.5	3.99(100)	42.2	22.9	0.543
优杂	5	87.9	1.2(30.1)	13.6	16.1	1.184
	10	92.1	0.53(13.2)	5.8	9.6	1.655

括号中的数字为相对百分率 Numbers in parentheses are relative percentages.

2.2 MV对水稻电解质渗漏率的影响

萌动种子经MV处理1 d后, 置于25℃光强 $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 下培养3 d, 分别测定胚芽鞘和胚根(带种子)部分的浸出液电导率。图1的结果看出, MV处理增大了电解质的外渗, 胚芽鞘的变化大于胚根; $5 \mu\text{mol/L}$ MV和 $10 \mu\text{mol/L}$ MV的效果相近。父本七桂早的电解质外渗率增加110%(胚芽鞘)和21%(胚根), 母本Lemont各增加34%和12%, 而杂交稻优杂则分别为60%和12%, 数值与Lemont接近。

将三叶期幼苗叶片切段用 $10 \mu\text{mol/L}$ MV于弱光下处理3d, 叶片电解质渗漏急剧增加, 电解质渗漏率是对照的5.3-5.7倍(图2)。这些结果表明, MV从种子或离体叶片切段进入水稻体内, 皆不同程度破坏膜系统的完整性, 加剧膜的电解质外渗。

2.3 MV对水稻叶绿素含量、光合速率和呼吸速率的影响

种子吸涨过程加入MV, 随后在25℃, $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光下发芽生长4 d, 测定胚芽鞘中

表2 MV处理萌动水稻种子后种子活力及胚芽鞘/胚根比的变化

Table 2 Changes in seed vigor and ratio of coleoptile/radicle after MV treatment with germinated rice seeds

品种 Cultivas	MV ($\mu\text{mol/L}$)	活力指数 Vigor index	胚根长度 Radicle length (R) (mm)	胚芽鞘长度 Coleoptile length (C) (mm)	C/R
Lemont	0	1.85(100)	18.5	6.8	0.367
	5	0.18(9.7)	1.8	5.6	3.111
	10	0.10(5.0)	1.0	4.4	4.400
七桂早	0	2.13(100)	21.3	8.5	0.399
	5	0.14(6.6)	1.4	5.1	3.642
Qiguizao	10	0.10(4.7)	1.0	3.9	3.900
	0	2.02(100)	20.2	9.8	0.485
优杂	5	0.29(14.4)	2.9	6.4	2.206
	10	0.15(7.4)	1.5	5.6	3.733

刚露白的萌动种子在MV溶液中处理1 d, 移到蒸馏水中培养2 d后测种子活力指数; 括号内的数字是相对百分率。Germinated seeds were treated by MV for 1 d, seed vigor index was determined after incubating in distilled water for another two days. Numbers in the parentheses are the relative percentages.

的叶绿素含量。表 3 可见, MV 抑制了叶绿素的合成, 其效应随浓度增高而加强。与对照相比, Lemont 只含有 40%–69% 的叶绿素, 10 $\mu\text{mol/L}$ MV 使七桂早和杂交稻优杂几乎不含叶绿素, 但 5 $\mu\text{mol/L}$ MV 作用下仍含少量叶绿素, 且优杂的叶绿素相对量比七桂早高。三叶期的幼苗成熟绿叶经 10 $\mu\text{mol/L}$ MV 在光下处理 2 d, 同样看到叶绿素含量的明显下降(图 3 A), 但这种变化是 MV 导致叶绿素光氧化降解而呈现褪绿现象。

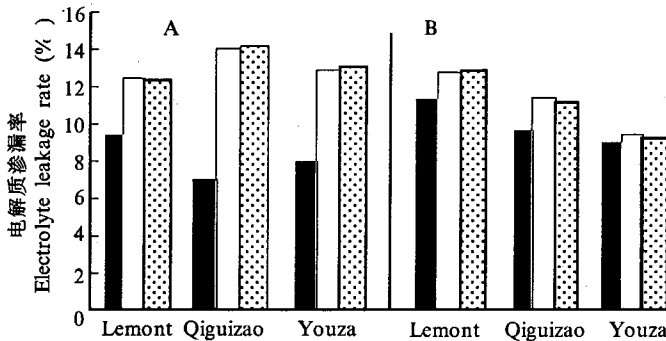


图 1 MV 处理萌动种子后 3 d 水稻胚芽鞘(A) 和胚根(B) 电解质渗漏率的变化

Fig. 1 Changes in electrolyte leakage rate in coleoptile (A) and radicle (B) after 3 days treatments of germinated rice seeds with MV 5 $\mu\text{mol/L}$ (□) and 10 $\mu\text{mol/L}$ (▤) compared to the control (■)

