

不同活力花生种子萌发中ICL活性的变化及渗透调节法对酶活性的影响

张北壮 傅家瑞

(生物学系)

摘要

实验结果证明,不同活力的花生种子在萌发中异柠檬酸裂解酶(ICL)活性的表现模式不同。随着活力的降低,ICL活性高峰出现的时间推迟,峰值下降。应用20%聚乙二醇(PEG)在播前进行渗透调节,花生种子活力的提高与ICL相对活性的增加密切相关。实验结果还表明,在PEG渗透期间,花生种子已出现ICL的RNA合成。

种子在劣变过程中,一些水解酶活性增高,而呼吸系统中的一些酶活性却下降^[4]。Abdul-Baki和Anderson曾经报导与种子发芽力有关的若干酶类^[5]。Grabe等人在玉米^[6,11]、小麦^[5,14]和水稻^[7]中获得了谷氨酸脱羧酶活性与发芽率的高度相关系数。Scholl曾证明乙醛酸循环中的关键酶异柠檬酸裂解酶(Isocitrate lyase,简称为ICL)的活性与棉花种子的胚轴生长密切相关,并且指出ICL活性是棉花幼苗活力的良好指标^[20,21]。但是前人对ICL的研究主要局限于可溶性酶的提取、测定^[12,13,15,17],酶的细胞定位分布^[8]以及酶的激素调控^[3,10]方面。迄今为止,尚未见有涉及ICL与花生种子活力关系的研究报导。本工作试图探讨几种不同活力花生种子在萌发过程中ICL活性变化的模式以及PEG渗透调节法(Osmo-conditioning)对提高花生种子活力与ICL活性变化的关系,同时还研究了5-氟尿嘧啶对渗透调节效果的影响,为进一步研究种子劣变机理提供线索。

一、材料和方法

1. 实验材料 供试花生为“粤油551”品系,广东省农科院经作所提供。种子采收后分别经不同贮藏处理:高活力种子为贮于45%相对湿度(RH)中60天的种子,中活力种子为贮于45%RH中105天,然后移入32℃的饱和湿度中处理15天的种子,低活力种子为贮于75%RH中120天的种子(由83年8月至12月);极低活力种子系隔年采集、室

本文1984年4月收到

●中国科学院科学基金资助课题。

内开放贮藏的种子。

将花生种子置28℃恒温下萌发1至7天,分别测定不同萌发时间的花生幼苗ICL活性的变化。试验重复两次,每次试验测定3—4次。

2. PEG渗透调节处理 将种子置于铺有滤纸的培养皿中,加入适量的20%PEG或加入含5.0mM 5-氟尿嘧啶的20%PEG溶液,在16±1℃下渗透48小时,洗去种子表面残存的PEG后,与对照同时置于18℃下培养6天,测定ICL活性。试验重复2次,每次试验测定4次。

将经20%PEG处理和未经处理的各种活力种子分别放在18℃下培养6天,测定发芽率、幼苗生长势及活力指数。测定重复两次,每次取不同活力的种子各50粒。

3. ICL酶液的制备 经不同萌发时间的花生种子用冷却的pH7.7(含15μM MgSO₄) 0.1M Tris—HCl缓冲液洗2次,置研钵中,加少许石英砂及6ml上述缓冲液,在冰浴中研磨成匀浆,用2层纱布过滤,将滤液用缓冲液定容10ml,在0—4℃下、12000rpm离心15分钟,其上清液为酶液,立即测定ICL活性。

4. ICL活性测定 参照Mcfadden^[18]和Ching^[9]的方法,但对某些步骤作了一些改变。反应混合液中含有1.0ml pH7.7 0.1M Tris—HCl缓冲液;0.20ml 150μM MgSO₄; 0.20ml 60μM半胱氨酸—HCl; 0.20ml酶液。在30℃恒温水浴中保温10分钟后加0.20ml 7.0mM异柠檬酸三钠。反应30分钟,立即加入0.20ml 10%三氯乙酸(TCA)终止反应。对照则先加入TCA至反应液后,再加入异柠檬酸三钠,反应液总体积为2.0ml。反应终止后,2000rpm离心5分钟,吸取上清液1.0ml,加0.20ml 0.1%二硝基苯肼溶液,在30℃恒温水浴中保温30分钟,再加2.0ml 1.5N NaOH显色,立即在波长445nm处测定其光密度。求出乙醛酸含量,再计算得出ICL活性(以μg乙醛酸·克样品⁻¹·小时⁻¹表示)。

