

CaCl₂ 和多胺对萌发花生种子乙烯释放和提高种子活力的影响

袁小丽 傅家瑞 李卓杰
(生物学系)

摘 要

以30m mol/L CaCl₂、0.1m mol/L 腐胺或0.05m mol/L 精胺浸泡种子可以提高花生种子活力和促进幼苗生长。同时, CaCl₂和腐胺能使萌发中的乙烯释放量明显增多。CaCl₂及多胺还能降低种子外渗液的电导率, K⁺和可溶性蛋白质含量, 有利于膜透性的修复, 以及提高过氧化物酶与过氧化氢酶活性。

关键词 花生种子, 种子活力, CaCl₂, 多胺, 乙烯释放, 膜透性

花生种子萌发时乙烯释放能力可以反映种子活力水平^[1,2]。应用PEG渗调处理花生种子提高活力的同时, 明显地提高乙烯释放量、ACC合成酶活性和ACC含量^[3]。Burns等认为CaCl₂处理能促进乙烯生成, 是由于Ca²⁺能维持细胞膜结构, 体现抗衰老效应^[4]。Fuhrer等指出, 多胺能使膜稳定从而影响到膜上的酶活性^[5]。本文试图应用多胺与Ca²⁺作为延缓衰老剂来稳定膜结构, 探讨在修复过程中乙烯释放的变化以及种子活力的提高。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试花生种子为“粤油-116”品种, 由广东省农业科学院经济作物研究所提供。高活力种子是1987年春植留种, 晒干后贮于干燥器内; 中等活力种子是高活力种子经35℃、92%相对湿度处理9天再行风干2天后贮藏的(人工加速老化)种子以及1985年秋植留种经2年贮藏后自然老化的种子。

1.2 种子萌发

选取大小均匀一致的花生种子为材料, 每批30粒, 重复3次, 在50ml烧杯中, 分别加入各种处理液30ml, 于28℃下浸泡一定时间; 另以蒸馏水浸泡作为对照。

参照Ketring的方法^[2], 用玻板直立法在28℃中进行萌发试验, 3天后测定发芽率及胚根、下胚轴长度, 并计算简化活力指数;

本文1989年1月31日收到

国家自然科学基金资助项目

缩写: Put, 腐胺; Spm, 精胺; PAs, 多胺; SAM, S-腺苷蛋氨酸; EFE, 乙烯生成酶; TEP, 盐酸甲胍氟丙嗪; CPZ, 氯丙嗪

简化活力指数 = 发芽率 × (胚根 + 下胚轴长度)(cm)

1.3 膜透性的测定

取5g种子,先用重蒸水冲洗两次,立即以滤纸迅速吸干种子表面水分。再用20ml重蒸水或各种处理液浸泡5小时,然后在室温中用DDS-11A型电导仪测定电导率。

花生种子经5小时溶液浸泡后,用77-B型火焰光度计测定种子浸泡液中K⁺含量。另外,吸取0.1ml浸泡液加入5ml考马斯兰-G250溶液中,在721型分光光度计595nm中比色,测定可溶性蛋白质含量。

1.4 酶活性测定

过氧化氢酶活性的测定参照章俊德的方法(1983)^[6],过氧化物酶活性测定参照华东师大《植物生理学实验指导》^[7]。

1.5 乙烯释放的测定

将10g种子先经5小时浸泡处理,然后放入垫有滤纸的锥形瓶内在28℃中进行萌发。经不同的时间间隔,分别加胶塞密封瓶口,保持在28℃下2小时后摇匀,抽取1ml气样,于103型气相层析仪中用氢焰检测乙烯含量。每个样品测定2~3个重复。

盐酸腐胺、精胺、盐酸甲胍氟丙噻、氯丙噻均购自Sigma公司。

2 试验结果

2.1 CaCl₂、PAs对花生种子活力和植株生长的影响

不同浓度Put或Spm浸种处理花生种子,除10m mol/L Put外,发芽率及活力指数均有不同程度的提高,其中以0.1m mol/L Put及0.05m mol/L Spm的效果较佳(图1)。试验结果还指出,用多胺浸种以6小时为适宜,浸种时间延长,提高率有所下降(表1)。

不同浓度CaCl₂浸种处理花生种子,除浓度过高的100m mol/L出现严重抑制种子萌发外,其余浓度均表现出促进效果,其中以30m mol/L效果最佳(图2)。50m mol/L溶液处理虽然抑制萌发,但对幼苗生长却有明显的促进作用。至于浸种时间则以12~18小时较佳(表1)。

