

低温预处理对大豆萌芽活力及其 活性氧代谢的影响^{*}

宰学明 吴国荣 陆长梅 顾龚平 王 娜

(南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

摘要 采用低温(3—5℃)处理大豆种子(黑脐 91—1)能显著提高种子萌发率和萌芽活力,其中以处理 15 天的效果更为明显。在大豆萌发过程中,低温处理组的外渗电导率明显较对照组低,呼吸速率升高的速度较对照组更快,超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)的活性均显著高于对照,超氧阴离子(O_2^-)含量和脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的积累量均明显低于对照。表明种子萌发前经低温预处理能有效提高大豆种子萌发时活性氧代谢水平,有利于好苗、壮苗的形成。

关键词 大豆种子;低温;活力指数;活性氧代谢

中图分类号 S565.01 **文献标识码** A **文章编号** 1000—9841(2001)03—0163—04

大豆种子储藏期间,活力容易下降,萌发率降低,幼苗生长缓慢。为了提高播种质量,获得齐苗、壮苗,探索提高大豆萌芽活力的方法具有理论和实践上的意义。

许多种子需经过一段时间的低温处理有助于打破休眠。有报道,经低温处理的种子 DNA 的模板活性、合成能力及 RNA 转录活性均获提高, RNA 聚合酶和一些水解酶活性也会增加^[1]。还有研究提出:种子萌发过程中,物质和能量代谢旺盛,呼吸作用强烈,极易产生大量的活性氧,对细胞膜的稳定性影响极大^[2];在种子萌发过程中,自由基的产生及其引起的脂质过氧化反应等是种子活力降低的主要原因之一^[3]。因此诱导提高种子的活性氧代谢能力有利于种子的萌发^[4]。

本试验在大豆种子吸水萌发前进行低温处理,测定种子萌发过程中超氧阴离子(O_2^-)的形成和脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的积累,观察幼苗活力和膜透性的变化,动态追踪有关活性氧清除酶的活性,探讨低温预处理对大豆种子萌发过程中活性氧代谢与幼苗活力的内在联系。

1 材料和方法

1.1 材料

大豆(*Glycine max*)黑脐 91—1,江苏省农科院蔬菜研究所提供(室内自然条件下储藏一年)。

1.2 低温预处理

将种子盛入密闭容器内,置于 3~5℃低温下分别处理 5 天、10 天、15 天后,进行萌发试验。以未进行低温处理的种子作对照。

1.3 萌发实验

对照和每种处理条件均设 3 个平行组,随机取样,每组 30 粒,排列在铺有滤纸的同一规格培养皿内,每个培养皿中加 30ml 水,恒温箱(23℃±1℃)中避光萌发。萌发 5 天后,记录萌发率,测量胚根一下胚轴总长,以两者乘积计算活力指数。实验结果显示,低温处理 15 天的试验组与对照组相比,差异最为明显,故以低温处理 15 天的试验组为主,分别取吸水萌发 1、2、3、4、5、6 天的试验组及对照组的幼苗为材料,去种皮测定有关生理参数。

1.4 测定项目及方法

外渗电导率的测定参照陈光仪方法^[5],将萌发的种子用蒸馏水洗 3 次凉干,称取 10g 置小烧杯中,用 30ml 蒸馏水浸泡,以 DDS—11A 型电导仪测定其浸泡液电导率。

呼吸速率的测定参照碱吸收法^[6],在 21℃测定

* 收稿日期:2000—12—04

基金项目:江苏省科委技术委员会自然科学基金项目:(1998SWXOSZ001)

作者简介:宰学明(1968—),男,硕士研究生,主要从事植物生理生化方面的研究。

萌发种子呼吸释放的CO₂含量。

可溶性蛋白含量的测定参照Bradford的考马斯亮蓝G—250染色法^[7],以标准牛血清白蛋白(BSA)作标准曲线。

超氧阴离子(O₂⁻)含量的测定参照王爱国等的方法^[8]。

丙二醛(MDA)含量的测定参照Heath等的硫代巴比妥酸(TBA)比色法^[9]。

超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定参照Stewart和Bewley的抑制NBT光化还原法^[10]。

