

H₂O₂ 对不同大豆品种低温萌发及主要抗氧化酶活性的影响

张立军¹, 宋广周¹, 白霜¹, 魏颖¹, 崔震海¹, 谢甫缙²

(¹沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁沈阳 110161; ²沈阳农业大学农学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要:大豆喜温,对低温敏感,播种后易遭受冷害造成减产。冷害与低温诱发植物活性氧的形成增加并抑制其清除能力有关。但研究表明当环境胁迫诱导活性氧增加的初期,也诱导清除能力的增强,H₂O₂参与这个过程的诱导。然而外源H₂O₂处理对大豆种子低温萌发的效应、对抗氧化酶活性的影响以及萌发过程中大豆种子内源H₂O₂含量的变化还不清楚。以冷敏感型大豆品种沈农8号、沈农9411和耐冷型大豆品种铁丰31、Kottman为材料,用10,20,50,100和200 mmol L⁻¹的H₂O₂进行浸种处理后,在低温(5℃)下萌发。当外源H₂O₂浓度低于50 mmol L⁻¹时,各浓度处理都提高发芽率,降低电解质外渗率,提高超氧化物酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性;当H₂O₂浓度高于50 mmol L⁻¹时,抗氧化酶活性随H₂O₂浓度的增加而降低,耐冷品种的抗氧化酶活性始终高于冷敏感品种;在萌发过程中,内源H₂O₂含量随H₂O₂处理浓度的升高而增加。表明外源H₂O₂可能通过大豆内源H₂O₂含量的提高诱导抗氧化酶活性的增强,从而减轻低温伤害,提高在低温下的萌发能力。

关键词:大豆;过氧化氢;萌发;抗氧化酶

Effect of Exogenous H₂O₂ on Germination Rate and Activities of Main Antioxidase in Soybean (*Glycine max* L.) Seedlings under Low Temperature

ZHANG Li-jun¹, SONG Guang-zhou¹, BAI Shuang¹, WEI Ying¹, CUI Zhen-hai¹, and XIE Fu-ti²

(¹College of Biological Science and Technology; ²College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning, China)

Abstract: Cold stress induces plants to produce more reactive oxygen species (ROSs), such as O₂⁻, HO[·], ¹O₂, H₂O₂. Antioxidases play an important role in scavenging ROSs. The seeds of 2 cold-resistant and 2 cold-sensitive varieties of soybean, after soaked with water, 10, 20, 50, 100 and 200 mmol L⁻¹ of H₂O₂ for 10 minutes, were distributed over three layers of sterile filter-paper embedded with the same concentrations of H₂O₂. Then the seeds were germinated under 5°C. The effects of H₂O₂ on germination rates, contents of endogenous H₂O₂, activities of antioxidantase and cell membrane permeability were determined and analyzed to discuss the mechanism of H₂O₂. 50 mmol L⁻¹ or less of H₂O₂ could increase the germination rates and inhibit the cell membrane permeability and increase antioxidantase activities under low temperature in all 4 varieties. Antioxidase activities in cold-resistant varieties were higher than those in the cold-sensitive varieties under all concentrations of H₂O₂. Endogenous H₂O₂ contents rised in the whole range of concentration of H₂O₂. Therefore, it is conclude that soaking seeds of soybean with H₂O₂ can enhance activities of antioxidantases, increase their ability to resist cold stress and alleviate cold injury.

Key words: Soybean (*Glycine max* L.); H₂O₂; Germination; Antioxidase

大豆是我国东北地区最重要的经济作物之一,但由于属喜温植物,对低温敏感,春季播种后易遭受冷害,造成减产。研究表明,植物遭遇低温胁迫时,细胞内产生的电子很容易使氧化态的氧转变为还原态的氧,产生超氧阴离子自由基(O₂⁻),并转化为羟自由基(HO[·])、单线态氧(¹O₂)和H₂O₂等活性氧(ROS),使细胞内氧代谢平衡失调,从而引起膜质过