表1 多胺、Ca²⁺处理不同时间的比较效应

Tab.1 Comparative effect on different durations treated with PAs or CaCl₂

处理	时间(h)	发芽率(%)	胚根+下胚轴长度(cm)	活力指数	活力比
0.1m mol/L Put	6	98	3.99	3.71	135
	12	95	3.32	3.15	115
	18	100	3.25	3.25	119
0.05m mol/L Spm	6	99	3.51	3.47	127
	12	92	3.73	3.43	125
	18	99	3.20	3.17	116
30m mol/L CaCl ₂	6	93	3.66	3.40	124
	12	100	3.99	3.99	146
	18	98	4.36	4.27	165

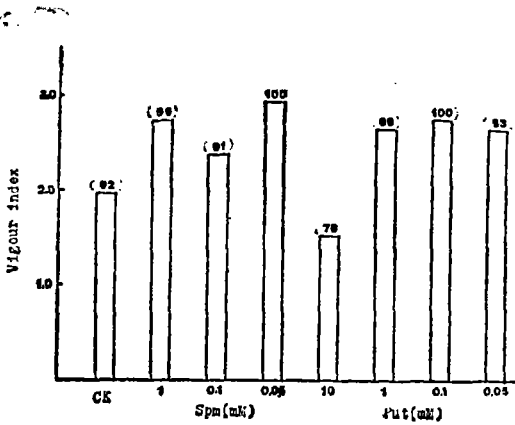


图1 Put、Spm对花生种子发芽率与活力指数的影响
(在括号内的数字为发芽率)

Fig.1 Effect of Put, Spm on germination and vigour index of peanut seed

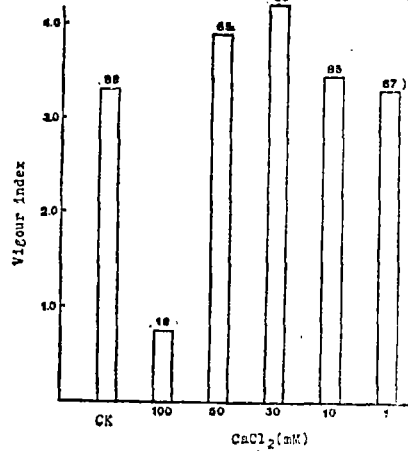


图2 CaCl₂对花生种子发芽率与活力指数的影响
(在括号内的数字为发芽率)

Fig.2 Effect of CaCl₂ on germination and vigour index of peanut seed

不同活力的花生种子分别经过 0.1mmol/L Put、0.05m mol/L Spm浸泡6小时, 或用30m mol/L CaCl₂溶液浸泡12小时, 发芽率及生长势均有所提高, 其中以中等活力种子的提高率较为明显(表2)。

表2 CaCl₂, PAs处理对不同活力花生种子萌发与活力的影响

Tab.2 Effect of CaCl₂, PAs on germination and growth of different vigour of peanut seed

种子活力	处理	发芽率(%)	胚根下胚轴长度(cm)	活力指数
高活力	CK	95	3.79	3.81
	0.1m mol/L Put	96	4.33	4.11
	30m mol/L CaCl ₂	96	4.86	4.66
中活力 (人工加速 老化)	CK	88	3.56	3.12
	0.1m mol/L Put	89	4.40	3.92
	30m mol/L CaCl ₂	89	5.88	5.23
中活力 (自然老化)	CK	90	2.94	2.73
	0.1m mol/L Put	100	3.25	3.25
	30m mol/L CaCl ₂	100	3.99	3.99

经过处理的种子播于盆内萌发, 40天后测量植株鲜重、株高, 可以看出 CaCl₂ 或 PAs处理均有提高花生苗期生长的效应(表3)。

表3 CaCl_2 , PAs处理对花生种子萌发后40天幼苗生长的影响
Tab.3 Effect of CaCl_2 , PAs on growth of peanut seedling(40 days)

处 理	10株幼苗平均鲜重		10株幼苗平均株高	
	g	以对照为100%	cm	以对照为100%
CK	25.5	100	9	100
0.1m mol/L Put	30.1	118	15	166
0.05m mol/L Spm	30.9	121	14	155
30m mol/L CaCl_2	32.6	128	16	178

