

吸胀玉米种子脱水耐性变化与 活性氧清除酶活性的关系^{*}

伍贤进, 宋松泉, 钱春梅, 傅家瑞
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 以吸胀的玉米种子为材料, 研究了种子吸胀过程中脱水耐性的变化以及预吸胀胚在随后的脱水过程中生活力, 电解质渗漏速率, MDA 含量和活性氧清除酶(SOD, POD, CAT)活性的变化。25℃下玉米种子脱水耐性丧失50%的吸胀时间为33 h, 丧失100%的时间为58 h。吸胀时间越长, 脱水耐性丧失越明显, 活性氧清除酶活性越容易被脱水所降低。完全丧失脱水耐性(吸胀58 h)的玉米胚活性氧清除酶活性在脱水过程中的变化趋势与顽拗性种子黄皮, 荔枝等相似, 但部分丧失脱水耐性玉米胚的变化趋势则与之有一定的差异。未丧失或部分丧失脱水耐性(吸胀24 h, 35 h)的玉米胚MDA含量在脱水过程中呈降低—升高—降低的变化趋势, 完全丧失脱水耐性胚(吸胀58 h)的MDA含量在脱水前期开始上升, 以后则随脱水而逐步下降。

关键词: 玉米种子; 吸胀; 脱水耐性; 活性氧清除酶

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2002)04-0063-04

正常性种子在发育过程中获得脱水耐性, 在吸胀萌发过程中脱水耐性逐步丧失。在吸胀萌发的早期阶段和胚根突破种皮之前, 大多数植物的种子能够干燥到它原来的含水量, 而不引起伤害。但在吸胀萌发的后期阶段, 相同程度的脱水将显著降低种子的生活力, 如果在胚根延长开始后脱水, 常常导致死亡。如: 吸胀萌发6 h的大豆(*Glycine max* L. merr cv. *Maple Arrow*)种子能够忍受严重脱水, 而吸胀萌发36 h的种子则不能被脱水^[1]; 吸胀萌发18~24 h的豌豆种子和36 h后的玉米种子(*Zea mays* L. cv. *Merit*)均已丧失脱水耐性^[2]。对正常性种子吸胀萌发过程中脱水耐性丧失进程和脱水伤害机理的研究发现: 其脱水耐性是逐步丧失的, 是一种数量性状^[3], 脱水耐性变化与胚中糖组成的变化和呼吸代谢产生的氧自由基积累有关^[4-6], 这些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^[7-9]。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^[10]。但关于萌发正常性种子脱水伤害的机理是否与顽拗性种子完全一致尚需进行更深入的研究。本文以玉米种子为材料, 研究了种子萌发过程中脱水耐性的变化与活性氧清除酶活性的关系。

1 材料与方法

1.1 材 料

供试玉米品种“粤单9117”(Zea mays cv. Yuedan 9117)购自广东省农业科学院。

1.2 种子预吸胀处理

种子经选择后置于垫有两层滤纸的培养皿($\Phi=15$ cm)中, 加入30 mL蒸馏水, 25℃暗中吸胀。

1.3 脱水处理

种子脱水: 种子吸胀后, 将其埋在活性硅胶中脱水。胚脱水: 将胚从预吸胀种子中剥离后置于盛有大量活化硅胶的干燥器中脱水, 干燥器的上部装有一微型风扇使空气流动。脱水均在室温(27~29℃)下进行。

1.4 干质量及含水量的测定

种子和胚经105℃烘30 min后, 80℃烘至恒质量, 然后称其干质量。以干质量为基础计算含水量。

1.5 存活率的测定

脱水后的20个胚和50颗种子经 $w=0.1\%$ HgCl₂消毒1 min, 用无菌水充分漂洗后, 胚置于放有1层滤纸和2 mL无菌水的培养皿($\Phi=6$ cm), 种子置于放有1层滤纸和15 mL无菌水的培养皿($\Phi=12$ cm)中, 25℃暗中培养5 d后测定存活