氧化、蛋白质氧化以及DNA、RNA损伤等。然而,植物体内也存在活性氧清除系统,如由超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(peroxidase, POD)等构成的酶系统;由抗坏血酸、类胡萝卜素、谷胱甘肽等抗氧化剂构成的非酶系统。当环境胁迫导致活性氧形成增加时,也诱导这些清除系统清除能力的增强。研

收稿日期(Received):2007-11-02;接受日期(Accepted):2007-12-11

基金项目:辽宁省科技厅重点项目(2001406002)

作者简介:张立军(1960-),男,教授,博士,从事植物生理教学及研究工作。E-mail:lijunzhang8@yahoo.com.cn;Tel:024-88487163

究发现, H_2O_2 是一种比较特殊的活性氧, 参与植物对环境胁迫响应的细胞信号转导过程, 其少量积累可诱导抗氧化酶基因的表达, 从而提高植物的抗寒能力 (Prasad et al., 1994)。目前已经从拟南芥、烟草等植物中鉴定出 GST (谷胱甘肽 S-转移酶)、POD、CAT 基因的 H_2O_2 反应元件。McAnish 等 (1996) 研究表明 H_2O_2 可通过提高保卫细胞内 Ca^{2+} 浓度调节气孔的运动。 H_2O_2 与植物抗寒性之间的关系已成为当前植物逆境研究的热点之一。尽管关于大豆在低温胁迫下体内抗氧化酶活性的变化已有较多的报道 (Skudlik et al., 2000), 但外源 H_2O_2 处理对大豆种子低温萌发的效应、对抗氧化酶活性的影响以及萌发过程中大豆种子内源 H_2O_2 含量的变化还未见报道。

1 材料与与方法

供试材料为耐冷品种 Kottman、铁丰 31 和冷敏感品种 (系) 沈农 8 号、沈农 9411。从每个品种 (系) 中挑选出大小相近均籽粒饱满的种子 50 粒, 0.1% 次氯酸钠消毒后用蒸馏水冲洗 3 遍, 置于铺有双层滤纸的培养皿中, 滤纸用蒸馏水浸湿, 在黑暗条件下常温 (20℃) 培养 12 h, 然后分别用清水对照、10、20、50、100 和 200 mmol L⁻¹ H_2O_2 溶液浸种 10 min, 置于低温 (5℃) 黑暗条件下进行萌发, 每隔 24 h 重复 H_2O_2 溶液浸种操作。处理的第 9 天进行发芽率统计, 取样进行 H_2O_2 含量、抗氧化酶活性和细胞外渗透电导率测定。

CAT 活性测定采用紫外吸收法 (Kraus and Fletcher, 1994), 以 1 min 内 ΔA_{240} 减少 0.1 的酶量为一个过氧化氢酶活性单位 (U); SOD 活性测定采用 NBT (氮蓝四唑) 光化还原法 (Abbott et al., 1984), 以抑制 NBT 光还原 50% 的酶量为一个酶活力单位 (U); POD 活性测定采用愈创木酚法 (Kochba et al., 1977), 以 1 min 内 OD_{470} 变化 0.01 为一个过氧化物酶活性单位 (U); H_2O_2 含量的测定采用硫酸钛沉淀法 (Patterson, 1984), 测定每个样品的吸光度, 计算组织内 H_2O_2 含量 ($mg g^{-1} FW$); 电解质相对外渗率的测定采用 McKay 和 Mason 的方法 (McKay and Mason, 1991)。

2 结果与分析

2.1 外源 H_2O_2 处理对大豆种子低温萌发的影响

从图 1 可以看出, 不同品种大豆经外源 H_2O_2 处

理后的发芽率与对照组相比, 随着 H_2O_2 浓度的升高, 均有不同程度的提高, 沈农 8 号、沈农 9411、铁丰 31 和 Kottman 的发芽率分别比对照高 24%、18%、28% 和 30%, 当 H_2O_2 浓度达到 50 mmol L⁻¹ 时, 发芽率最高。此后, 随着 H_2O_2 浓度的继续升高, 所有品种的发芽率都明显下降。

