

菠菜种子超干贮藏后抗老化作用的生理特性^{*}

李玉红^a, 陈 鹏^b, 王 绮^a, 关志华^a, 程智慧^a

(西北农林科技大学 a 园艺学院, b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 从发芽率、保护酶系活性、脱氢酶活性、丙二醛含量和种子蛋白等方面对菠菜种子超干贮藏效果进行了研究。结果表明,超干贮藏可以提高种子的抗老化劣变能力。菠菜种子含水量为3.3%~5.4%时,表现出较强的抗老化和劣变能力及较好的耐藏性。超干和老化处理后菠菜种子的SOD、POD、CAT和脱氢酶活性显著高于原始含水量种子,而丙二醛含量显著低于原始含水量种子。不同含水量菠菜种子的SDS-PAGE蛋白质谱带无显著差异。

[关键词] 菠菜种子;超干贮藏;SOD;POD;CAT;脱氢酶;丙二醛;SDS-PAGE

[中图分类号] S636.102.4;Q946

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)08-0096-03

低温保存可以延长大多数常规种子的寿命^[1],但长期维持低温耗能大,运转费用高。近10年来科学研究者开始寻求简易、实用的种子保存新方法,以适应发展中国家或地区的需要,其中种子的超干技术研究最为突出。所谓超干贮藏就是将种子含水量降到通常的安全含水量(5%)以下,在常温下进行贮藏。研究表明^[2,3],降低种子含水量到超干程度,有益于常规种子的保存。迄今为止,对花生、石刁柏、甜菜、油菜、甘蓝、大白菜、红花、黄瓜、西葫芦、大豆、萝卜、辣椒、芝麻、水稻、高粱、洋葱、月见草、杜仲、黑杨、榆树等植物种子的超干贮藏研究结果表明^[4],有些植物种子适宜超干,超干保存的效果较好,但有些植物种子不适宜超干,如我国某些大豆品种和杂交水稻种子,超干保存效果不佳。菠菜种子(果实)不耐贮藏,但对其超干贮藏研究还未见报道。为此,本研究从发芽率、保护酶系活性、脱氢酶活性、丙二醛含量、种子蛋白等方面对菠菜种子超干贮藏的效果进行了研究,以探讨种子超干后抗老化作用的机理,为菠菜种子的贮藏提供理论和实践依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

选用大叶菠菜种子,含水量11.4%,由杨凌农城种业提供。

1.2 方 法

1.2.1 种子的超干及保存 种子的超干采用硅胶

室温干燥法。将种子置于纱布袋中,埋入干燥器内充分干燥的硅胶中,于室温下分别干燥脱水处理15~60 d,测定其含水量,然后密封于双层铝铂袋中,同时将原始含水量的种子也密封于双层铝铂袋中,均室温保存1年。

1.2.2 种子含水量的测定 根据《农作物种子检验规程》(1995)^[5]测定。测得超干处理菠菜种子的含水量分别为5.4%,3.3%,2.0%,1.4%。

1.2.3 种子人工老化 把密封于双层铝铂袋中,室温保存1年的菠菜种子(包括原始含水量种子)放入干燥器中,置于50℃培养箱中老化20 d,老化过程中种子含水量由于密封而得以保持。

1.2.4 超干种子回水处理 经人工老化处理的菠菜种子置于盛有饱和CaCl₂水溶液的干燥器中(相对湿度38%),室温回水处理1 d,然后转移至盛有饱和NH₄Cl水溶液的干燥器中(相对湿度79%),室温回水处理1 d后取出,于室温放置。

1.2.5 种子发芽率和活力指数的测定 种子发芽率测定参照农作物种子检验规程中的方法^[5],第14天统计活力指数(活力指数=发芽率×第14天正常幼苗鲜重/g)。

1.2.6 保护酶系活性测定 对萌发2 d的菠菜种子进行保护酶系活性测定。SOD活性测定用NBT光还原法^[6],过氧化物酶(POD)活性测定用愈创木酚法^[6],过氧化氢酶(CAT)活性测定用比色法^[6]。

* [收稿日期] 2004-11-03

[基金项目] 国家“十五”科技攻关重大专项(2004BA516A09);西北农林科技大学2004年科研专项(042M083)

[作者简介] 李玉红(1973-),女,河南淅川人,讲师,在职博士,主要从事种子学和蔬菜病理学研究。E-mail: liyuhong73@126.com; lyh-1630@yahoo.com.cn

1.2.7 脱氢酶活性测定 采用 TTC 定量法^[4]。

1.2.8 丙二醛含量测定 参照林坚等^[7]的方法。

1.2.9 SDS-PAGE 电泳 对萌动 2 d 的菠菜种子进行 SDS-PAGE 电泳, 参照刘军等^[8]的方法提取蛋白质, 上样量为 20 μ L, 参照 Laemmli^[9]的方法进行 SDS-PAGE 电泳, 分离胶浓度为 8%~18% 的梯度胶, 浓缩胶为 4%, 恒流 25 mA。

