

花生种子的劣变与过氧化作用*

陈光仪 傅家瑞

(生物学系)

摘 要

用100ppm V_c 和50ppm GSH 分别处理中等活力花生种子,均有提高种子活力的效应。萌发72小时的活力指数和幼苗活力均有明显的提高。

花生种子处理的最适条件,100ppm V_c 为6小时,50ppm GSH为1小时,在该条件下种子的过氧化物含量较低,过氧化氢酶活性和呼吸强度都较高,外渗 K^+ 、外渗蛋白和电导率均有下降的趋势。

种子老化,可以从活性氧或自由基的作用明显显示出来⁽¹⁾,它可能与膜的变化有关⁽²⁾,而膜的变化是由于过氧化作用^(3,4)带来透性的增大⁽⁵⁾、不饱和脂肪酸氧化与自由基的生成⁽⁶⁾。有关脂类过氧化物在衰老时增加的机理目前还不清楚,Fong 等人认为:超氧基(O_2^-)、羟基自由基(OH)和单线态氧($*O_2$)都可能引起脂类过氧化物的产生⁽⁷⁻⁹⁾。

还原型谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(V_c)具有还原性。在花生种子中曾被提取出来⁽¹⁰⁾,但把它们和种子老化连系起来的工作,还未见报道。本文试图用GSH和 V_c 提高劣变花生种子的活力,从而进一步证实GSH和 V_c 清除过氧化物的作用,以及对膜的修复作用。

一、材料和 方法

1. 材料 供试花生种子为粤油551。高活力种子是刚采收后不到一个月的种子。中等活力种子是采收后在常温下经过32—45%相对湿度贮藏6—7个月的种子。低活力花生种子是采收后在常温下经75%相对湿度贮藏近两年的种子,全部已失去发芽力。中下活力的种子是在75%相对湿度贮藏一年半的种子,部分具有发芽力。

2. 种子活力指标 活力指数 = 发芽率 × 胚根长(cm)。每次测定用50粒花生,重复二次。

本文1984年12月收到

●中国科学院科学基金资助课题。

3. **浸种溶液电导率** 取10粒种子,用20ml蒸馏水浸泡,再用GSH和Vc溶液处理种子,测定电导率,并以该溶液作为空白。测定时温度为25℃,浸泡时间为5小时,用DDS-11A型电导仪测定。

4. **幼苗活力测定** 盆栽用塘泥拌草木灰,下种后保持一定湿度,出苗后在25℃—28℃及自然光下生长,40天后测定株高、鲜重及干重。

5. **GSH的含量测定** 准确称取4克花生种子,按波钦诺克的方法测定^[11]。

6. **Vc含量测定** 称取4g花生种子,按“生物化学实验指导”所介绍的方法测定^[12]。

7. **过氧化物含量测定** 1克花生种子捣碎后,加30ml蒸馏水匀浆,转入150ml碘量瓶内加10ml 1N NaOH 摇匀后,加入20ml 0.1N 碘液,摇匀,在暗柜中放置20分钟进行碘仿反应,加入13ml 1N HCl,中和碱并使溶液偏酸。以0.5ml 1%淀粉为指示剂,用0.1N Na₂S₂O₃ 滴定。同时作空白,计算被过氧化物作用的碘量。

8. **过氧化氢酶活性测定** 称取3g种子,捣匀,用碘量法^[11]测定。

9. **超氧化物歧化酶(SOD)测定** 按Beauchamp等介绍的方法测定^[13]。酶活性计算以被抑制50%为一个酶活单位。测定酶蛋白^[14],换算成每毫克蛋白抑制酶活的单位。

10. **外渗K⁺测定** 花生种子经5小时浸泡后,吸取含K⁺外渗液5ml,加1ml 10%亚硝酸钴钠,混匀,放置2—3小时,待完全析出沉淀后,在2000—3000rpm离心15分钟,小心倒出上清液。用5ml洗涤液(5%NaNO₃和0.008%KNO₃)洗涤沉淀2—3次,然后向沉淀加入3ml 0.5N硫酸重铬酸钾溶液,用玻棒搅至沉淀完全溶解,加入45ml蒸馏水,2ml 20%KI,1%淀粉1ml,用0.1N Na₂S₂O₃ 滴定至蓝色褪去为终点,同时作空白,计算K⁺含量。