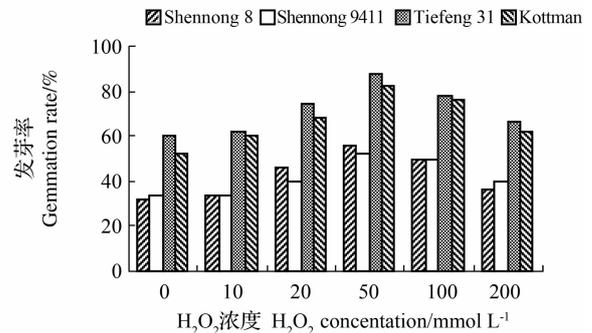


图 1 外源 H_2O_2 处理对大豆种子低温萌发的影响

Fig. 1 Effect of exogenous H_2O_2 on germination rate under low temperature

2.2 外源 H_2O_2 处理对低温萌发大豆种子 H_2O_2 含量的影响

如图 2 所示, 当外源 H_2O_2 浓度低于 10 mmol L⁻¹ 时, Kottman、铁丰 31、沈农 8 号和沈农 9411 的 H_2O_2 含量均没有发生明显变化, 随着外源 H_2O_2 浓度逐渐升高, 沈农 8 号和沈农 9411 的 H_2O_2 含量呈明显上升趋势, 而 Kottman 和铁丰 31 两个耐冷品种在外源 H_2O_2 浓度超过 20 mmol L⁻¹ 时才开始升高。当外源 H_2O_2 浓度达到 200 mmol L⁻¹ 时, 不同品种大豆 H_2O_2 含量与对照相比提高了 4~5 倍。

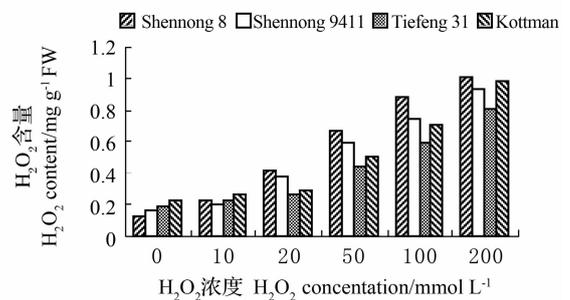


图 2 外源 H_2O_2 处理对大豆种子 H_2O_2 含量的影响

Fig. 2 Effect of exogenous H_2O_2 on H_2O_2 content under low temperature

2.3 外源 H_2O_2 处理对低温萌发大豆种子抗氧化酶活性的影响

2.3.1 外源 H_2O_2 处理对 CAT 活性的影响 从图 3 可以看出, 不同耐冷性大豆品种低温萌发过程

中 CAT 活性表现出了明显差异,无论是对照组还是经 H₂O₂ 处理, Kottman 和铁丰 31 的 CAT 活性总是高于沈农 8 号和沈农 9411。H₂O₂ 浓度低于 50 mmol L⁻¹ 时,虽然沈农 8 号和沈农 9411 的 CAT 活性随 H₂O₂ 浓度的增加也有所升高,但二者的绝对增长量均低于耐冷性较强的两个品种。当 H₂O₂ 浓度高于 50 mmol L⁻¹ 时,不同耐冷性大豆品种的 CAT 活性呈现明显下降趋势。

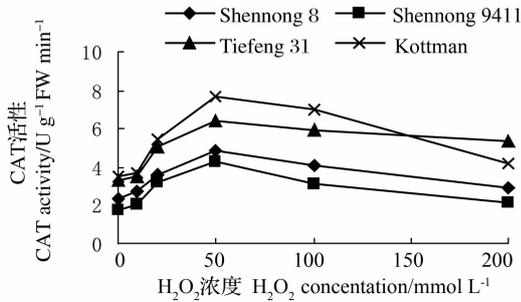


图 3 外源 H₂O₂ 处理对低温萌发大豆种子 CAT 活性的影响

Fig. 3 Effect of exogenous H₂O₂ on CAT activity of soybean seedlings under low temperature