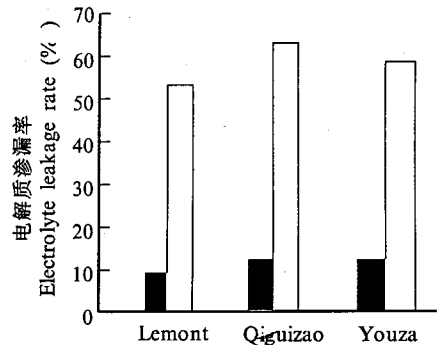


图 2 MV 处理 3 d 对水稻幼苗叶片电解质渗漏的影响

Fig. 2 Effect of 10 $\mu\text{mol/L}$ MV treated for 3 days on electrolyte leakage rate in leaves of rice seedlings ■ Control; □ MV

表 3 MV 对胚芽鞘中叶绿素含量的影响

Table 3 Effect of MV on chlorophyll content in coleoptile

品种 Cultivas	MV ($\mu\text{mol/L}$)	叶绿素含量 Chlorophyll content	
		($\mu\text{g g}^{-1}\text{FW}$)	%
Lemont	0	25.6	100.0
	5	17.7	69.1
	10	10.1	39.5
七桂早	0	68.2	100.0
	5	7.30	10.7
Qiguizao	10	4.10	6.0
	0	79.0	100.0
Youza	5	21.4	27.1
	10	0.50	0.60

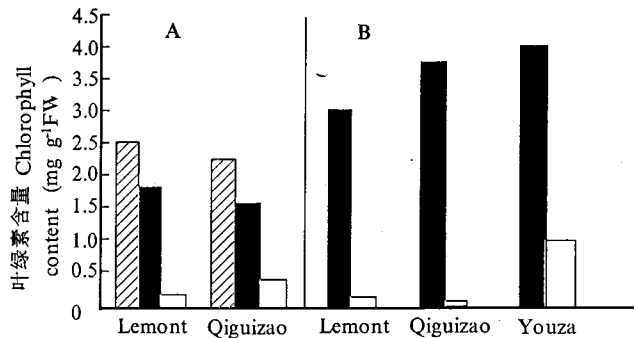


图 3 MV 诱导离体叶片(A) 和连体叶片(B) 中叶绿素的降解

Fig. 3 Chlorophyll degradation in detached leaf segment (A) and attached leaves (B) induced by MV

A. 叶片切段置于 10 $\mu\text{mol/L}$ MV 溶液中, Leaf segments were floated on 10 $\mu\text{mol/L}$ MV solution; B. 10 $\mu\text{mol/L}$ MV 作根系处理, Roots of seedlings were treated by 10 $\mu\text{mol/L}$ MV

▨ 处理前 Before treatment; ■ Control-水对照 Incubating in the distilled water; □ MV

完整的三叶期幼苗根系浸于 10 $\mu\text{mol/L}$ MV 中 2 d, 三种水稻的叶绿素含量也显著降低(图 3B), 说明 MV 经根部吸收后可运转到叶片与其作用部位结合。与此相应, 光合速率受抑 3.6%–45.6%(图 4A)。杂种稻在此条件下显示对 MV 较低的敏感性, 而 Lemont 的光合速率下降百分率最高, 与用种子或离体叶片处理时的敏感性低于七桂早的结果不同。

MV 刺激幼苗根系的呼吸, 分别比对照提高 62% (Lemont)、19% (七桂早) 和 17% (优杂)。Lemont 和七桂早叶片的呼吸速率略有提高, 优杂却下降 11% (图 4B)。MV 对根呼吸的影响大于叶片, 可能是根系首先和直接接触 MV 之故。Lemont 呼吸的促进也许是其光合速率下降最大的原因之一。

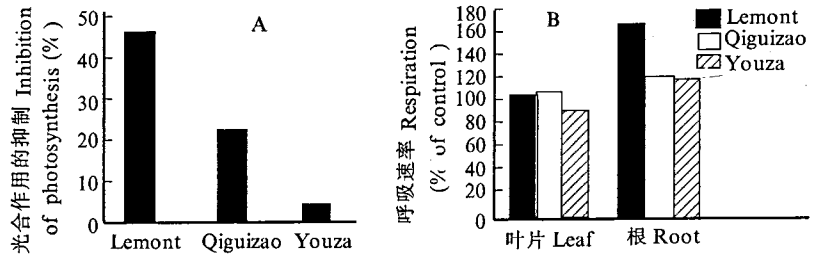


图4 MV 诱导光合速率(A)和呼吸速率(B)的变化(MV 作幼苗根部处理)
Fig. 4 Changes in photosynthetic rate (A) and respiratory rate (B) induced by MV 10 $\mu\text{mol/L}$ treated on the roots of the seedlings

