

大豆胚轴的脱水耐性研究

蒋昌华^{1,2} 田向荣¹ 宋松泉³ 陈润政¹

(1. 中山大学生命科学学院 广东广州 510275 2. 上海植物园 上海 200231;

3. 西双版纳热带植物园 云南勐腊 666303)

摘要:大豆种子是正常性种子。本文通过电解质渗漏速率、幼苗鲜重、胚轴存活率以及抗氧化酶活性等相关指标的测定,阐明了大豆胚轴在脱水过程中脱水耐性的变化情况及其与抗氧化酶活性的关系。为正常性种子和顽拗性种子脱水耐性研究提供参考。

关键词 大豆种子及胚轴 脱水耐性 抗氧化酶

Research of Desiccation Tolerance in Imbibed Soybean Axes

Jiang Changhua^{1,2}, Tian Xiangrong¹, Song Songquan³, Chen Runzheng²

(1. College of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275

2. Shanghai Botanical Garden, Shanghai 200231;

3. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Mengla, Yunnan, 666303)

Abstract Soybean seeds belong to Orthodox seeds. Changes of desiccation tolerance, the relation between desiccation tolerance and activities of antioxidation enzymes in imbibed soybean axes were investigated by measuring their rates of electrolyte leakage, fresh weight of seedlings, survival rate and activities of antioxidation enzymes. This can be taken as a reference for the research on desiccation tolerance of orthodox seeds and recalcitrant seeds.

Key words Soybean axes Desiccation tolerance Antioxidant enzyme

根据贮藏特性,可以将种子分为正常性种子(Orthodox seed)和顽拗性种子(Recalcitrant seed)^[1],大豆属正常性种子。正常性种子在发育过程中形成萌发能力和脱水耐性,成熟脱落前要经历一个自然的脱水时期,其含水量已大为降低,且可进一步干燥至很低的含水量,以利于贮藏,而顽拗性种子,如荔枝、龙眼种子等不耐脱水。因此,脱水耐性是正常性种子最基本的特征之一。在萌发的早期阶段,即胚根突破种皮之前,大多数类型的种子能够干燥到它原有含水量而不引起伤害。但是,到萌发的后期,脱水将显著降低种子的生活力,甚至引起种子死亡。例如,萌发 6 h 的大豆(*Glycine max* L. Merr. cv. Maple Arrow)种子能忍受严重脱水,36 h 的则难耐脱水^[2];正常性种子在吸胀过程中脱水耐性是逐步丧失的,是一种数量特征^[3]。

线粒体在呼吸代谢过程中,不可避免产生氧自由基(Richter, 1984),它们对生物大分子具有破坏作用,即膜脂过氧化反应,最终形成包括丙二醛(MDA)在内的过氧化产物,破坏细胞膜稳定性,致使电解质渗漏速度增加,进而引起细胞的衰老和死亡。植物细胞内具有清除氧自由基的抗氧化系统,如自由基清除酶系统(如 SOD、POD、CAT 等),Vertucci 和 Farrant 认为自由基清除系统是脱水耐性的一个重要组分,较耐干旱和脱水的组织具有更有效的抗氧化酶系统^[7]。

正常性种子吸胀萌发过程中脱水耐性丧失进程及脱水伤害机理与顽拗性种子脱水敏感性特点和脱水伤害的机理是相似的^[4-6]。因此, Sun 就提出用吸胀萌发的正常性种子作为材料来研究顽拗性种子脱水敏感性的机理,这样可以不受地理分布和成熟季节的限制来研究顽拗性种子脱水敏感性机理^[15]。大豆胚轴的脱水耐性研究尚未见报道。本文以大豆胚轴为材料,研究了种子萌发过程中脱水耐性的变化及其与活性氧清除酶活性的关系。

收稿日期: 2005-09-30

作者简介: 蒋昌华 (1967~), 男, 硕士, 工程师; 主要从事植物抗性生理研究。

1 材料与方法

参试材料为“矮脚早”大豆, (*Glycine max* L. Aijiaozao) 种子购自中国农科院油料作物研究所大豆室(武昌), 于 15℃ 条件下保存备用。