2.3.2 外源 H₂O₂ 处理对 SOD 活性的影响 如图 4 所示,不同耐冷性大豆品种在外源 H₂O₂ 浓度不超过 50 mmol L⁻¹ 时, SOD 活性均有不同程度的提高, Kottman 和铁丰 31 的 SOD 活性始终高于两个冷敏感品种。四个大豆品种中沈农 8 号的增长幅度最大。在对照组,其 SOD 活性与沈农 9411 相近,低于 Kottman 和铁丰 31 近 100 U g⁻¹, 但当 H₂O₂ 浓度达到 50 mmol L⁻¹ 时,它的 SOD 活性基本赶上 Kottman 和铁丰 31, 超过沈农 9411 50.25 U g⁻¹。

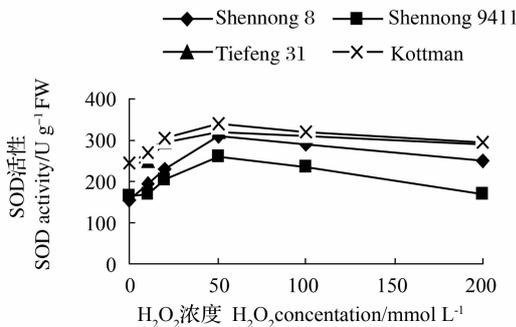


图 4 外源 H₂O₂ 处理对低温萌发大豆种子 SOD 活性的影响

Fig. 4 Effect of exogenous H₂O₂ on SOD activity under low temperature

2.3.3 外源 H₂O₂ 处理对 POD 活性的影响 从图 5 可以看出, Kottman 和铁丰 31 的 POD 活性在 H₂O₂ 浓度不高于 50 mmol L⁻¹ 的范围内比对照增加了近 1 倍。在 H₂O₂ 浓度接近 10 mmol L⁻¹ 和 150 mmol L⁻¹ 时,二者的 POD 活性出现了两个等值点。耐冷性较差的沈农 8 号和沈农 9411 的 POD 活性随 H₂O₂ 浓度的升高也呈上升趋势, 当外源 H₂O₂ 浓度达到 50 mmol L⁻¹ 时,不同耐冷性品种均呈明显下降趋势。各处理浓度下,沈农 8 号和沈农 9411 的 POD 活性均低于 Kottman 和铁丰 31。

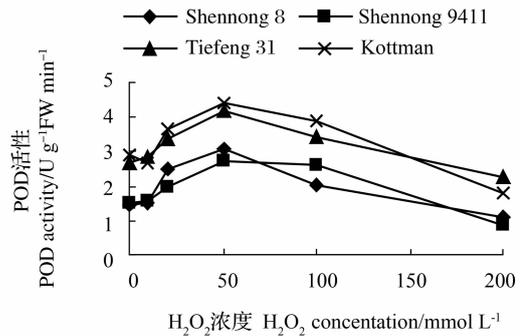


图 5 外源 H₂O₂ 处理对低温萌发大豆种子 POD 活性的影响

Fig. 5 Effect of exogenous H₂O₂ on POD activity under low temperature

2.4 外源 H₂O₂ 处理对低温萌发大豆种子细胞膜透性的影响

电解质外渗率是评定细胞膜透性的一种有效方法。图 6 显示,随着 H₂O₂ 浓度的增大,不同品种大豆电解质外渗率呈先降低然后逐步升高的趋势,耐低温品种 Kottman 和铁丰 31 电解质外渗率小于冷敏感品种沈农 8 号和沈农 9411, 因而膜的损伤