2.2 CaCl_2 , PAs 对花生种子释放乙烯的影响

用 CaCl_2 、Put 分别处理花生种子, 乙烯释放量明显增加, 但对乙烯释放模式未有改变, 即乙烯峰仍在萌发24小时出现, 只是峰值明显提高。 CaCl_2 处理的种子在释放高峰后(萌发后60~72小时)仍保持较高的乙烯释放; 可是, Spm 并无促进乙烯释放之作用(图3)。

另用 Ca^{++} 络合剂 50m mol/L EDTA和CaM抑制剂 1m mol/L TFP及1m mol/L CPZ分别浸种12小时, 萌发种子的乙烯释放受到抑制, 其中CPZ抑制效果较大, 而TFP较小, 但三种处理均不改变乙烯释放模式(图4)。

2.3 CaCl_2 PAs对种子细胞膜透性的影响

用 CaCl_2 或Put、Spm处理的花生种子, 溶液中的电导率、外渗 K^+ 含量和可溶性蛋白质含量均有明显的下降(表4), 这表明 Ca^{++} 及PAs均有修复膜结构、降低膜透性的效应。

另外, 还测定了细胞内的过氧化物酶和过氧化氢酶活性。经过

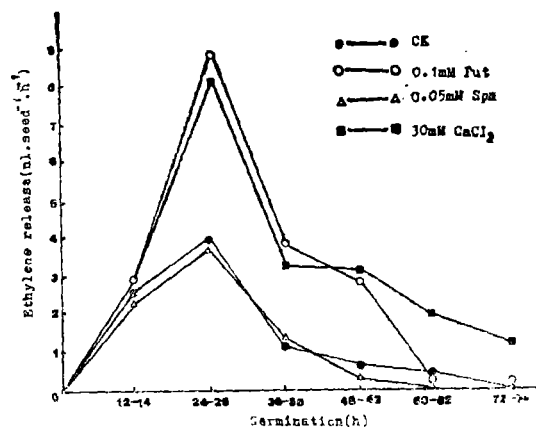


图3 CaCl_2 , PAs 对萌发生花生种子乙烯释放的影响
Fig.3 Effects of CaCl_2 , PAs on ethylene release in germinating peanut seed

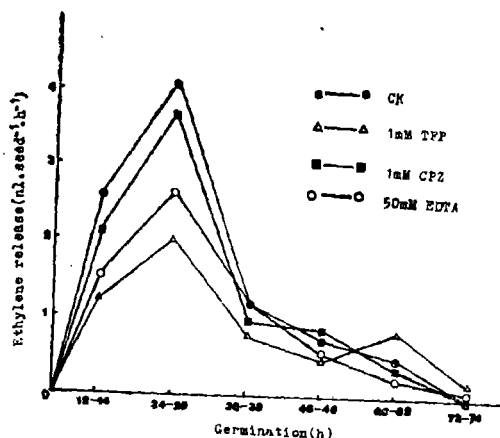


图4 TFP、CPZ和EDTA对萌发生花生种子乙烯释放的影响
Fig.4 Effects of inhibitors on ethylene release in germinating peanut seed

CaCl₂处理的种子,酶活性明显提高,Put处理的次之,而Spm处理的作用不明显(表5)。培养基内以Put或Spm代替NAA,可使离体胚轴的两酶活性有所提高,而在缺Ca⁺⁺培养基中的胚轴,酶活性均下降。当胚轴从缺Ca⁺⁺培养基中转移至完全培养基后,酶活性迅速恢复到原来水平(表6)。

表4 CaCl₂,PAs 处理对花生种子膜透性的作用

Tab. 4 Effect of CaCl₂,PAs on permeability of cell membrane in peanut seed

处 理	电导率($\mu\text{S}/\text{cm}\cdot 5\text{g}^{-1}$ 鲜重)	外渗K ⁺ 含量 (ppm/5g 鲜重)	外渗可溶性蛋白质 ($\mu\text{g}/\text{g}$ 干重)
CK	200.9	20.96	66.7
0.1m mol/L Put	113.9	14.68	41.3
0.05m mol/L Spm	118.9	13.65	44.5
30m mol/L CaCl ₂	150.0	14.33	43.7