* 收稿日期: 2002-01-01

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(980360, 001224); 国际植物遗传资源研究所资助项目(IPGRI 001076)

作者简介: 伍贤进(1965-), 男, 副教授, 现工作单位为怀化学院; 通讯联系人: 宋松泉; E-mail: ssq@zsu.edu.cn

率、幼苗的鲜质量、干质量, 计算活力指数。活力指数= 萌发率×幼苗鲜质量 (mg)。有胚根或侧根伸出以及有芽明显生长者计算为存活。重复 3 次。

1.6 电解质渗漏速率的测定

取种子 10 粒或胚 (幼苗) 10 颗浸于 50 mL 蒸馏水中, 用 DDS-11A 型电导率仪测定浸泡液中电导率的变化, 然后测定种子或胚轴的干质量。每克干质量的种子或胚的电解质的渗漏速率用 $\mu\text{s} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 表示。

1.7 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定

参照 Donahue 等, Schickler 和 Caspi 的方法。3 mL 反应液中含甲硫氨酸 13 mmol/L, 氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 75 $\mu\text{mol/L}$, 核黄素 16.7 $\mu\text{mol/L}$, EDTA 0.1 mmol/L, 磷酸缓冲液 50 mmol/L (pH 7.8)。SOD 活性以每毫克蛋白抑制 NBT 光化还原的百分数表示。

1.8 过氧化物酶 (POD) 活性测定

根据 Kochba 等的方法, 3 mL 反应液中含磷酸缓冲液 0.2 mol/L (pH 6.0), 1.355 μL H_2O_2 , 愈创木酚 0.855 μL 。以每 min 每 mg 蛋白质 A_{470} 值增加 0.1 为一个酶活性单位 (U)。

1.9 过氧化氢酶 (CAT) 活性测定

参照 Abei 的方法, 3 mL 反应液中含 H_2O_2 10 mmol/L, 磷酸缓冲液 50 mmol/L (pH 7.0)。测定 240 nm 的吸光度值的变化, 根据每 min 每 mg 蛋白质中 H_2O_2 的消失量计算酶的活性, 单位为 μmol 。

1.10 丙二醛 (MDA) 含量测定

参照 Hendry 等的方法提取和测定 MDA 的含量。0.5 mL 提取液, 3 mL $w=0.5\%$ 的硫代巴比妥酸, 煮沸 15 min, 迅速冷却, 1 800×g 离心 10 min 后, 测定 534 和 600 nm 的吸光度。用标准 MDA 溶液做工作曲线, 计算样品中 MDA 的含量, 以每 mg 蛋白质中所含的 MDA 的 pmol 数为单位。

1.11 蛋白质含量测定

按 Bradford 方法, 以牛血清白蛋白为标准。以上测定均重复 3~5 次。

2 结 果

2.1 预吸胀作用对种子脱水耐性的影响

将预吸胀不同时间的种子脱水到每克干质量含水 (0.09±0.01) g 后, 测定电解质渗漏速率和存活情况。结果表明 (图 1), 预吸胀 24 h 内的玉米种子是耐脱水的, 且活力指数比原来干种子还有所提高, 此期内电解质渗漏速率不但没有明显增加反而略有下降; 预吸胀时间长于 24 h, 种子脱水耐性 (存活率和活力指数) 逐步下降, 电解质渗漏速率