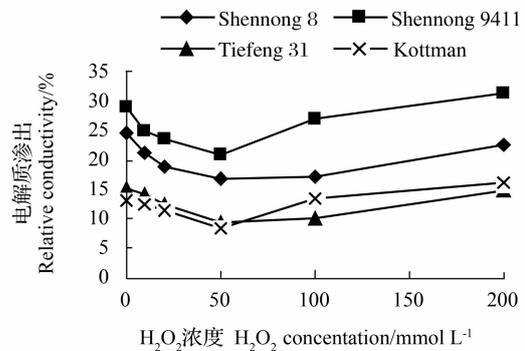


图 6 外源 H₂O₂ 处理对低温萌发大豆种子细胞膜透性的影响

Fig. 6 Effect of exogenous H₂O₂ on relative conductivity under low temperature

较小。

3 讨论

H_2O_2 是植物系统获得抗性的重要的信号分子,植物体内 H_2O_2 的积累是植物经受逆境所必须的,它可有效缓解逆境对植物产生的伤害。欧阳丽喆等(2007)在研究中发现,番茄果皮内 H_2O_2 含量的增加可以诱导番茄耐冷性的增强,抑制内源 H_2O_2 含量则有效抑制了耐冷性的提高。白永富等(2001)用 H_2O_2 浸种处理中等活力水平烤烟种子时也发现适宜浓度 H_2O_2 可显著提高发芽率,缩短种子发芽时间。在本研究中,当外源 H_2O_2 浓度低于 100 mmol L^{-1} 时,无论是耐低温品种还是冷敏感品种,其发芽率与对照组相比均有不同程度的提高(图1),尤其 50 mmol L^{-1} H_2O_2 处理效果最佳。这表明,用适宜浓度 H_2O_2 浸种处理能够降低大豆在低温逆境中的伤害,提高大豆萌发时的抗寒性。但冷敏感品种易出现种子爆裂现象。

保护植物不受氧化胁迫伤害是植物的抗逆机制之一,且保护能力的高低与抗氧化酶活性的高低密切相关。张蕊等(2007)用水杨酸预处理水稻幼苗,低温胁迫下SOD、POD和CAT活性较低温对照上升,提高了水稻幼苗的抗寒性。周玉萍等(2002)用 H_2O_2 溶液或者 H_2O_2 溶液与氯化钙($CaCl_2$)溶液混合喷洒香蕉叶片,两种处理方式均提高了冷胁迫期间香蕉叶片的SOD活性,减轻了低温对香蕉叶片的伤害。本研究中经浓度小于 50 mmol L^{-1} H_2O_2 浸种处理后,不同品种大豆CAT、POD及SOD活性都得到不同程度提高,说明经合适浓度 H_2O_2 浸种处理可直接或间接诱导其抗氧化酶活性的提高。欧阳丽喆等(2007)冷激处理番茄果实诱导了冷藏初期 H_2O_2 含量的升高,提高低温下果实内CAT、抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活性;用二甲基硫脲(DMTU)抑制内源 H_2O_2 则抑制了冷藏初期番茄果实内CAT和APX的活性。在本试验中,随着外源 H_2O_2 浓度的提高,内源 H_2O_2 含量也呈上升趋势,可以推测外源 H_2O_2 浸种处理诱导大豆种子低温萌发过程中内源 H_2O_2 含量的增加,从而诱导抗氧化酶的合成或活性的提高。在低浓度下, H_2O_2 诱导酶的合成占主要地位,导致其活性的提高,而在高浓度下, H_2O_2 对酶活性的抑制作用又占主导地位,导致酶活性下降。

至于耐低温品种和冷敏感品种之间抗氧化能力的差异,可能是不同抗性品种的 H_2O_2 信号传递途径

或组分以及各信号分子之间的相互作用存在差异,或者低温胁迫时内部 H_2O_2 转化为其它物质的能力有差异。一定浓度的 H_2O_2 处理,也降低大豆种子的电解质外渗率,这表明 H_2O_2 处理提高大豆种子在低温下的萌发率可能与促进抗氧化酶的活性、降低电解质外渗率有关。

4 结论

外源 H_2O_2 在低浓度下(低于 50 mmol L^{-1})提高大豆沈农8号、沈农9411、Kottman和铁丰31的发芽率,降低电解质外渗率,提高CAT、SOD和POD活性; H_2O_2 在高浓度下(高于 50 mmol L^{-1})降低抗氧化酶活性;耐冷品种的抗氧化酶活性始终高于冷敏感品种;在萌发过程中,内源 H_2O_2 含量随 H_2O_2 处理浓度的升高而增加。结果表明,外源 H_2O_2 可能通过内源 H_2O_2 含量的提高诱导抗氧化酶活性的增强,从而减轻低温伤害,提高大豆在低温下的萌发能力。