11. **外渗蛋白质测定** 吸取0.1ml浸泡花生种子外渗液放入5ml考马斯兰—G250溶液中,反应2分钟,待呈现的蓝色稳定后,在721型分光光度计595nm上比色,根据标准曲线(用牛血清蛋白作100—1000μg/ml标准曲线)查出蛋白质含量。

二、实验结果

1. 不同活力花生种子电导率和过氧化物含量

取高、中、低三种不同活力的种子测定发芽率、活力指数、电导率及过氧化物含量(表1)。

表1 不同活力花生种子活力指数、电导率和过氧化物含量变化

花生种子	发芽率 (%)	胚根长 (cm)	下胚轴长 (cm)	活力指数	电导率 μS/cm	过氧化物含量 (mgI ₂ ·g ⁻¹ drywt.)
高活力	100	2.40	1.82	2.40	135	91.90
中等活力	90	1.89	1.42	1.74	200	145.93
低活力	0	0	0	0	320	186.92

表 1 表明, 高活力种子的电导率和过氧化物含量均较低, 随着种子活力下降, 电导率升高, 过氧化物含量也增加。种子活力指数与电导率和过氧化物含量呈负相关^[4]。因此, 可以认为, 种子老化时膜伤害和过氧化作用呈正相关。

2. 不同活力花生种子GSH、Vc含量、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶(SOD)活性变化

在不同老化过程的花生种子中, GSH、Vc、SOD以及过氧化氢酶的含量变化如表 2 所示。

表 2 不同活力花生种子的几种生理活性物质的活性变化

生理活性物质	高活力花生种子	中等活力花生种子	低活力花生种子
还原型谷胱甘肽 (GSH $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{dry wt.}$)	571.02	427.34	162.62
抗坏血酸 (Vc $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{dry wt.}$)	434.53	118.42	66.56
过氧化氢酶 ($\mu\text{gH}_2\text{O}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{dry wt.}\cdot\text{min}^{-1}$)	3482.31	2523.12	1718.15
超氧化物歧化酶 (Unit $\cdot\text{g}^{-1}\text{dry wt.}$)	1872.04	1619.21	273.64

表 2 显示, 在三种活力种子中, 以低活力种子与高活力种子相比较, GSH 含量下降到近 1/4, Vc 也下降到近 1/7, 过氧化氢酶活性减弱到原活性 1/2, SOD 下降到原活性 1/6, 可见, 种子活力丢失与这 4 种物质大幅度的下降有关。

3. 应用GSH和Vc提高种子活力

应用GSH和Vc处理劣变的中等活力种子的试验结果见表 3—6。结果表明, GSH 和 Vc 对花生生长的效应由于处理的方式、浓度、时间以及老化程度的不同而异。

(1) 施用方式 用浸泡和种子萌发时施于培养皿两种方式。以浸泡的效果好, 浸泡的种子根生长快且白色, 用后一方式处理则胚根生长较慢, 而下胚轴却较粗, 且呈黄色。

(2) 处理浓度 处理浓度对胚的生长影响较大, 高浓度 GSH(1000—200ppm) 和 Vc(1000—200ppm) 使胚根生长较差, 且下胚轴增粗, 表现受抑制。当浓度下降至 GSH 50ppm 和 Vc 100ppm 时, 胚根生长良好, 下胚轴也正常生长。

(3) 浸泡时间 GSH浸泡花生 1 小时, 过氧化氢酶升高, 过氧化物含量下降。当浸泡时间再延长时, 过氧化氢酶活性逐步下降而过氧化物逐渐上升。经 Vc 浸泡 1—6 小时后, 种子呼吸强度提高, 但其中以 6 小时者呼吸强度最高(表 3)。40 天幼苗鲜重、干重的数值以浸泡 1 小时的效果较好(见表 4、5)。

表3 Vc处理中等活力花生种子的呼吸强度*

处理时间(h)	呼吸强度($\mu\text{lO}_2 \cdot \text{g}^{-1}\text{fr. wt. h}^{-1}$)	
	Vc 100ppm	对 照
1	144.6	72.6
3	171.6	84.3
5	176.9	100.5
6	191.7	169.7

* 处理完后立即测定

表4 GSH50ppm处理中等活力花生种子过氧化氢酶活性和过氧化物含量

处理时间(h)	过氧化氢酶活性	过氧化物含量
	($\mu\text{gH}_2\text{O}_2 \text{g}^{-1}\text{dry wt. min}^{-1}$)	($\text{mgI}_2 \text{g}^{-1}\text{dry wt.}$)
0	2390.88	165.70
1	3842.40	157.31
2	2229.14	165.70
3	2035.19	178.29
6	1643.73	183.53