也开始持续增加。存活率丧失 50% 和 100% 的预吸胀时间分别约为 33 h 和 58 h。

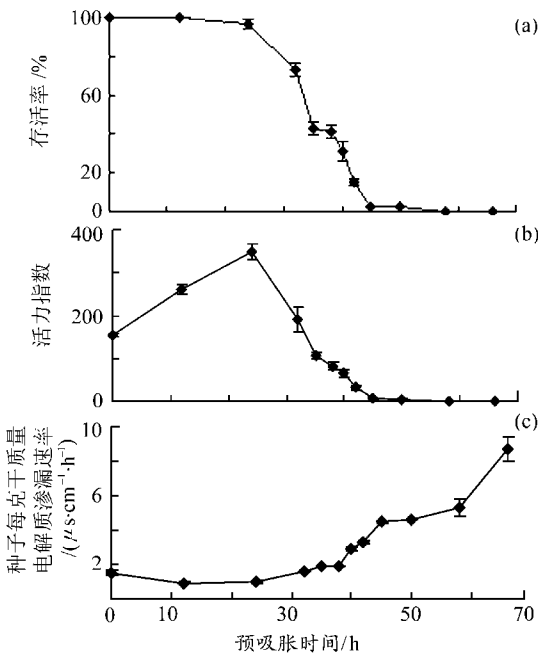


图 1 预吸胀对玉米种子脱水耐性的影响
Fig 1 Effects of pre-imbibition on desiccation tolerance in maize seeds

2.2 脱水对不同脱水耐性玉米胚活力的影响

取吸胀脱水后存活率分别约为 100%, 50%, 0 即吸胀 24, 35, 58 h 的玉米胚 (幼苗) 进行程度不同的脱水后测定其在脱水过程中活力和活性氧清除酶活性的变化。

吸胀不同时间玉米胚 (幼苗) 在脱水过程中存活率, 活力指数和电解质渗漏速率变化的差异明显 (图 2)。未丧失脱水耐性的胚 (吸胀 24 h) 能忍耐严重程度脱水 (脱水 72 h, 每克干质量含水 0.03 g), 脱水后存活率, 活力指数和电解质渗漏速率均无明显变化。吸胀时间愈长, 其在脱水过程中活力的降低和电解质渗漏速率的增加就愈快, 能忍耐的脱水程度就愈轻。如: 吸胀 35 h, 58 h 的胚 (幼苗) 的半致死脱水时间分别为 12 h 和 2 h (每克干质量含水分别为 0.08 和 0.52 g), 全致死脱水时间虽然均为 24 h, 但 35 h 的全致死每克干质量含水却低的多 (35 h 为 0.03 g, 58 h 为 0.17 g)。

2.3 脱水对不同脱水耐性胚活性氧清除酶活性的影响

不同脱水耐性的玉米胚 (幼苗) 其活性氧清除酶 (SOD, POD, CAT) 活性对脱水的反应存在明显的差异 (图 3)。未丧失和部分丧失脱水耐性 (吸胀 24 h, 35 h) 胚 (幼苗) 的 SOD 活性在脱水过程中先出现少量的降低, 随即就升高, 到最大值后再

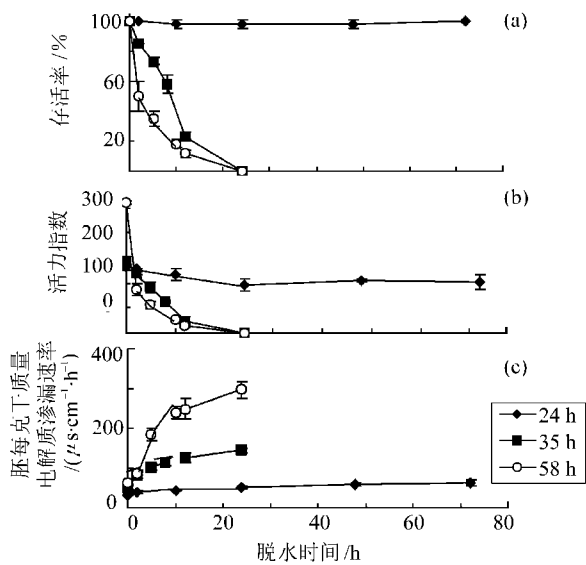


图2 不同预吸胀时间的玉米胚（幼苗）在脱水过程中活力和电解质渗漏速率的变化

Fig. 2 Changes of viability and rate of electrolyte leakage of maize embryos at different imbibed time