1.1 检测大豆种子和胚轴含水量

各选取 20 粒种子, 消毒后放入培养皿, 加 15 ml 去离子水, 置 20℃ 培养箱暗中分别培养 0、12、24、28、30、32、34、36、40、44、48、60、72 h 后称重, 105℃ 下烘 30 min, 80℃ 烘至恒重。以每克干物质含有的水分克数表示含水量 ($\text{g H}_2\text{O}/\text{g DW}$), 3 次重复。同理测其胚轴含水量, 3 次重复。

1.2 检测电解质渗漏速率

将 32 粒预吸胀 32 h 的种子取其胚轴, 装入自制的纱布网栏中在活化硅胶中脱水至原含水量。加 30 ml 去离子水, 立即用 DDS-11 A 型电导率仪检测。其后每隔 30 min 测 1 次 (测定温度为 20℃, 定期摇动), 至 3.5 h 止, 取出后干燥, 计算每克干物质相对电解质渗漏速率 ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1} \text{DW h}^{-1}$)。3 次重复。

1.3 检测大豆胚轴脱水耐性

种子预吸胀 24、32、48 h 后, 取胚轴装入自制的纱布网栏中, 在活化硅胶上分别脱水 0、2、4、6、8、12 h, 然后进行脱水耐性分析 (含水量、存活率、电解质渗漏速率、幼苗生长量的测定)。

1.4 测定抗氧化酶活性和丙二醛含量

将脱水后的胚轴在液氮中磨成干粉, 用相应的方法制备酶液以检测抗氧化酶的活性及丙二醛 (MDA) 的含量。

酶液制备及过氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测参照 Donahue 等^[8]、Schickler 和 Caspi^[9]的方法; 过氧化氢酶 (CAT) 活性检测参照 Abei^[10]的方法; 过氧化物酶 (POD) 活性检测根据 Kochba 等^[11]的方法; 参照 Hendry 等^[12]的方法提取和测定丙二醛 (MDA) 的含量。

蛋白质含量的测定按 Bradford^[13]方法, 以牛血清白蛋白为标准。以上测定均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 大豆种子和胚轴的吸水进程和电解质渗漏速率的变化

大豆干种子及其胚轴的含水量分别为 0.112、0.111 $\text{g H}_2\text{O}/\text{g DW}$, 吸水曲线均为“快-慢-快”3 阶段模式, 为典型的“S”形。种子包括胚轴与子叶, 图 1 显示快速生长的胚轴含水量比整个种子的含水量上升速度快, 表明被动吸水与主动吸水之间存在明显差异。

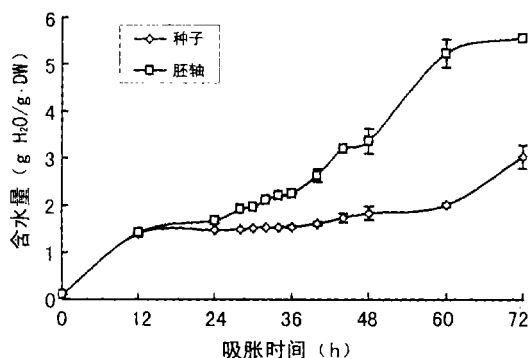


图 1 大豆种子和胚轴的吸水模式

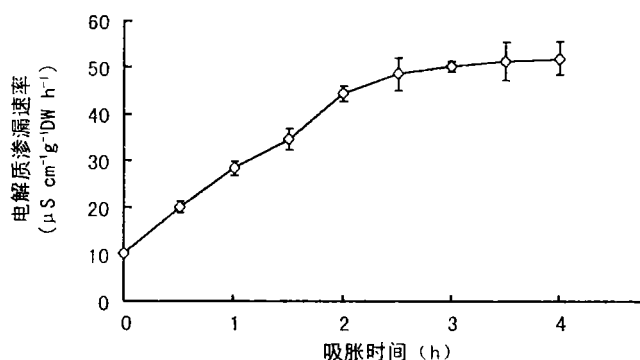


图 2 大豆胚轴吸胀过程中电解质渗漏速率的变化

预吸胀后的大豆胚轴经脱水至其原含水量时细胞膜受到较严重伤害, 因此, 在 20℃ 恒温下, 浸泡 0~3 h 大豆胚轴的电解质渗漏速率增加迅速, 3 h 后渐趋缓慢 (图 2)。这是因为吸胀初期细胞膜系统处于不完整状态, 外界水分迅速进入细胞, 导致细胞结构, 尤其是细胞膜结构的变化, 如细胞膜磷脂由发育成熟时的胶状向水合液晶状态转变, 由此而引起细胞内溶质的迅速外渗, 电导率迅速上升。经过短时间的重新水合后, 细胞膜又转成稳定的结构状态, 恢复了半透性膜的特性。此时, 电解质渗漏速率又明显下降。所以, 本研究中电解质渗漏速率的测定