二、结果与讨论

1. 不同活力花生种子萌发中ICL活性的变化

不同贮藏条件的花生种子,具有不同活力和发芽力(表1)。依据它们的活力指数大小,把这四批种子分为高活力(I)、中等活力(II)、低活力(III)、极低活力(IV)四个等级种子。

表1 在28℃恒温下萌发3天的花生种子活力

种子代号	贮藏条件	发芽率 (%)	胚根+下胚轴长度		活力指数对比 (%)
			(cm)	活力指数*	
I	贮于45%RH中60天	100	1.37	1.370	100
II	贮于45%RH中105天后,移入32℃的饱和湿度中15天	64.0	1.40	0.896	65.4
III	贮于75%RH中120天	38.0	0.84	0.319	23.2
IV	隔年采集的种子,室内开放贮藏	37.5	0.27	0.101	7.3

* 活力指数 = 发芽率(%) × [胚根+下胚轴长度(cm)]

图1表明,不同活力的花生种子在萌发过程中ICL活性出现的模式显著不同。高活力种子(I)在萌发第2天出现ICL活性高峰,随后逐渐下降。中等活力种子(II)出现ICL活性高峰时间较之I号种子推迟2天,在高峰处的酶活性比I号种子降低24.4%。低活力种子(III)出现ICL活性高峰的时间较之I号种子推迟3天,在高峰处的酶活性比I号种子降低37.8%。极低活力种子(IV)出现ICL活性高峰的时间推迟,峰值较低(第4天),其高峰值比I号种子ICL活性降低50.0%。

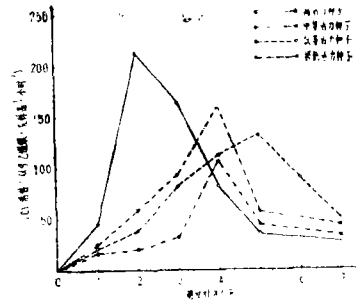


图1 不同活力花生种子萌发中ICL活性的变化(两次重复试验的平均值)

实验结果显示,高活力花生种子的ICL活性较高,而活力下降后,ICL活性高峰推迟,峰值下降。丧失生命力的花生种子吸胀1至7天均未发现ICL活性。因此,可以认为ICL活性的降低是花生种子活力下降的一个生理指标。在萌发过程中,早期(2天)出现ICL活性高峰,有利于花生种子萌发时的脂肪代谢,从而改善幼苗的生长。

2. PEG渗透调节法对花生种子活力和ICL活性的影响

PEG渗透调节法可以提高花生种子活力⁽¹⁾。经20%PEG处理和未经处理的花生种子在18℃下萌发6天,种子活力指数相差较为显著(表2)。

表2 经20%PEG处理和对照花生种子在18℃中萌发不同时间的活力指数对比*

处 理	在18℃下萌发不同时间的活力指数对比(%)		
	4 天	6 天	8 天
对 照	100	100	100
20% PEG	195.8	226.9	185.6

* 种子在45%RH中贮藏210天后测定。

表3结果表明,在较低温(18℃)下20%PEG提高花生种子活力的效果比在较高温(28℃)下更为有效。低活力种子经PEG处理后,活力指数的提高比高活力种子显著,其活力指数提高达3倍之多。

表4中的数据表明,不同活力的花生种子经20%PEG处理后,种子活力和幼苗中的ICL活性均显著提高。实验结果还表明,PEG渗透调节法对花生种子活力的提高与ICL活性的增加密切相关(图2)。由此证明,ICL活性的降低是花生种子活力下降的重要因素之一。

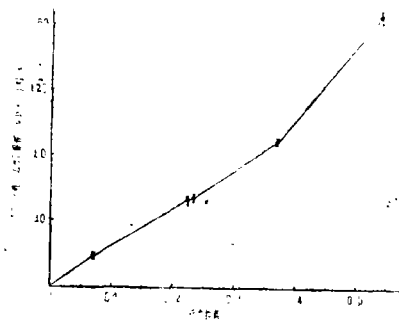


图2 花生种子活力与ICL活性的关系

表3 20%PEG处理后在不同温度中萌发对花生种子活力的影响*

活力类型	调查项目	28℃		18℃	
		对照	20%PEG	对照	20%PEG
高活力种子(I)	发芽率(%)	100	100	66.0	84.0
	胚根+下胚轴长度(cm)	1.37	1.49	0.43	0.64
	活力指数	1.37	1.49	0.28	0.54
	活力指数对比(%)	100	108.8	100	192.9
低活力种子(II)	发芽率(%)	38.0	50.0	23.5	50.0
	胚根+下胚轴长度(cm)	0.48	1.19	0.31	0.45
	活力指数	0.319	0.60	0.073	0.225
	活力指数对比(%)	100	188.1	100	308.2