表5 CaCl₂,PAs 处理对花生种子过氧化物酶、过氧化氢酶活性之作用

Tab. 5 Effect of CaCl₂,PAs on peroxidase and catalase activity of peanut seed

处 理	过氧化氢酶活性 ($\text{mgH}_2\text{O}_2/\text{min}\cdot\text{g}$ 鲜重)	过氧化物酶活性 (O.D.470nm/min·g鲜重)
CK	15.6	13.2
0.1m mol/L Put	18.0	15.6
0.05m mol/L Spm	16.7	14.2
30m mol/L CaCl ₂	20.1	19.8

表6 培养基内的 CaCl₂,PAs 对花生胚轴过氧化氢酶、过氧化物酶活性的影响

Tab. 6 Effect of CaCl₂,PAs on peroxidase and catalase activity of peanut embryonic axes incubated in MS medium for 12 days

培养基组合	过氧化氢酶活性 ($\text{mg H}_2\text{O}_2/\text{min}\cdot\text{g}$ 鲜重)	过氧化物酶活性 (O.D.470nm/min·g 鲜重)
CK	4.37	4.0
(MS+0.5mg/L NAA)		
MS+0.1m mol/L Put	4.53	5.2
MS+0.05m mol/L Spm	4.90	5.0
MS(-Ca ⁺⁺)	4.02	3.6
MS(-Ca ⁺⁺) 6 days		
MC(-Ca ⁺⁺)6 sadays	5.00	4.2
……→MS(+Ca ⁺⁺) 6 days		

3 讨论

CaCl₂对乙烯释放有促进作用^[8,9]。蛋氨酸通过SAM→ACC, 然后以ACC作为直接前体转化为乙烯^[10,11]。

在这生物合成途径中,SAM→ACC是个关键过程,为ACC合成酶所催化;当组织衰老膜系统发生损伤时,与膜结合的EFE所催化的ACC→乙烯的过程也成为关键^[12]。本文阐明了萌发花生种子释放乙烯时,加入外源CaCl₂,可提高乙烯值达到对照的两倍,且萌发后期释放乙烯的持续期延长。

据文献报道,多胺是延缓衰老因子^[5,13,14]。可是,Spd延缓叶绿素的消失并非是由于抑制乙烯生成^[5],而多胺抑制乙烯合成能力也非抑制衰老的原因^[15]。本文阐明了Spm抑制乙烯释放的同时却提高种子活力,而Put既促进乙烯释放,也提高种子活力。可见Spm与Put虽对种子萌发同样有效,但对种子生理的功能却存在差别。用不同浓度和处理不同材料,多胺的作用也不同。抑制黄化大豆下胚轴释放乙烯的过程,则以Spm最强,而Put较弱;抑制花瓣中乙烯生成的浓度是1~10m mol/L^[14]。我们促进花生种子萌发是用0.05m mol/L Spm或0.1m mol/L Put,如用10m mol/L Put则出现显著的抑制。Cho(1983)也认为Put的作用不同于Spm^[16]。

多胺与乙烯具有共同的前体(SAM),由于在生物合成中竞争前体,多胺便有抑制乙烯生物合成的作用^[17]。Roberts等亦指出,当内源多胺合成受到抑制时,乙烯的生成及衰老过程却被促进^[18]。可是,我们的实验是探讨外源多胺的作用,不同于内源多胺与乙烯之间的相互关系。至于蛋氨酸循环的调控机理,目前知道的还不多^[19]。因此,可以推论,Put与CaCl₂有稳定膜结构的作用,对膜上的酶活性有所提高,在适宜的浓度下,它们可以提高乙烯合成而不是降低乙烯合成。

膜系统损伤是种子劣变的主要原因。在吸胀时,种子细胞内含物如糖、氨基酸、K⁺等代谢物更多地向外渗漏^[20,21]。本试验证明这种渗漏可为多胺和CaCl₂所降低,表明它们对膜系统的完整性具有稳定作用。Roberts等指出CaCl₂及多胺是膜保护剂,在维持双层膜基本结构和控制膜透性方面起着重要作用^[18]。EFE位于膜上,多胺和CaCl₂对膜的影响必然涉及该酶活性,从而影响乙烯合成。Legge等认为CaCl₂对乙烯合成的保持就是由于它保护了EFE,免受膜上所发生的过氧化作用而损伤^[22]。Burns等指出,CaCl₂能提高衰老组织中的乙烯合成是由于稳定膜的结果^[4]。

