

花生种子耐脱水力的获得及与膜透性、水分状态的关系^{*}

杨晓泉 姜孝成 傅家瑞

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要 用快速干燥后胚轴的萌芽率、相对生长速度及电解质渗漏率表示种子的耐脱水能力, 研究了花生种子耐脱水力的消长模式。花生种子的耐脱水力在整个发育时期逐渐累积, 与膜维持液晶态有关。耐脱水的果针入土后 65 d 花生胚轴在含水量低于 0.1 g/g 时水分呈结合状态并可形成玻璃化, 玻璃化的形成是水分得以结合的主要原因。

关键词 花生种子, 耐脱水力, 膜脂相变, 水分状态

分类号 Q 945.6

目前在正常性种子耐脱水力形成的时期及方式方面存在很大争议。有些研究表明种子耐脱水力的获得大致与其生理成熟的时期相一致, 是一个突发性事件^[1]。但也有证据表明种子耐脱水力的获得比萌发能力的获得迟, 是一个缓慢的量变过程^[2]。这种差异主要起因于耐脱水力测定方法及表达方式的不同。在大多数实验中, 种子的耐脱水力是用种子干燥后的萌发率表示的, 而且采用的干燥处理方法各有不同。Fu 等^[3]的实验证明干燥速度与种子耐脱水力的获得密切相关, 缓慢干燥实际上诱导了花生种子耐脱水力的形成。本文通过测定快速吹风干燥 (Flash drying) 后胚轴的萌芽率、相对生长速度及电解质渗漏率变化, 研究了花生种子耐脱水力的消长模式。

细胞膜是脱水伤害的第 1 位点^[2], 而种子的水分状态对维持细胞膜的结构至为重要。有实验表明成熟大豆胚轴在低含水量时可进入有利于忍耐脱水的玻璃化状态^[4]。本文利用核磁共振法, 差示扫描量热法及 X 射线衍射法研究了发育及吸胀花生种子的水分状态、玻璃化及其与细胞膜稳定性的关系, 以期对种子耐脱水力与细胞膜、水分状况的关系有进一步的了解。

1 材料与方法

1.1 材 料

供试花生 (*Arachis hypogaea* L.) 品种为粤油-116, 种植于广东省农业科学院试验田内。开花后挂牌标记果针入土时间 (T_P /d), 按规定天数收集第 1 侧枝荚果。依据种子鲜质量、

^{*} 国家自然科学基金 (39470082) 和国家教委博士点基金 (9455808) 资助项目

收稿日期: 1997-04-28 杨晓泉, 男, 32 岁, 博士, 现在华南理工大学食品工程系

荚果纹理及种皮颜色确定种子的发育时期。

1.2 胚轴萌发

超净台上无菌剥取胚轴, 在含 d 为 2% 蔗糖培养基 (含 d 为 0.8% 的琼脂糖) 的 9 cm 培养皿中萌发 4 d (26°C 恒暗), 每皿 24~25 粒胚轴, 重复 3 次。计算萌发率 ($R\%$), 以胚轴伸出原长的 50% 为标准) 和胚轴长度 (l)。相对生长速度 (Relative growth rate, rg / ($\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$)) 按下列公式计算: $rg = [\ln(l) - \ln(l_0)] / t$, 其中, l_0 和 l 分别为萌发初与萌发后胚轴的长度, t 为培养天数。

1.3 耐脱水力测定

无菌剥取发育胚轴, 挑选完整无损并大小均一的胚轴用无菌水漂洗, 滤纸滤干, 置超净台上吹风干燥 4~12 h (依赖发育程度), 称重确认胚轴含水量达到每克干质量含水量 0.1~0.15 g [$w(\text{H}_2\text{O})$] 后按 1.2 进行萌发实验。以干燥后胚轴的 R 和 rg 表示胚轴的耐脱水能力。

1.4 电解质渗漏测定

剥取发育胚轴, 双蒸水漂洗 4 次, 超净台上吹风干燥至不同含水量, 以 15 min 至 2 h 间隔 (依赖于发育程度) 测定 20 粒胚轴的含水量 (重复 3 次), 倾入 10 mL 具塞刻度试管, 加入双蒸水 5 mL 振荡 4 h 后用 DDS-11A 型电导仪测定电导率 D_1 , 100°C 水浴 5 min, 冷至室温后测定总电导率 D_2 , 以 D_1/D_2 表示电解质渗漏率 (%)。