3 讨论

水稻种子吸涨过程中进入体内的 MV 不影响其发芽率, 表明 MV 不抑制水稻种子吸水和萌发的启动, 即不影响与萌发有关的生理生化过程。然而, 已萌发种子中残留的 MV 或萌发后新进入的 MV 皆显著地抑制种子活力、幼苗生长和胚芽鞘中叶绿素的形成。生长的迟滞和缺乏进行光合作用的叶绿素使其趋于死亡。由于通常的黄化苗在暗中可由胚乳供应养分而生长, 因此, 我们推测 MV 可能使水稻种子胚乳中物质运转或新生芽与根的合成能力的某一环节上出现了障碍而使其难以继续生长存活。MV 引起叶片叶绿素降解是已知的现象^[7,8], 而 MV 阻碍胚芽鞘转绿, 即抑制叶绿素形成却是本文中首次观察到的结果。

Powles 和 Cornic 曾报告叶绿体膜对 paraquat 的半透性很大, 而原生质体却有低的敏感性^[9]。我们的实验发现 MV 从种子、根系和叶片等不同途径进入体内, 皆可引发色素水平的变化、膜渗漏、呼吸增强和光合速率的降低, 表明 MV 较易扩散和吸收, 并可转运到光合器官中。处于活跃生命活动状态的萌动种子或活跃生长的幼苗及叶片, 对 MV 的敏感性比干种子大, 其损伤程度较高, 可能与前者吸收较多 MV 及其作用时有光的参与有关。

杂交稻优杂对 MV 的响应敏感性比亲本低, 显示了其抗氧化特性上的生理优势。低光适应性生态型的七桂早在各项研究指标上受 MV 影响较大, 高光适应性生态型的 Lemont 的变化居中。这似乎反映耐高光性与对 MV 的耐性之间有一定内在的联系。许长城等报道 Lemont 叶片对 paraquat, 强光和低温、脱水等的忍耐力均比另一水稻品种桂朝 2 号高, 显示了交叉适应性^[8], 本文的结果与其相近。植物对 MV 的响应受进入体内并达到作用位点的 MV 剂量所调控。paraquat 是高极性的二价阳离子, 可通过离子相互作用或与多胺共用一种转运蛋白质载体而进入细胞成份之中^[3,4]。在完整幼苗的实验中, Lemont 根系的强烈呼吸可能有利于 MV 进入体内和在根与叶之间的转运。植物对 paraquat 的抗性机理共有五种假说, 其中对 MV 的脱毒作用最引人注目, 但也不可能是不止一种机制同时起作用^[5,10]。因此关于水稻不同品种对 MV 敏感性的差别及其机理, 仍有待深入的研究。

参考文献

- 1 Babbs C F, Pham J A, Coolbaugh R C. Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol*, 1989, 90:1267-1270

- 2 Bowler C, Van Montagu M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43:83-116
- 3 Hartel H, Haseloff R F, Ebert B et al. Free radical formation in chloroplasts. Methyl viologen action. *J Photochem Photobiol*, 1992, 12:375-387
- 4 Salin M L. Chloroplast and mitochondrial mechanisms for protection against oxygen toxicity. *Free Rad Res Comms*, 1991,12-13:851-858
- 5 Fuerst E P, Vaughn K C. Mechanisms of paraquat resistance. *Weed Tech*, 1990, 4:150-156
- 6 Hart J J, DiTomaso J M, Linscott D L et al. Transport interactions between paraquat and polyamines in roots of intact maize seedlings. *Plant Physiol*, 1992, 99:1400-1405
- 7 林植芳, 彭长连, 林桂珠. 不同光合途径植物叶圆片对光氧化作用响应的比较. *植物学报*, 1998, 40(8):721-728
- 8 许长城, 樊继莲, 邹琦等. 水稻对百草枯 (paraquat) 和一些环境胁迫的交叉抗性. *作物学报*, 1996, 22(3):358-361
- 9 Powles S B, Cornic G. Mechanism of paraquat resistance in *Hordeum glaucum*. I. Studies with isolated organelles and enzymes. *Aust J Plant Physiol*, 1987, 14:81-89
- 10 Furusawa I, Tanaka K, Thanutong P. Paraquat resistant tobacco calluses with enhanced superoxide dismutase activity. *Plant Cell Physiol*, 1984, 25(7):1247-1254