References

- Abbott A C, Anins C C, and Flavell R B. 1984. Characterization of anther differentiation in cytoplasmic male sterile maize using a specific isozyme system (esterase). *Theory and Applied Genetics*, 67: 469-473
- Bai Y F, Wang L, and Wang S S. 2000. Study on H_2O_2 improving seed vigor of K_{326} flue-cured tobacco. *Seed*, 1:31-32 (白永富,王荔,王绍坤. 2001. H_2O_2 浸种处理提高 K_{326} 烤烟种子活力的研究. *种子*, 1:31-32)
- Kochba J, Lavee S, and Spiegel-Roy P. 1977. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non embryogenic Shamouti organ ovular callus lines. *Plant Cell Physiology*, 18: 463-467
- Kraus T E, and Fletcher R A. 1994. Wheat Seedlings from heat and paraquat injury is detoxification of active oxygen involved. *Plant Cell Physiology*, 35(1):45-52
- McAinsh M R, Clayton H, Mansfield T A, and Hetherington A M. 1996. Changes in stomata behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiology*, 111:1031-1042
- Mckay H M, and Mason W L. 1991. Physiologically indicators of tolerance to cold storage in Sitka spruce and Douglas-fir seedlings. *Canadian Journal Forest Research*, 21:890-901
- OuYang L Z, Shen L, Chen H R, Fan B, Zheng Y, Sun J J, and Sheng J P. 2007. Effects of H_2O_2 on cold tolerance and antioxidant enzyme activities of tomato by cold-shock treatment. *Food Science*, 28(7): 31-35 (欧阳丽喆,申琳,陈海荣,范蓓,郑杨,孙建军,生吉萍. 2007. H_2O_2 参与冷激处理对番茄果实抗冷性及抗氧化酶活性的影响. *食品科学*, 28(7):31-35)

(下转 105 页)