* 在28℃, 萌发3天测定; 在18℃, 萌发6天测定。

表4 不同活力花生种子经20%PEG处理后种子活力和ICL活性的变化*

种子代号	处理	种子活力				ICL 活性		
		发芽率(%)	胚根+下胚轴长度(cm)	活力指数	活数对比(%)	ICL 活性 (μg 乙醛酸 $\cdot\text{克}^{-1}\cdot\text{小时}^{-1}$)	相对活性(%)	t 检验
I	对照	66.0	0.43	0.281	100	108.18 ± 4.73	100	P<0.01
	20%PEG	84.0	0.64	0.540	192.9	167.83 ± 6.31	155.1	
II	对照	34.0	0.39	0.132	100	40.50 ± 1.46	100	P<0.01
	20%PEG	70.0	0.54	0.371	281.0	88.83 ± 2.18	219.3	
III	对照	23.5	0.31	0.073	100	18.00 ± 1.21	100	P<0.01
	20%PEG	50.0	0.45	0.225	308.2	52.50 ± 3.67	291.7	
IV	对照	37.5	0.27	0.101	100	20.00 ± 0.94	100	P<0.01
	20%PEG	45.0	0.52	0.234	231.6	53.16 ± 1.14	265.8	

* I II III号的种子活力和ICL活性是在18℃中萌发6天后的结果, IV号种子活力和ICL活性是在28℃中萌发3天后的结果。

3. 5 - 氟尿嘧啶对PEG渗透调节效果的影响

5-氟尿嘧啶(5-FU)是RNA生物合成的一种抑制剂。花生种子萌发时加入5-FU能显著地降低ICL活性^[17]。在20%PEG渗透的2天期间加入5.0mM 5-FU, 均能使经过PEG处理的高活力和低活力花生种子(在萌发6天时)ICL活性分别降低

41.6%和53.0%，几乎与对照种子的ICL活性数值相似(表5)。

表5 5.0mM 5-FU对PEG渗透调节效果的影响*

种子活力类型	萌发6天的ICL活性(μg 乙醛酸 $\cdot\text{克}^{-1}\cdot\text{小时}^{-1}$)		
	对 照	20%PEG	20%PEG + 5.0mM 5-FU
高活力种子(I)	108.18 \pm 4.73	167.83 \pm 6.34	98.00 \pm 10.04
低活力种子(II)	18.00 \pm 1.21	52.50 \pm 3.67	24.70 \pm 3.57

* 种子经PEG或PEG + 5-FU处理后，洗净，与对照同时置18°C中萌发。

实验结果表明，在PEG处理期间加入5.0mM 5-FU基本上消除了PEG渗透调节对ICL活性的促进效应。可以推论在PEG渗透期间花生种子已出现ICL的RNA合成，这与我们以前的实验结果一致^[2]。

我们还对于种子和经PEG及PEG + 5-FU处理2天的种子(未经萌发)进行测定，但是均未发现ICL活性，其原因可能是由于PEG渗透期间种子吸胀水分较低，未能进行ICL合成。许多研究证明ICL是种子萌发时在体内重新合成的^[12,13,16,17]。种子萌发期间RNA和蛋白质的合成对ICL活性增加是必要的^[16]，所以在PEG渗透期间RNA的合成对种子在吸水后的萌发过程中ICL(蛋白质)的合成无疑是起到促进作用的。当20%PEG混合5.0mM 5-FU进行渗透处理时，花生种子中的RNA合成受到抑制，因而影响随后发生的ICL(蛋白质)合成。经20%PEG混合5.0mM 5-FU处理的花生种子ICL活性数值接近对照水平，恰好说明此项处理的种子实际上是在渗透结束，即解除5-FU的抑制后，与对照种子似乎是同步起始RNA生物合成的。