从简化活力指数、发芽率和幼苗生长量来看,用CaCl₂、Put及Spm处理,均能促进花生种子的萌发,改善幼苗生长,具有一定的实践意义。

参 考 文 献

- [1] 黄学林等, 中山大学学报(自然科学版), 1983, 4, 17~26
- [2] Ketring D L et al., In Sumiki Y (ed.), *Plant Growth Substances*, Hirokawa publishing Co., Inc., Tokyo, 1974, pp.891~899
- [3] Fu J R et al, *Seed Sci. & Technol.*, 16(1988), 197~212

- [4] Burns J K et al., *Physiol. Plant*, 66(1986),609~615
- [5] Fuhrer J et al., *Plant Physiol.*, 70(1982), 1597~1600
- [6] 章骏德等, 植物生理实验法, 江西人民出版社, 1982, pp: 30~32.
- [7] 华东师范大学生物系植物生理教研室主编, 植物生理学实验指导, 人民教育出版社, 1983, pp.143~145
- [8] Evensen K B , *Physiol. Plant.*,60(1984),125~128
- [9] Lieberman M et al., *Plant Physiol.*,69(1982), 1150~1155
- [10] Yu Y B et al., *Plant Physiol.*,63(1979),589~590
- [11] Adams D O et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,76(1979), 170~174
- [12] Beyer E M et al., In: M B Wilkins(ed.), *Advanced Plant Physiology*, Pitman Publishing Inc., London, 1984, pp. 111~126
- [13] Apelbaum A et al, *Plant Physiol.*,67(1981),80~84
- [14] Suttle J C, *Phytochemistry*, 20(1981),1477~1480
- [15] Smith T A et al., *Ann.Rev. Plant Physiol.*, 36(1985), 117~143
- [16] Cho S C, *Plant Cell Physiol.*, 24(1983), 305~308
- [17] 戴尧仁, 植物生理生化进展, 1986, 4, 61~73
- [18] Roberts D R et al, *Plant Cell Physiol.*, 25(1984),315~322
- [19] McKeon T A et al., In Davies P J (ed.), *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherland, 1987, pp.94~122
- [20] Parrish D J et al., *Plant Physiol.*, 61 (1978), 365~368
- [21] Simon E W, *Jour. Exp Bot.*, 23 (1972), 1076~1085
- [22] Legge R L, et al, *Plant Cell Physiol.*,23(1982), 161~169

Effects of Calcium and Polyamines on Vigour Improvement and Ethylene Release of Germinating Peanut Seed

Yuan Xiaoli* Fu Jiarui Li Zhuojie

Abstract

Using CaCl_2 and polyamines as senescent delaying agents, the vigour improvement, membrane permeability and ethylene release in germinating peanut (*Arachis hypogaea L.*) seed were investigated. The material used was cultivar 'Yueyou 116' including the freshly harvested seed (high vigour seed) and seed with accelerated ageing (AA) (medium vigour seed) or seed with natural ageing (medium vigour seed). Besides the results of vigour index, germination percentage and growth, ethylene release was assayed by gas chromatograph, and some physiological and biochemical changes concerning the permeability of membranes were also investigated.

The seed vigour and seedling growth of peanut can be enhanced by seed treatment with CaCl_2 or putrescine (Put) and spermine (Spm). The optimal concentration

was 0.1m mol/L Put, 0.05mmol/L Spm or 30m mol/L CaCl_2 .

In treated seeds with CaCl_2 or Put, ethylene release increased obviously. Several Ca-inhibitors decreased ethylene release. Moreover, CaCl_2 and polyamines decreased the Conductivity, amount of K^+ and soluble protein in leachate of seed. They also increased the activities of peroxidase and catalase. It is suggested that calcium and polyamines are available for the repair of membrane permeability.

Keywords peanut seed, seed vigour, CaCl_2 , polyamines, ethylene release, membrane permeability

· 简 讯 ·

《香港植被》出版

中山大学生物学系张宏达教授等编著的《香港植被》(中山大学学报(自然科学)论丛[16])已由中山大学学报编辑部编辑出版。作者多年来对香港及九龙半岛植被进行了较为详尽的实地调查和研究。书中对香港地区的生态环境、植物区系、植被类型作了详细的论述。全书约30万字,是研究亚洲热带亚热带植被的一本重要参考书。

邮购请与中山大学生物学系植物学研究室联系。

(张楚氏)