过氧化物酶(POD)活性的测定参照李瑞智等的愈创木酚法^[11]。

所有项目的测定均重复三次,最终结果取三次试验的平均值。

2 结果与分析

2.1 低温预处理对大豆萌芽活力的影响

大豆种子经低温预处理后,萌发率与胚根—胚

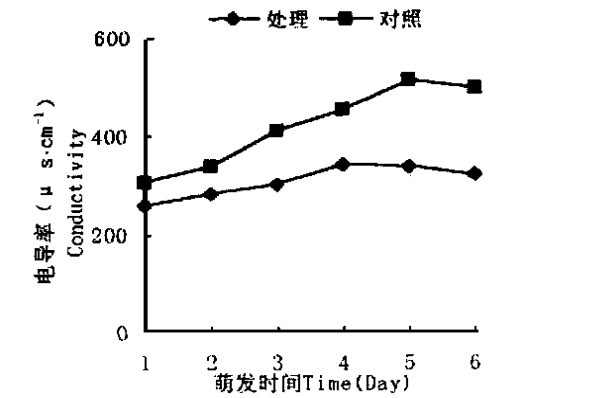


图1 大豆萌发过程中外渗电导率变化
Fig.1 Changes of conductivity during seeds germinating

2.3 低温预处理对大豆萌芽呼吸作用的影响

大豆种子萌发过程中,呼吸速率逐渐增强。以每毫克可溶性蛋白CO₂释放量计的呼吸速率,试验组起始值就高于对照组,且升幅明显,第4天达到峰值,此时的测定值是对照的145.5%;对照组呼吸速率上升较试验组缓慢,峰值也滞后一天(图2)表明低温处理能促进大豆萌发过程中的呼吸作用。在测定的时间范围内,试验组一直维持相对较高的呼吸强度。(图2)

2.4 低温预处理对萌芽活性氧清除酶活性的影响

超氧化物歧化酶(SOD)能歧化O₂⁻为O₂和

轴的生长量不同程度地大于对照,活力指数也较对照高。低温处理15天较10天和5天处理组效果更为明显(表1)。

表1 低温预处理对大豆幼苗活力指数的影响
Table 1 Effects of prechilling treatment (3—5℃) on the vigour index of soybean seeds

项目 Item	CK	5天	10天	15天
萌发率(%)	75.6	79.7	84.5	86.1
胚根+胚轴(cm)	1.542	1.589	1.766	2.043
活力指数	1.166	1.266	1.492	1.759

2.2 低温预处理对大豆萌芽外渗电导率的影响

低温预处理15天的大豆种子,置于蒸馏水中萌发,图1是间隔1天外渗电导率测定的结果,萌发的初期试验组和对照组外渗电导率均呈升高趋势,但同期试验组的外渗电导率明显较对照低,萌发5天的外渗电导率仅为对照的65.6%,且试验组4天后外渗电导率已开始下降,而对照组的上升持续了5天。表明低温预处理能有效减少萌发种子细胞内容物渗出,延缓膜的破损和有利于膜破损后的修复。

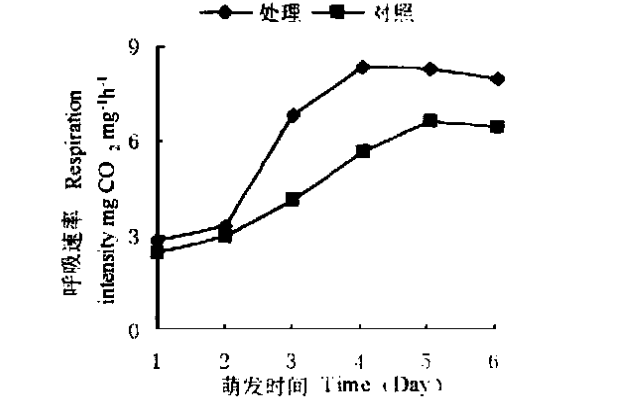


图2 大豆萌发过程中呼吸强度的变化
Fig.2 Changes of respiratory intensities during seeds germinating

H₂O₂,是活性氧清除酶体系中的关键酶。在大豆萌发过程中,以毫克蛋白计的SOD活性逐渐升高,与呼吸速率的增强协调。试验组SOD活性在萌发初期就较对照组高,且越来越明显,其峰值是对照组峰值的137%(图3)。过氧化物酶(POD)是植物体内H₂O₂的清除酶之一,与SOD协同清除机体在代谢过程中产生的活性氧。大豆种子萌发过程中POD的活性急剧升高,试验组和对照组初始值相当,但前者升幅明显较后者大,试验组第3天的测定值已经是对照的170%(图4)。