参 考 文 献

- [1] 傅家瑞、蔡东燕、张北壮，中山大学学报(自然科学版)，1983，2,139—140。
- [2] 傅家瑞等，中山大学学报(自然科学版)，1984，1,33—39。
- [3] 黎锡扬等，植物生理学报，1983,2,175—181。
- [4] Abdul-Baki, A. A., *Plant Physiol.*, 44 (1969), 733-738.
- [5] Abdul-Baki, A. A. and J. D. Anderson, In: *Seed Biology*, Vol. II, T. T. Kozlowski (ed.), 1972, p.283-351.
- [6] Bautista, G. M. and P. Linko, *Cereal Chem.*, 39 (1962), 455-459
- [7] Bautista, G. M., J. C. Lugay, L. J. Cruz and B. O. Juliano, *Cereal Chem.*, 41 (1964), 188—191.
- [8] Breidenbach, R. W. and H. Beevers, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 27 (1967), 462-469.
- [9] Ching, T. M., *Plant Physiol.*, 46(1970), 475-482.
- [10] Fleming, J. R., J. A. Johnson and B. S. Miller, *Cereal Chem.*, 37(1960), 363-370.
- [11] Grabe, D. F., *Proc. Assoc. Off. Seed Anal.*, 54(1964), 100-109.
- [12] Gientka-Rychter, A. and J. H. Cherry, *Plant Physiol.*, 43(1968), 653-659.
- [13] Khan, F. R. and B. A. Mcfadden, *Plant Physiol.*, 64(1979), 228-231.

- [14] Linko, P. and L. Sogn, *Cereal Chem.*, 37(1960), 489-499.
- [15] Longo, C. P., *Plant Physiol.*, 43(1968), 660-664.
- [16] Lado, P., M. Schwendimann and E. Marre, *Biochem. Biophys. Acta*, 157(1968), 140-148.
- [17] Marcus, A. and J. Feeley, *Biochem. Biophys. Acta*, 89(1969), 170-171.
- [18] Mcfadden, B. A., *Methods Enzymol.*, 13(1969), 163-170.
- [19] Penner, D. and F. M. Ashton, *Biochem. Biophys. Acta*, 148(1967), 481-485.
- [20] Scholl, R. L., *Crop Sci.*, 14(1974), 296-300.
- [21] Scholl, R. L., *Crop Sci.*, 16(1976), 701-703.
- [22] Throneberry, G. O. and F. G. Simth, *Plant Physiol.*, 30(1955), 337-343.

Changes of Isocitrate Lyase Activity in Peanut Seed of Different Vigor during Germination and the Effect of Osmoconditioning on Enzyme Activity

Zhang Beizhuang Fu Jiarui

Abstract

The pattern of isocitrate lyase (ICL) activity changes during germination of peanut seed of different vigor. In high-vigor peanut seed the ICL activity reached a maximum peak after 2 days of imbibition. In medium-vigor peanut seed the ICL activity reached a maximum peak after 4 days of imbibition. In low-vigor peanut seed the ICL activity reached a maximum peak after 5 days of imbibition. In lowest-vigor peanut seed the ICL activity peak decreased more than that of the preceding peanut seeds. The ICL activity in maximum peak of the medium-vigor seed decreased 24.4%, that of the low-vigor seed decreased 37.8%, and that of the lowest-vigor seed decreased to 50.0% as compared with the high-vigor peanut seed.

In the seeds soaked in 20% Polyethylene glycol (PEG 6000) for 2 day period (at $16 \pm 1^\circ\text{C}$) the ICL activity was markedly increased during germination. As the relative ICL activity of control is 100%, that of the high-vigor seed treated with 20% PEG was 155.1%, that of the medium-vigor seed was 219.3%, that of the low-vigor seed was 291.7%, and that of the lowest-vigor seed was 265.8% as compared with the control. With seeds soaked in 20% PEG the increase of relative ICL activity during germination at 18°C was much higher than that during germination at 28°C . These results indicated clearly that the vigor of peanut seed was closely correlated with the ICL activity.

The ICL activities in peanut seeds of high or low-vigor during germination were respectively decreased 41.6% and 53.0%, respectively, if 5-Fluorouracil (5.0mM) was added during the PEG osmoconditioning of seed. The result indicated that RNA directing synthesis of ICL was synthesized *de novo* during the PEG osmoconditioning of peanut seed.