均为 20℃、吸胀 3 h 时的值。

2 2 预吸胀对大豆胚轴脱水耐性的影响

预吸胀时间越长,胚轴的脱水耐性丧失越严重,脱水后其电解质渗漏速率逐渐增大,增幅与预吸胀时间呈正相关,也与脱水时间成正比;胚轴的存活率以及存活胚轴生长量逐渐下降,均与预吸胀时间、脱水时间成正比(表 1),表明预吸胀时间越长,胚轴越不耐脱水。例如,预吸胀 24 h 的胚轴脱水 6 h 后存活率为 68.89%,而预吸胀 32 h 和 48 h 的胚轴经同样时间的快速脱水后,它们的存活率分别为 55.56%和 14.44%,电解质渗漏速率和存活幼苗的生长量也有类似的变化趋势。预吸胀 24 h 的胚轴被认为尚未丧失脱水耐性,而预吸胀 32、48 h 的胚轴被认为已部分或全部丧失脱水耐性。它们脱水的变化是一种数量性状,这与用绿豆种子研究的结果是一致的^[3],也与顽拗性种子脱水耐性的特性相似^[4~6]。

表 1 预吸胀 24、32、48 h 的大豆胚轴脱水耐性变化

预吸胀时间 (h)	电解质渗漏速率 ($\mu\text{S cm}^{-1}\text{g}^{-1}\text{DW h}^{-1}$)			幼苗长度 (cm)			幼苗鲜重 (g)			胚轴存活率 (%)		
	24 h	32 h	48 h	24 h	32 h	48 h	24 h	32 h	48 h	24 h	32 h	48 h
脱	0	46.5±2	60.2±2.9	66.6±3.4	177.4±26.2	155.1±22.3	145.6±8.8	3.69±0.64	3.22±0.38	3.22±0.21	93.3±8.8	97.8±1.9
水	2	66.7±5.1	89.9±9.2	122.5±9.9	110.7±17.2	125.1±3.5	131.9±4.5	2.76±0.29	3.01±0.03	2.89±0.36	82.2±1.9	86.7±0
时	4	114.8±0.1	145.7±9.5	262.8±17.7	91.8±19.4	82.7±13	56.9±3.7	2.29±0.37	2.03±0.25	1.67±0.3	82.2±2	77.8±2.6
间	6	115.5±0.1	147.5±13.7	319.5±19.9	83.6±6.7	33.7±2.2	7.5±1.1	2.08±0.26	1.01±0.06	0.15±0.04	68.9±1.9	55.6±3.1
	8	132.9±6.7	190.7±12.3	337.6±5.6	41.8±5.6	5.6±1.1	1.5±0.4	1.25±0.3	0.83±0.04	0.03±0.01	35.6±2.2	8.9±1.1
(h)	12	156.2±10.7	242.2±21.2	378.8±19.1	4.2±2.3	0.6±0.1	0	0.76±0.04	0.12±0.02	0	6.8±5.7	1.1±0.2
												0

表 2 预吸胀大豆胚轴在脱水过程中过氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性变化

预吸胀时间 (h)	SOD 活性			POD 活性			CAT 活性		
	24 h	32 h	48 h	24 h	32 h	48 h	24 h	32 h	48 h
脱	0	19.77±0.03	21.05±0.74	26.97±0.06	0.59±0.03	1.55±0.03	3.05±0.13	6.65±0.27	7.73±0.59
水	2	18.72±0.41	37.43±0.19	36.40±0.03	0.50±0.02	0.83±0.06	5.65±0.23	5.63±0.21	7.39±0.72
时	4	22.06±0.33	23.82±0.38	26.26±1.01	0.42±0.03	0.34±0.01	7.14±0.02	3.49±0.12	5.62±0.73
间	6	21.02±0.56	21.02±0.04	17.28±0.78	0.40±0.02	2.17±0.21	2.54±0.05	5.38±0.21	5.79±0.51
	8	20.34±0.35	16.78±0.60	18.29±0.16	0.43±0.06	7.37±0.02	6.90±0.09	3.33±0.12	8.69±0.30
(h)	12	18.22±0.43	14.70±0.56	16.10±1.02	0.46±0.04	0.36±0.03	7.01±0.12	2.66±0.15	4.37±0.48
									5.98±0.29