1.5 X 射线衍射 (XRD) 分析

发育及吸胀种子置活化硅胶干燥器真空干燥后至 $w(\text{H}_2\text{O})$ 为 0.02, 剥取胚轴固定在观察窗上, D/max-III 型 X 射线衍射仪 (理学电机公司产品) 测定。测试电压 35 kV, 电子束电流 35 mA, CuK-2 铜靶, 衍射角度 5° ~ 50° , CPS 设置 2 000。

1.6 核磁共振 (NMR) 测定

发育及吸胀种子密封于饱和 LiCl 溶液 (相对湿度 13%) 上部, 30°C 培养箱中干燥至 $w(\text{H}_2\text{O})$ 为 0.07~0.1 时, 剥取胚轴置于 10 mm 直径 NMR 样品管, FX900 核磁共振仪 (JEOL 公司产品) 上测定固体 ^1H 核磁共振谱。测试条件: 单脉冲 900 ms, 观测边偏置 55.5 kHz, 谱宽 4 kHz。

1.7 差示扫描量热 (DSC) 分析

发育及吸胀种子在饱和 LiCl 溶液 (相对湿度 13%) 中干燥至 $w(\text{H}_2\text{O}) = 0.1$ 时, 剥取胚轴 20 mg 置 5 mm 直径 DSC 样品盘, DSC-2C 差示扫描量热仪 (Perkin-Elmer 公司产品) 测定热事件。扫描范围 -60°C ~ $+50^{\circ}\text{C}$, 扫描速度 $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

2 结 果

2.1 花生种子耐脱水力的消长模式

快速吹风干燥 (flash drying) 可使花生发育胚轴的湿重在 2~6 h 内降低 50%~60%, 并显著降低幼胚轴的 R 和 rg 。 T_p 为 40 d 花生胚轴未获得耐脱水能力, 胚轴快速干燥后的 R 和 rg 在 T_p 为 45~65 d 发育阶段迅速增加, 而 65 d 胚轴获得了完全的耐脱水能力 (图 1)。花生胚轴的耐脱水力在 0~24 h 吸胀过程中逐渐下降, 但幅度较小, 吸胀 24 h 后耐水能力急剧下降, 至吸胀 48 h 后完全丧失了耐脱水能力 (未列出)。吸胀 0, 24, 36 及 48 h 花生胚轴的电解质渗漏率分别为 43.8%, 48%, 80% 及 93%。

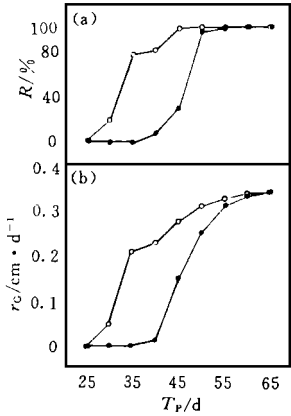


图 1 花生发育胚轴萌发率 (a) 及相对生长速率 (b) 的变化

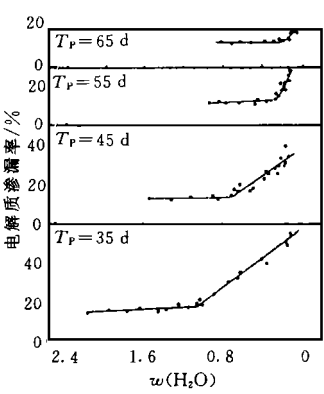


图 2 发育花生胚轴干至不同 $w(\text{H}_2\text{O})$ 时的电解质渗漏率变化

Fig. 1 Germination (a) and relative growth rate (b) of developing peanut axes
○ 快速干燥; ● 对照

Fig. 2 Changes of electrolyte leakage of developing peanut axes dried to various hydration levels

2.2 发育胚轴膜透性及膜物理状态的变化

图 2 比较了发育花生胚轴干至不同含水量时电解质渗漏率的变化. 发育胚轴可被干至一定含水量而电解质不发生明显渗漏, 但进一步干燥时, 电解质渗漏率迅速上升. 可见在一定 $w(\text{H}_2\text{O})$ (脱水阈值), 胚轴细胞膜发生不可逆的伤害. T_P 为 35, 45, 55, 和 65 d 花生胚轴的脱水阈值分别为 1.05, 0.7, 0.3 和 0.2 (图 2), 呈直线下降趋势, 65 d 胚轴基本不发生电解质渗漏.