表5 GSH50ppm Vc100ppm处理中等活力花生种子后40天苗的生物量

处理时间 (h)	100株苗鲜重 (g)	鲜重% (以对照为100%)	100株苗干重 (g)	干重% (以对照为100%)
对照 0	300	100	40.13	100
GSH 1	328	109	43.83	109
GSH 6	266	88	36.35	90
Vc 6	341	113	44.54	110

(4) 老化程度 高活力种子施用GSH和Vc后效应不大,这是因为种子本身已有足够GSH和Vc含量。中等活力花生种子施用后效果明显(表6)。对老化程度深的种子,即使加大浓度,效果也不太理想(表6)。这可能是因为老化程度深的种子膜的伤害已到了不能修复的程度。

根据表3—6可以归纳如下:GSH对中等活力的花生种子效果明显,其最佳处理浓度为50ppm,最佳处理时间为1小时。Vc对中等活力花生种子效果明显,其最佳处理浓度为100ppm,最佳处理时间为6小时。

中等活力花生种子在最佳处理浓度和处理时间处理后,进行分离提取,用Triton x-100提取含脂质部分,再用三氯醋酸沉淀,分别测定过氧化物含量的变化(见表7)。

表 6 应用GSH和Vc对花生种子活力提高效应

处理浓度 (ppm)		发芽率 (%)	胚根长 (cm)	下胚轴长 (cm)	活力指数	电导率 ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
中等活力种子*	GSH 50	78	3.07	1.66	2.39	155
	Vc 100	80	2.94	1.62	2.35	213
	对照(蒸馏水)	66	2.34	1.42	1.54	223
中下活力种子*	GSH 200	64	2.48	1.46	1.59	220
	Vc 200	46	1.31	1.18	0.61	325
	对照(蒸馏水)	60	1.33	1.16	0.85	315

*中等活力种子为72小时记录的数据，中下活力种子为120小时记录的数据。

表 7 GSH、Vc处理中等活力花生种子后分离各部分的过氧化物含量变化* ($\text{mgI}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{dry wt.}$)

处 理	triton x-100提取部分		可溶蛋白质部分		不 溶 物		总过氧化物含量
	过氧化物含量	占总量百分率(%)	过氧化物含量	占总量百分率(%)	过氧化物含量	占总量百分率(%)	
GSH 50ppm 1小时	48.84	24.74	92.60	46.90	55.97	28.35	197.41
Vc 100ppm 6小时	50.37	25.32	103.29	51.92	45.28	22.76	198.94
对照(不处理)	66.17	27.98	107.36	45.41	62.89	26.60	236.42

* 二次重复的平均值

表 7 表明：在GSH或Vc的最适处理条件下，可使中等活力花生种子总的过氧化物量明显下降。其中GSH清除过氧化物在脂质部分和可溶蛋白质部分较明显。而Vc清除过氧化物在脂质部分和不溶物部分较明显。从而看出了GSH和Vc对膜脂过氧化有减轻的效果。

为了探讨GSH和Vc对膜调控物质外渗的作用，测定了GSH、Vc处理后外渗K⁺、外渗蛋白和电导率，所得结果列在表 8 和表 6（中等活力种子），

表 8 和表 6 表示，经GSH、Vc处理后，外渗K⁺、外渗蛋白和电导率都低于对照，说明膜控制物质外渗的功能被GSH、Vc所修复。和表 7 的试验结果连系起来，可得出如下结论：GSH作用位点可能在膜和蛋白质部份。而Vc作用的位点可能在膜和不溶物部份。

表8 GSH, V_c浸泡中等活力花生种子后外渗K⁺和蛋白的含量

处 理	外 渗 K ⁺ (mg·g ⁻¹ dry wt.)	外 渗 蛋 白 (mg·g ⁻¹ dry wt.)
GSH 50ppm 6小时	2.18	8.55
V _c 100ppm 6小时	1.69	11.4
对照 蒸馏水 6小时	2.26	12.6

三、讨 论

Pearce和Samad比较了花生的新鲜种子和老化种子,发现老化种子的外渗电解质明显增多^[15]。电导率的上升表示外渗物量的增加,也反映出膜脂的过氧化作用。因此,从电导率的变化可以测出种子活力的大小^[16,17]。