2 3 预吸胀大豆胚轴脱水过程中抗氧化酶活性和丙二醛含量的变化

表 2 表明,预吸胀 24 h 的胚轴在硅胶中分别脱水 0、2、4、6、8、12 h,其 SOD 活性先略有降低,再有所升高,然后降低;预吸胀 32 h 胚轴的情形是先升高,然后下降;预吸胀 48 h 的胚轴情况是先略有升高,严重脱水又下降。

预吸胀 24 h 的胚轴在脱水过程中 POD 活性变化幅度不大,且一直保持在较低水平;预吸胀 32 h 的胚轴 POD 活性先有所下降,然后剧烈上升,至脱水后期

又剧烈下降;预吸胀 48 h 的胚轴 POD 活性先快速上升,在脱水中期明显下降,到脱水后期又上升。从总体上看,随着吸胀时间的延长,胚轴的 POD 活性在上升;而在脱水过程中它们的 POD 活性是先降低后升高。

预吸胀 24 h 的胚轴 CAT 活性先降低,后上升,严重脱水时又下降;预吸胀 32 h 的胚轴 CAT 活性先上升后降低,在脱水中期又上升,至脱水后期下降;预吸胀 48 h 的胚轴 CAT 活性先一直下降,然后上升,到脱水后期又下降。也就是说,在脱水初期它们的 CAT 活性在下降;随着脱水程度加剧, CAT 活性有所上升;而严重脱水时, CAT 活性又降低。

预吸胀 24 h 的胚轴在脱水初始时 MDA 含量下降,其后就一直缓慢上升;预吸胀 32 h 胚轴的 MDA 含量先略有上升,在脱水中期下降,脱水后期又上升;预吸胀 48 h 的胚轴 MDA 含量先快速上升,然后下降,严重脱水时又上升。表明 MDA 含量与脱水程度成正比。

表 3 预吸胀大豆胚轴在脱水过程中丙二醛 (MDA) 含量的变化

脱水时间 (h)	预吸胀 24 h MDA 含量	预吸胀 32 h MDA 含量	预吸胀 48 h MDA 含量
0	0.98±0.07	1.52±0.01	0.91±0.05
2	0.66±0.09	1.64±0.06	1.65±0.03
4	0.86±0.06	1.50±0.11	0.96±0.07
6	0.95±0.03	1.47±0.09	0.91±0.04
8	0.96±0.08	0.91±0.01	1.22±0.13
12	1.04±0.05	1.09±0.05	1.30±0.02

3 讨 论

研究表明,随着预吸胀时间的增加, SOD 活性呈上升趋势,这是因为吸胀可以使胚轴的许多酶活性增加^[6]。具脱水耐性的胚轴(24 h)在脱水过程中, SOD 活性变化不大;丧失(48 h)或部分丧失脱水耐性的胚轴(32 h), SOD 活性在轻度脱水时有所上升,脱水严重时又呈下降趋势。这是因为在脱水初期,氧的积累会诱导 SOD 活性增加,随着种子脱水程度的加剧,细胞结构和功能受到损伤, SOD 活性下降; POD 活性先降低后升高,表明大豆胚轴活力下降, POD 活性反而有所上升。随着脱水程度的加剧,胚轴的活力必然下降,低活力胚轴不但 SOD 活性下降, CAT 活性也相应地下降,而 POD 活性却有所增加。这与花生种子的相关试验结果类似^[16]。