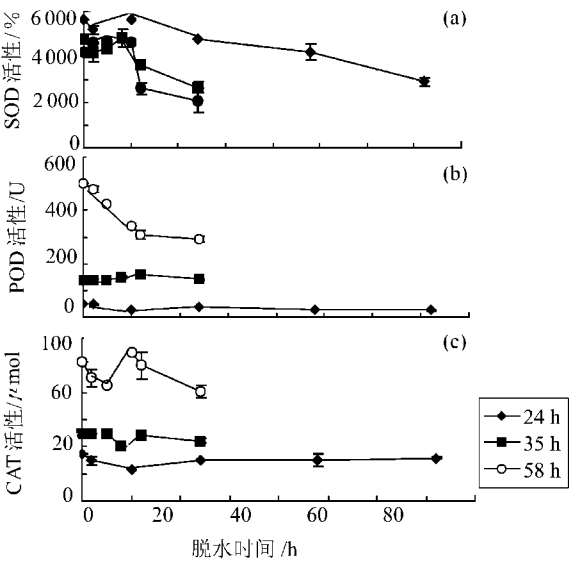


图3 不同预吸胀时间的玉米胚（幼苗）在脱水过程中活性氧清除酶活性的变化

Fig. 3 Changes of activity of reactive-oxygen-scavenging enzymes in maize embryos at different imbibed time during dehydration

开始下降，而完全丧失脱水耐性 58 h）胚（幼苗）的 SOD 活性在脱水的前期无降低的过程，脱水一开始就升高，到最大值后就迅速降低；吸胀时间越长，SOD 活性开始下降的脱水时间就越早，下降的速率就越快。吸胀 58 h 的 POD 活性在脱水的 12 h 内随脱水呈明显下降，尔后就下降较少；吸胀 24 h 和 35 h 胚轴的 POD 活性在脱水过程变化较小；吸胀 58 h 的 CAT 活性在脱水过程中呈明显的降低—升高—降低的变化趋势，而吸胀 24 h，35 h 的 CAT 酶活性在脱水过程中变化不明显。

2.4 脱水对不同脱水耐性胚（幼苗）MDA 含量的影响

未丧失或部分丧失脱水耐性（吸胀 24 h，35 h）的玉米胚（幼苗）MDA 含量在脱水过程中呈降低—升高—降低的变化趋势，但吸胀 24 h 的则总是维持较高水平；吸胀 58 h 的 MDA 含量在脱水前期开始上升，以后则随脱水而逐步下降（图 4）。

3 讨论

25℃下玉米种子脱水耐性开始丧失的预吸胀时间为 24 h，完全丧失脱水耐性的时间为 58 h（图 1a）。这比 Leprince 等^[5,6] 在 16℃下预吸胀的时间要短，但比 Koster 和 Lepold^[2] 在 25℃下吸胀的时间要长，说明玉米种子吸胀过程中脱水耐性的丧失进程与吸胀温度密切相关，也与品种有关。从不同吸胀时间玉米胚在脱水过程中的活力和电解质渗漏速率的变化看（图 2），其脱水耐性是一种数量性状。

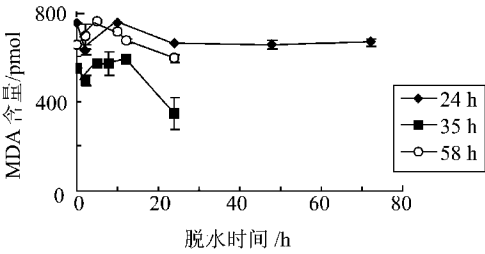


图4 不同预吸胀时间的玉米胚轴（幼苗）在脱水过程中MDA含量的变化

Fig. 4 Changes of MDA content in maize axes at different imbibed time during dehydration

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^[7-9]。

随着吸胀时间延长玉米种子的活性氧清除酶活性越来越容易被脱水所降低，在脱水过程中活性氧的清除能力自然越来越弱，这一结果与前人关于萌发玉米种子脱水耐性的丧失与自由基的积累并由之介导的脂质过氧化有关的结论是一致的^[9]。