从我们的试验中可见,花生种子活力高低和过氧化物含量的多少呈负相关,也与电导率的大小呈负相关。过氧化物的积累加剧膜的损伤,提高外渗量。与此同时,有清除自由基作用的过氧化氢酶和超氧化物歧化酶以及GSH、V_c则明显下降,表明过氧化作用活跃,防御自由基能力减弱或消失,这样膜所受到的攻击就大大增强,种子活力显著下降。从这一系列变化的相关性,可以推论膜脂的过氧化是膜的损伤的一个重要原因。

我们的实验证明,外加GSH或V_c于劣变种子,不但可以降低电导率、提高活力指数,而且还可以改善过氧化氢酶活性,降低过氧化物含量,增强呼吸作用。从过氧化物量的变化,可以推论GSH与V_c的共同作用点是在脂质部分。不论是内源GSH、V_c或外加的GSH、V_c,其作用很可能与膜的修复有关。这一修复的基础可能是GSH、V_c清除自由基的能力。

Stewart和Bewley指出,膜脂过氧化与大豆胚轴的人工老化有关。膜上的不饱和脂肪酸过氧化是活力、发芽力丧失的基本原因^[4]。因此,对膜脂过氧化及其修复有进一步研究之必要,藉以阐明劣变机理。

参 考 文 献

- [1] 莫简,活性氧及其生物学作用,生物化学和生物物理学进展,1981,3,27—29.
- [2] Heydecker, W., Vigour. In: *Viability of Seeds*, E.H. Roberts(ed.), 1972, 209—252, Chapman and hall.
- [3] Koostra, P. F., Harrington, J. F., *Proc. Int. Seed Test. Ass.*, 34 (1969), 329—340.

- [4] Villiers, T. A., *Seed Ecology*, W. Heydecker(ed.), 1973, 265—288, Butterworths, London.
- [5] Van Zutphas, H., Cornwell, D. G., *J. Membr. Biol.*, 13(1973), 79—88.
- [6] Harman, G. E., Mattick, L. R., *Nature.*, 260(1976), 323—324.
- [7] Fong, K. L., McCay, P. B., Poyer, J. L., *J. Biol. Chem.*, 248 (1973), 7792—7797.
- [8] Kellogg, E. W., Fridovich, I., *J. Biol. Chem.*, 250(1975), 8812—8817.
- [9] Pederson, T. C., Aust, S. D., *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 52 (1973), 1071—1078.
- [10] Reeres, W. A., Guthrie, J. D., *Archs. Biochem. Biophys.*, 26(1950), 316.
- [11] 波钦诺克, X.H., 植物生物化学分析方法, 科学出版社, 1981.
- [12] 北京大学生物化学教研室, 生物化学实验指导, 人民教育出版社, 1980.
- [13] Beauchamp, C., Fridovich, I., *Ann. Biochem.*, 44(1971), 276—287.
- [14] Lowry, O. H. et al., *J. Biol. Chem.*, 193(1951), 265—275.
- [15] Pearce, R. S., Samad, I. M. A., *J. Exp. Bot.*, 31(1980), 1283—1290.
- [16] Ellis, R. H., Roberts, E. H., In: *Seed Production*, P. D. Hebblethwaite(ed), 1980, 605—635, Butterworths, London.
- [17] 陈光仪, 傅家瑞, 种子, 1983, 3, 16—20.
- [18] Stewart, R. R. C., Bewley, J. D., *Plant Physiol.*, 65(1980), 245—248.

Deterioration of the Peanut Seeds and Its Peroxidation

Chen Guangyi

Fu Jiarui

Abstract

During ageing of peanut seeds, the increment of level of lipid peroxide was correlated with decreased levels of GSH (glutathion), Vc (ascorbate), Catalase and SOD (superoxid dismutase).

After treating with 100ppm Vc or 50ppm GSH, the vigor index of seeds germinating for 3 days and vigor of seedling markedly raise.

The best condition for peanut seeds is 100 ppm Vc for 6 hours and 50 ppm GSH for 1 hour. In such conditions, the level of peroxide in seeds is the lowest, but the activity of catalase is highest.

In the best condition, Vc scavenges peroxides of lipid fraction and insoluble fraction, while GSH scavenges peroxides of lipid fraction and soluble protein fraction, and leakage of K^+ , protein, and the conductivity of peanut seeds is decreased. It is showed that the function of membrane which regulated the leakage of K^+ and other substances with the action of Vc or GSH is renovated.