模拟膜的实验表明处于液晶态的膜以 Bragg 点阵值约 0.46 nm 为中心有一个漫散衍射峰, 而凝胶状态的膜在 0.44 nm 处有狭窄的衍射峰^[5]. 生物材料比较复杂, 但在干燥的种子中只有极性膜脂有强烈的衍射^[6]. 对花生发育胚轴进行 XRD 分析, 发现 35 d 胚轴以 Bragg 点阵值 0.467 和 0.44 nm 为中心有叠加的衍射峰; 而 65 d 胚轴的衍射峰仅定位于 0.46 nm, 且次级衍射较少 (未列出). 说明 35 d 胚轴膜脂存在液晶态和凝胶态 2 种形式, 而 65 d 胚轴膜脂仅有液晶态 1 种形式.

2.3 吸胀胚轴的水分状态

图 3 的核磁共振数据显示, 当 $w(\text{H}_2\text{O}) < 0.1$ 时, 花生胚轴的水分呈结合状态. 花生胚轴吸胀后, 结合水的 $^1\text{H-NMR}$ 谱发生了明显改变. 随吸胀进行, 结合水的 NMR 能谱峰向低能场移动, 表明结合水的能量减弱, 其与细胞膜或大分子的结合力降低, 结合水的 NMR 能谱峰变宽, 显示细胞膜的半透性丧失.

图 4 用 DSC 测定了肿胀花生胚轴的热事件. 65 d 胚轴干至 $w(\text{H}_2\text{O})$ 为 0.1 时在 $-25.53 \sim +20.94^\circ\text{C}$ 范围形成松弛峰, 其中, -23°C 特征放热峰与蛋白质丧失结合态水分有关, $-20 \sim +5^\circ\text{C}$ 是脂类物质的吸热峰, 而在 $10 \sim 15^\circ\text{C}$ 左右存在玻璃化转变. 吸胀 24 h 胚轴在 -10°C 出现吸热峰, 说明结合态水在此温度结晶析出 (图 4 (b) 箭头). 吸胀 0, 24, 36, 及 48 h 胚轴的溶解热焓差 (ΔH_m) 分别为 19.85, 17.95, 11.18 及 7.94 J/g. 吸胀 48

h 胚轴不存在玻璃化转变。

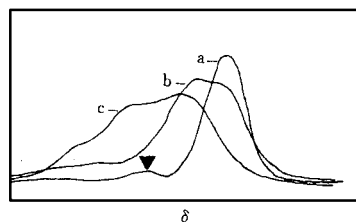


图 3 不同吸胀时间花生干燥胚轴的 ^1H NMR 谱

Fig. 3 ^1H NMR spectra of peanut axes

(a) 吸胀 0 h, (b) 24 h, (c) 48 h

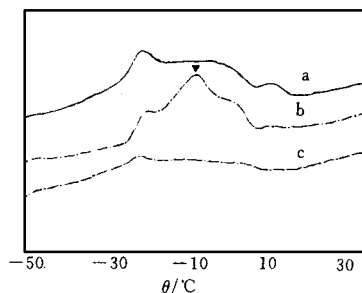


图 4 不同吸胀时间花生干燥胚轴的 DSC 谱

Fig. 4 DSC thermograms of imbibed peanut axes

(a) 吸胀 0 h, (b) 24 h, (c) 48 h

3 讨 论

采用快速吹风的干燥处理方法,可最大限度地避免缓慢干燥对耐脱水力的诱导问题.本文用胚轴快速吹风干燥后的相对生长速度及萌发率表示种子的耐脱水力,发现花生种子的耐脱水力在发育的中后期(T_d 为 45~65 d)明显增加.但本文也发现花生胚轴干燥后的电解质渗漏率在整个发育时期直线下降,说明花生种子的耐脱水力实质上是在整个发育时期逐渐累积的,是一个缓慢的量变过程.