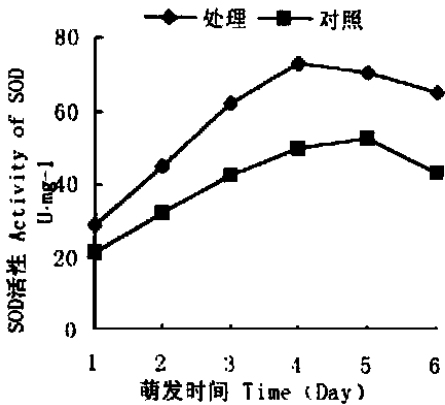


图3 大豆萌发过程中SOD活性的变化

Fig. 3 Changes of SOD activity during soybean seeds germinating

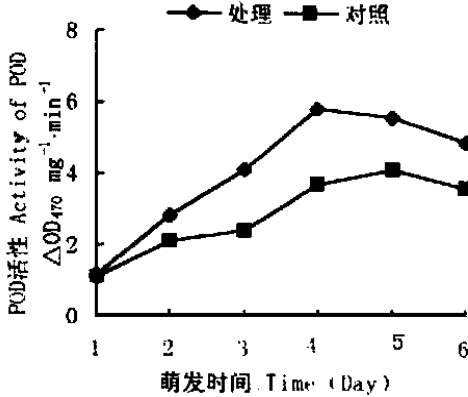


图4 大豆萌发过程中POD活性的变化

Fig. 4 Changes of POD activity during soybean seeds germinating

萌发过程中试验组 SOD、POD 活性较对照组保持明显较高的水平, 表明低温预处理有促进和提高大豆萌芽活性氧代谢水平的效应。

2.5 低温预处理对大豆萌芽 O₂^{·-} 形成和 MDA 积累的影响

随着大豆种子的萌发, 细胞内以毫克蛋白计的

O₂^{·-} 含量随呼吸强度的加大而呈逐渐升高的趋势。萌发初始时, 试验组的 O₂^{·-} 含量较对照组略高, 但在继后的萌发过程中, O₂^{·-} 含量上升的幅度明显低于对照, 试验组峰值仅为对照组峰值的 60%(图 5)。萌发第 5、6 天两者 O₂^{·-} 测定值开始下降, 表明此时 O₂^{·-} 的形成和清除逐渐趋于平衡。

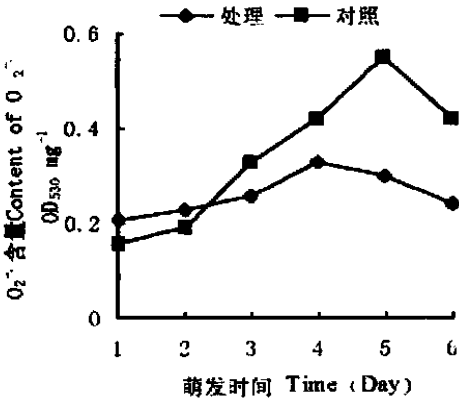


图5 大豆萌发过程中O₂^{·-}含量的变化

Fig. 5 Changes of O₂^{·-} contents during soybean seeds germinating

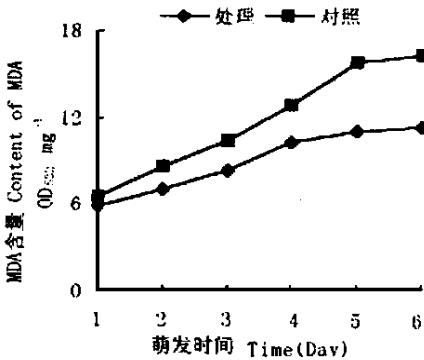


图6 大豆萌发过程中MDA含量的变化

Fig. 6 Changes of MDA contents during soybean seeds germinating

MDA 是脂质过氧化产物, 一般认为细胞内 MDA 含量的高低反映其膜系统活性氧损伤的程度^[2, 3, 4]。大豆萌芽细胞内 MDA 含量变化大体上与 O₂^{·-} 含量变化相对应, 试验组的 MDA 积累幅度明显低于对照组, 第 6 天试验组 MDA 的含量较对照低 30.7%(图 6), 与大豆萌芽外渗电导率测定的结果是吻合的。

2 讨论

试验结果显示: 大豆种子经低温处理后, 发芽率、胚根—下胚轴伸长量和萌芽活力指数均得到显

著提高; 萌芽呼吸速率的升高较对照更快; SOD、POD 等抗氧化酶活性始终处于较高的水平; O₂^{·-} 的形成和 MDA 的积累得到有效抑制, 膜系统的损伤明显减轻且修复也更及时。表明大豆种子萌发前经低温预处理, 有利于种子萌发和幼苗的生长, 是生产实践上可以参鉴使用的技术措施。

随自由基生物学的发展, 植物体内抗氧化酶的活性及其表达的调控对植物生长发育及抗逆生理的生物学意义已成为目前的研究热点之一。本实验的目的就在于观察低温处理对大豆种子萌发过程中以 SOD 为主的抗氧化酶的表达及其活性的影响, 探讨活性氧代谢水平与种子萌发、幼苗生长的内在联系。