脱水初期, SOD 活性因氧的积累而有所增加,此时 MDA 含量不高;至脱水后期,种子活力下降, SOD 和 CAT 活性也下降, MDA 含量就上升(表 3)。这是因为 SOD 能催化超氧阴离子自由基发生歧化反应,生成分子氧和过氧化氢(H_2O_2), CAT 能催化 H_2O_2 分解,使细胞内 H_2O_2 控制在较低水平,两者都属细胞内防御系统的酶。它们活性的降低,会导致细胞内 O_2^- 和 H_2O_2 的积累,引发自由基的连锁反应,进而导致膜脂过氧化,使膜结构的完整性受到破坏, MDA 含量升高; POD 在细胞内可利用 H_2O_2 进行与衰老有关的氧化反应^[14]。这是随着脱水程度的加剧,种子活力下降, SOD 和 CAT 活性下降,而 POD 活性上升, MDA 含量增加的原因。

随着吸胀时间增加,大豆胚轴丧失脱水耐性的程度就越严重,脱水耐性的丧失是一个数量特征,一般不出现严格的临界时间点。部分丧失(32 h)和完全丧失脱水耐性(48 h)大豆胚轴的脱水耐性变化模式与顽拗性种子(如黄皮、荔枝等)相类似^[4~6];在脱水过程中,它们的活性氧清除酶(SOD、POD、CAT)活性变化趋势与顽拗性种子相似,但其 MDA 含量变化与顽拗性种子存在一定的差异。因此,预吸胀的正常性种子的胚轴脱水耐性变化机理与顽拗性种子不是完全相同,但可以为顽拗性种子脱水耐性的研究提供有意义的参考。

参考文献

- 1 Roberts Eh. Predicting the storage life of seeds[J]. Seed Sci & Tech. 1973, 1: 499-514
- 2 Senaratna T., Mckersie B. D. Dehydration injury in germination soybean (*Glycine max* L Merr.) seeds[J]. Plant physiol. 1983, 72: 620-624
- 3 钱春梅,宋松泉,伍贤进等. 绿豆种子吸胀过程中脱水耐性变化的时间模式[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39 增刊(2): 104~111
- 4 宋松泉,傅家瑞. 黄皮种子脱水敏感性与膜脂过氧化作用[J]. 植物生理学报, 1997, 23(2): 163~168
- 5 陈俊松,陈润政,傅家瑞. 枇杷种子的脱水敏感性与膜脂过氧化作用[J]. 植物生理学报, 1999, 25(4): 369~374
- 6 Song S Q., Fu J R. Desiccation sensitivity and peroxidation of membrane lipids in lychee[J]. Trop Sci. 1999, 39: 102-106
- 7 Vertucci C W., Farant J M., Inkigil J., Galili G. Seed development and germination[M]. New York: Marcel Dekker Inc. 1995, 237-271.
- 8 Donahue J L., Okpodu M. C., Cramer C L. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves[J]. Plant Physiol. 1997, 113: 249-257.
- 9 Schickler H., Caspi H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator[J]. plants of the genus *Alyssum*. Physiol Plant. 1999, 105: 39-44.
- 10 Abei H. E., Catalase In Bergmeyer H. U. (eds). Methods of Enzymatic Analyses[J]. Weinheim: Verlag Chemie. 1983, 3: 273-282
- 11 Kochba J., Lavee S., Spiegel-Roy P. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non embryogenic *Shanourtiorgane* ovular callus lines[J]. Plant Cell Physiol. 1977, 18: 463-467.
- 12 Hendry G. A. F., Thorpe P. C., Mezlyak M. N. Stress indicators: lipid peroxidation. In Hendry G. A. F., Grime J. P. (eds). Methods in Comparative Plant Ecology[M]. London: Chapman & Hall. 1993, 154-156
- 13 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
- 14 胡家恕,朱诚,曾广文等. 超干红花种子抗老化作用及其机理[J]. 植物生理学报, 1999, 25(2): 171~177.
- 15 Sun W. Q. Desiccation sensitivity of recalcitrant seeds and germinated orthodox seeds: can germinated orthodox seeds serve as a model system for studies of recalcitrance // MARZALINA M., et al. eds. UFRO seed Symposium 1998 "Recalcitrant seeds" Proceedings of the conference[M]. Malaysia: Kuala Lumpur. 1998
- 16 陈光仪,傅家瑞. 花生种子劣变过程中一些酶活性的变化[J]. 植物学报, 1987, 29(2): 164~170