- Boreali Sinica,4(2):39-43(杜连恩,魏玉昌,可福存,于秀普,杜文亮. 1989. 大豆化学诱变育种及其规律的研究. 华北农学报,4(2):39-43)
- Guo J P, Gao S H, Bai Y M, Wen M, and Wang B Y. 1996. An Experiment study of the impacts of CO₂ concentration doubling on soybean growth. Scientia Atmospherica Sinica,20(2):243-249(郭建平,高素华,白月明,温民,王春乙. 1996. CO₂浓度倍增对大豆影响的试验研究. 大气科学,20(2):243-249)
- Gu Y H, Su M J, and Qin G Y. 2003. Effects of low energy ion beams implantation on inhibition of soybean seeds at low temperature. Acta Laser Biology Sinica,12(5):364-367(谷运红,苏明杰,秦广雍. 2003. 低能离子注入对大豆种子吸胀冷害的影响. 激光生物学报,12(5):364-367)
- Li G S, Bai C K, Duan J, Peng C L, Weng K N, and Liu S D. 2003. Effect of high hydrostatic pressure treatment on physiological characteristics of rice plants. Chinese Journal of High Pressure Physics,17(2):122-128(李桂双,白成科,段俊,彭长连,翁克难,刘曙东. 2003. 静水高压处理对水稻植株生理特性的影响. 高压物理学报,17(2):122-128)
- Li Q, Wang L, Zhao R J, Pei Y L, and Wang L Z. 2001. Some research on soybean mutation breeding. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,23(2):1-6(李强,王岚,赵荣娟,裴颜龙,王连铮. 2001. 大豆辐射育种的某些研究. 中国油料作物学报,23(2):1-6)
- Shen S L, Xu S P, Weng K N, Tan M, Zhang J F, Long G W, Chi Y B, Liu B, and Zou G T. 2004. Molecular analysis of stable mutagenesis rice cultivar induced by high hydrostatic pressure. Chinese Journal of High Pressure Physics,18(4):1-6(申斯乐,徐世平,翁克难,谭梅,张剑峰,龙国徽,池元斌,刘宝,邹广田. 2004. 高静水压处理水稻诱导稳定遗传变异系的 DNA 分析. 高压物理学报,18(4):1-6)
- Wang C Y, Bai Y M, Wen M, and Huang H. 2004. Effect of double CO₂ and O₃ on growth and yields in soybean. Environmental Science,25(6):6-10.(王春乙,白月明,温民,黄辉. 2004. CO₂和O₃浓度倍增及复合效应对大豆生长和产量的影响. 环境科学,25(6):6-10)
- Wang R Z, Cheng C M, Hu S X., and Dai X L. 2001. Study on character variation of spring soybean carried by airship. Acta Agriculturae Jiangxi,13(4):62-64(王瑞珍,程春明,胡水秀,戴兴临. 2001. 春大豆空间诱变性状变异研究初报. 江西农业学报,13(4):62-64)
- Wu X H, Chen L Y, Su L, Liu X R, and Hong S M. 2004. Effect of high pressure nitrogen gas treatments of mini-tomato seeds on its growth characteristics. Chinese Journal of High Pressure Physics,18(4):379-384(吴学华,陈丽英,苏磊,刘秀茹,洪时明. 2004. 高压氮气处理微型番茄种子对其生长特性的影响. 高压物理学报,18(4):379-384)
- Xu S P, Liao Y P, Weng K N, Xiao W S, Chen Z M, Lv G C, and He X Y. 2001. Pressure induced rice mutation and effects of high hydrostatic pressure on the growth and development of rice. Chinese Journal of High Pressure Physics,15(4):241-248(徐世平,廖耀平,翁克难,肖万生,陈钊明,律广才,何秀英. 2001. 水稻压制变异和高压对水稻生长发育的影响. 高压物理学报,15(4):241-248)
- Xu S P, Liao Y P, and Xiao W S. 1999. Effects of high pressure on the growth and development of rice. Chinese Journal of High Pressure Physics,13(Suppl):58-62.(徐世平,廖耀平,肖万生. 1999. 高压对水稻生长发育的影响. 高压物理学报,13(增刊):58-62)
- Zhao J, Ma F R, Yang W J, and Shang W B. 1997. Effects of pretreatment of soybean seeds with high voltage electrostatic field on soybean seedlings' cold acclimation. Acta Biophysica Sinica,13(3):489-494(赵剑,马福荣,杨文杰,温尚斌. 1997. 高压静电场预处理种子对大豆幼苗抗冷害的影响. 生物物理学报,13(3):489-494)
- (上接 100 页)
- Patterson B D. 1984. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (M). Analysis Biochemical,139:487-492
- Prasad T K, Anderson M D, Martin B A, and Stewart C R. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. The Plant Cell,6:65-74
- Skudlik G, Baczek-kwinta R, and Koscieliak J. 2000. The effect of short warm breaks during chilling on photosynthesis and the activity of antioxidant enzymes in plant sensitive to chilling. Journal of Agronomy and Crop Science,184:233
- Zhang R, Lv J, Mi Q S, and Wang S G. 2006. Effects of salicylic acid on antioxidant enzymes in rice seedlings under chilling stress. Journal of Southwest Agricultural University. 28(1):29-32,36(张蕊,吕俊,米青山,王三根. 2007. 低温下外源水杨酸对水稻幼苗抗氧化酶系的影响. 西南农业大学学报,28(1):29-32,36)
- Zhou Y P, Liu H W, Feng Y X, Zheng Y L, and Wang Z X. 2002. Effects of H₂O₂ and CaCl₂ on cold-resistance in banana seedlings. Journal of Guangzhou University: Natural Science Edition. 1(2):33-36(周玉萍,刘华伟,冯永新,郑燕玲,王正洵. 2002. 过氧化氢与氯化钙对香蕉幼苗抗寒性的影响. 广州大学学报:自然科学版,1(2):33-36)