实验结果与实验的预期目的是一致的, 低温处理能明显提高机体活性氧代谢的水平, 有效地减轻种子在吸水萌发呼吸速率急剧增加时在呼吸电子传递链上 NADH—黄素蛋白和辅酶 Q—Cytb 等位点因形成电子漏而促进 $O_2^{\cdot-}$ 的大量生成导致的膜系统活性氧损伤^[12]。SOD、POD 活性的升高包括基因的表达和酶原的激活两个方面。前人的研究报告种子经低温预处理可以诱导内源激素水平的变化, 从而提高 mRNA 转录和蛋白质合成的能力^[13]。也有报道赤霉素、激动素等植物激素对 SOD 等抗氧化酶的活性有促进诱导作用^[14]。包括氧胁迫在内的各种理化因子诱导机体内 $O_2^{\cdot-}$ 的形成, 从而促进 SOD 等抗氧化酶基因的表达和酶原的激活, $O_2^{\cdot-}$ 是逆境胁迫的产物, 又是胁迫信息传递体^[15]。在本实验中, 低温预处理萌芽的初始期 $O_2^{\cdot-}$ 的含量也高于对照, 随后 SOD 等活性升高, $O_2^{\cdot-}$ 的形成和清除才趋于平衡, 其中低温处理的时间与种子萌发时 $O_2^{\cdot-}$ 形成、抗氧化酶基因表达及萌芽激素水平调控等的内在联系, 我们正在做进一步的探讨。

参考文献

- Jarvis B. C., Frankland B., Cherry, Y. H. Increased DNA template and RNA polymerase associated with the breaking of seed dormancy [J]. *Plant Physiol.* 1968(43), 1734—1739.
- 傅爱根, 王爱国, 罗广华. 大豆萌发过程中的活性氧代谢 [J]. *热带与亚热带植物学报*, 1997, 5(4): 32—38.

- Dhindsa R. S. Drought stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis in *tortulia turalis* [J]. *Plant Physiol.* 1991, 95: 648.
- 顾龚平, 吴国荣, 陆长梅, 等. PEG 处理对大豆幼苗活力及活性氧代谢的影响 [J]. *中国油料作物学报*, 2000, 22(4): 26—30.
- 陈光仪, 傅加瑞. PEG 处理种子的条件及模拟 [J]. *种子*, 1983(3): 16—20.
- 张志良. 植物生理学实验指导 (第二版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990. 133—135.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein synthesis in *tortulia turalis* [J]. *Plant Physiol.* 1991, 95: 648.
- 王爱国, 罗广华. 植物的超氧自由基与羟胺反应的定量关系 [J]. *植物生理学通讯*, 1990(6): 55—57.
- Heath RL, Parker L. Photoperitiation in isolated chloroplasts kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation [J]. *Arch Biophys.* 1968, 25: 189—198.
- Stewart R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes [J]. *Plant physiol.* 1980, 65: 245—248.
- 李瑞智, 黄林. SO_2 对作物叶片过氧化物酶的影响 [J]. *西南师范大学学报*, 1984(3): 380—385.
- Rich P R, Bonner W D. The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria [J]. *Biochem Biophys.* 1978, 188: 20—213.
- Koller, D. Seed Biology [M]. Kozlowski, T. T (ed) Academic Press New York and London. 1972, PP. 2—101.
- Dhindsa RS, Dhindsa PP, Reid DM. Leaf senescence and lipid peroxidation; Effects of some phytohormones and scavengers of free radicals and singlet oxygen [J]. *Plant Physiol* 1982, 56: 453—457.
- 吴国荣, 陆长梅, 陶明煌, 等. 百草枯和 H_2O_2 预处理提高盐泽螺旋藻对铅的耐受性 [J]. *湖泊科学*, 2000, 12(3): 240—246.

THE EFFECTS OF PRECHILLING ON VIGOUR INDEX AND ACTIVE OXYGEN METABOLISM OF SOYBEAN SEEDS

Zai Xueming Wu Guorong Lu Changmei Gu Gongping Wang Na

(The College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract Soybean seeds were treated with prechilling (3—5 °C). Results showed that the germination rate and vigour index of soybean seeds treated increased notably, the treatment with prechilling for 15 days was the most effective. During germinating period, the conductivity rate was lower and the respiratory intensity increased more rapidly than that of the control, the activity of superoxide dismutase (SOD), and peroxidase (POD) all increased, the rate of product of $O_2^{\cdot-}$, and the accumulation of MDA were lower than those of the control. These indicated that prechilling could improve both the active oxygen metabolism and the seedling growth of soybean seeds during germinating period.

Key words Soybean seed; Prechilling treatment; Vigour index; Active oxygen metabolism