花生幼胚轴脱水至一定含水量,电解质渗漏突然增加,这反映细胞膜半透性的丧失.NMR数据也显示花生胚轴吸胀后,结合水的能谱峰变宽并向低能场移动,结合水与膜脂或大分子的结合力减弱,说明细胞的分室效应丧失^[7],进一步证明细胞膜的半透性丧失.完全获得耐脱水能力的 65 d 胚轴在干燥后基本不发生电解质渗漏,XRD 数据揭示其膜脂完全处于液晶态,而不耐脱水的 35 d 胚轴膜脂则同时存在液晶态与凝胶态 2 种形式.说明花生种子膜脂维持液晶态的能力与耐脱水能力有关.凝胶态的膜呈六角晶格(hexagonal phase)状态,这可能是导致细胞膜渗漏的主要原因.

NMR 数据显示耐脱水花生胚轴的 $w(\text{H}_2\text{O}) < 0.1$ 时呈结合状态.DSC 数据表明耐脱水 65 d 花生胚轴在此含水量范围内进入玻璃化状态.花生胚轴吸胀后,结合态水分结晶析出,结合水的量迅速下降,玻璃化也不复存在,顽拗性种子黄皮的胚轴在任何含水量范围内均不能形成玻璃化,而仅在 5°C 左右形成 1 个水结晶的特征放热峰,当 $w(\text{H}_2\text{O}) < 0.43$ 时,在 DSC 图谱中不出现任何放热事件^[8],与吸胀 48 h 的花生胚轴类似.说明结合态水的存在和玻璃化的形成与花生种子忍耐脱水有关.XRD 数据亦揭示耐脱水花生胚轴的结晶化程度较低.玻璃化的形成可防止结合态水分因溶质结晶而析出^[4],而且可使细胞膜维持液晶态,从而防止了细胞膜的渗漏及脱水对种子的伤害.

参 考 文 献

- 1 Blackman R, Wattlaufer S H, Obendorf R L, et al. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant Physiol*, 1991, 96: 868~ 874
- 2 Leprince O, Hendry G A F, McKersie B D. The mechanism of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci Res*, 1993, 3: 231~ 246
- 3 Fu J R, Yang X Q, Jiang X C, et al. Heat stable protein and desiccation tolerance in recalcitrant and orthodox seeds. In: Ellis R H, Black M, eds. *Basic and applied aspects of seed biology*. London: Kluwer Academic Publishers, 1997. 705~ 713
- 4 Bruni F, Leopold A C. Glass transition in soybean seed. Relevance to anhydrous biology. *Plant Physiol*, 1991, 99: 488~ 494
- 5 Hoekstra F A, Crowe J H, Crowe L M. Membrane behavior in drought and its physiological significance. In: Taylorson R B, ed. *Recent advances in the development and germination of seeds*. New York and London: Plenum Press, 1990. 71~ 126
- 6 Seewalt K B, Priestley D A, Leopold A C, et al. Membrane organization in soybean seeds during hydration. *Planta*, 1981, 152: 19~ 23
- 7 Ishida N, Kano H, Kobayashi T, et al. Analysis of physical states of water in soybean seeds by NMR. *Agri Biol Chem*, 1988, 52: 2777~ 2781
- 8 姜孝成, 杨晓泉, 金剑平, 等. 黄皮种子脱水敏感性与水分状况的关系. *中山大学学报 (自然科学版)*, 1997, 36: 64~ 68

Membrane Behavior, Water Status and Acquisition of Desiccation Tolerance in Peanut (*Arachis hypogaea*) Seed

Yang Xiaoquan* Jiang Xiaochen Fu Jiarui

Abstract Desiccation tolerance of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds was achieved progressively during 45~ 65 days (after pegging), and lost at all in 24~ 48 h of imbibition. Electrolyte leakage of dehydrated axes showed a linear decline from 35 to 65 d. We concluded that the acquisition of desiccation tolerance of peanut seeds was a gradual event, rather than an abrupt transition. No obvious leakage occurred in 65 d axes which have acquired full desiccation tolerance. XRD indicated that the membrane lipids of 65 d axes remained the liquid crystalline state. ^1H NMR showed the weak binding of bound water and matrix in imbibed axes. DSC thermograms indicated the evidence of vitrification in 65 d peanut axes at low water content. Water exclusion accompanied by devitrification was observed in 24-hour imbibing axes.

Keywords peanut (*Arachis hypogaea*) seed, desiccation tolerance, membrane behavior, water status

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275