完全丧失脱水耐性（吸胀 58 h）的玉米胚（幼苗）活性氧清除酶（SOD，POD，CAT）活性在脱水过程中的变化趋势（图 3）与顽拗性种子黄皮、枇杷、荔枝相似^[7-9]，但部分丧失脱水耐性的玉米胚（吸胀 35 h）的情况则与之有一定的差异。因此，在活性氧清除酶活性易在脱水过程中被破坏方面，吸胀至完全丧失脱水耐性的正常性种子与顽拗性种子是一致的。但是，从活性氧清除酶活性破坏

后, 活性氧积累并由之介导脂质过氧化的产物 MDA 来看, 顽拗性种子与完全或部分丧失脱水耐性的正常性种子都不同。顽拗性种子的 MDA 在整个脱水过程中总是不断增加的^[7-9], 但完全或部分丧失脱水耐性的玉米种子则不是 (图 4)。此外, 慢速脱水有利于吸胀至部分或完全丧失脱水耐性的正常性种子的活力保持^[3], 这也与顽拗性种子相反。因此, 吸胀正常性种子脱水敏感性的机理与顽拗性种子不是完全相同的。

参考文献:

- [1] SENARATNA T, MCKERSIE B D. Dehydration injury in germination soybean (*Glycine max* L. Merr.) seeds [J]. *Plant Physiol*, 1983, 72: 620—624.
- [2] KOSTER K L, LEPOLD A C. Sugars and desiccation tolerance in seeds [J]. *Plant physiol*, 1988, 88: 829—832.
- [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] LEPRINCE O, WERF A V D, DELTOUR R, et al. Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars [J]. *Physiologia Plantarum*, 1992, 85: 581—588.
- [5] LEPRINCE O, VERTUCCI C W, HENDRY G A F, et al. The expression of desiccation—induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature [J]. *Physiologia Plantarum*, 1995, 94: 233—240.
- [6] LEPRINCE O, AHERTON N M, DELTOUR R, et al. The involvement of Respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L [J]. *Plant physiol*, 1994, 104: 1333—1339.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] SONG S Q, FU J R. Desiccation sensitivity and peroxidation of membrane lipids in lychee [J]. *Trop Sci*, 1999, 39: 102—106.
- [10] 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 // MA-RZALINA M, et al. eds. IUFRO seed Symposium 1998 “Recalcitrant seeds” Proceedings of the conference [M]. Malaysia: Kuala Lumpur, 1998.

Changes in Desiccation Tolerance During Imbibition of *Zea mays* L. Relate to Activity of Reactive Oxygen Scavenging Enzymes

WU Xian jin, SONG Song quan, QIAN Chun mei, FU Jia rui

(School of Life sciences, Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Maize (*Zea mays* L.) seeds were used as experimental material. Changes in desiccation tolerance of seeds during imbibition, and changes of viability, rate of electrolyte leakage, MDA content and activity of reactive—oxygen—scavenging enzymes (SOD, POD, CAT) in maize embryos of different desiccation tolerance during dehydration were studied. At 25 °C the critical imbibition time of desiccation tolerance loss of maize seeds was 24 h. After imbibition of 58h, it totally lost desiccation tolerance. The loss of desiccation tolerance of imbibed maize seeds was a quantitative feature. It progressively lost during imbibition, and was not a “all or nothing response”. As imbibing more time, desiccation tolerance was lost more seriously, and the activity of reactive oxygen scavenging enzymes was easier to decrease during dehydration. The change pattern of activity of reactive oxygen scavenging enzymes in desiccation intolerant maize embryos (imbibed 58 h) during dehydration was similar to that of the recalcitrant seeds, however, for as partial desiccation—tolerant maize axes (imbibed 35 h), they were not as similar with each other. The change tendency of MDA content in as partial desiccation tolerant or desiccation tolerant maize embryos during dehydration was decreased increased decreased, but for desiccation intolerant maize axes, it increased at the early desiccation stage, then it decreased with dehydration.

Key words: *Zea mays* seeds; imbibition; desiccation tolerance; reactive oxygen scavenging enzymes