2 结果与分析

2.1 超干和老化对菠菜种子发芽率及活力指数的影响

表 1 结果表明, 菠菜种子在原始含水量时, 发芽

表 1 老化处理后不同含水量菠菜种子发芽率、酶活性及 MDA 含量的变化

Table 1 Changes of Germination rate, enzyme activity and MDA content of spinach seeds

种子含水量/% Moisture content	发芽率/% Germination rate	活力指数 Germination index	SOD/ (U · g ⁻¹)	POD/ (U · g ⁻¹)	CAT/ (U · g ⁻¹)	脱氢酶(OD ₄₉₀) Dehydrogenase	MDA/ (μ mol · L ⁻¹)
11.4	2±2 B	0.02±0.02 C	101.5±11.4 C	7.0±2.8 B	50.2±10.3 C	0.207±0.036 C	1.09±0.13 A
5.4	74±7 A	1.5±0.2 A	211.2±15.7 A	30.4±6.3 A	160.8±5.8 A	0.487±0.039 A	0.53±0.06 C
3.3	73±4 A	1.7±0.1 A	183.6±12.4 A	32.5±3.1 A	154.4±8.8 A	0.422±0.048 A	0.51±0.08 C
2.0	77±5 A	1.2±0.1 A B	160.7±7.9 B	24.5±4.9 A B	135±10.4 A B	0.325±0.045 B	0.72±0.07 B
1.4	72±4 A	1.0±0.2 B	137.3±4.5 B C	18.8±6.2 B	116.0±12.6 B	0.345±0.021 B	0.80±0.05 B

注: A, B, C. 1% 水平显著。Note: A, B, C. significant at 1% level

2.3 超干和老化对菠菜种子脱氢酶活性的影响

脱氢酶活性与种子生活力的关系十分密切, 脱氢酶能准确快速地反应种子胚细胞的还原能力, 脱氢酶活性愈强, 种子活力愈高^[10]。表 1 结果表明, 在原始含水量时脱氢酶的活性最低, 含水量为 3.3%~5.4% 时脱氢酶活性最高, 但含水量过低脱氢酶活性极显著下降, 含水量 2.0% 的菠菜种子脱氢酶活性极显著低于含水量 3.3% 的种子, 说明种子含水量过低会对种子造成一定的伤害。

2.4 超干和老化对菠菜种子 MDA 含量的影响

种子老化过程中, 膜完整性受到破坏, 主要原因可能是膜脂的过氧化。丙二醛是脂质过氧化的产物, 随着劣变发生逐渐积累, 因此 MDA 含量可预测种子的劣变程度^[4]。表 1 结果表明, 含水量为 11.4% 的菠菜种子 MDA 含量最高, 其次是含水量为 1.4% 和 2.0% 的种子, 而含水量为 3.3%~5.4% 的菠菜种子 MDA 含量最低。说明种子含水量过低也会对种子造成一定伤害。MDA 含量增加, 质膜透性增大, 反映了种子老化过程中受伤害的程度。

2.5 老化种子萌发时蛋白质图谱的变化

种子蛋白是种子的重要化学成分, 萌发时种子蛋白质的代谢十分活跃, 并与种子的萌发成苗关系密切^[11]。对菠菜部分萌动 2 d 后的老化种子进行

率已经降低到了一个很低的水平, 而干燥处理后菠菜种子(含水量 1.4%~5.4%)的发芽率都维持在一个很高的水平, 不同干燥程度的种子间差异不显著, 但从活力指数上看, 含水量 3.3%~5.4% 的种子活力指数最高, 与其他含水量种子有极显著差异。

2.2 超干和老化对菠菜种子保护酶系活性的影响

从表 1 可以看出, 菠菜种子经过老化处理后, 不同含水量种子保护酶系活性差别较大。含水量为 3.3% 和 5.4% 的种子 SOD、POD 和 CAT 酶活性显著高于其他含水量种子, 而含水量为 11.4% 的种子保护酶系活性最低, 含水量为 1.4% 和 2.0% 的种子保护酶系活性处于中等水平。

SDS-PAGE 图谱分析, 结果见图 1。

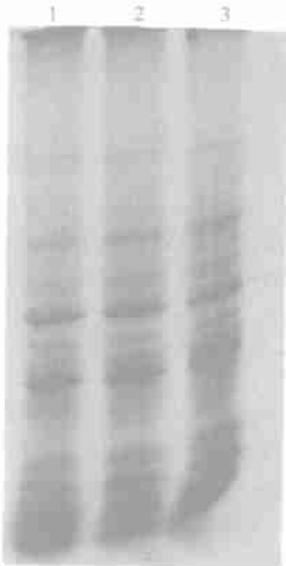


图 1 老化处理后不同含水量的萌动菠菜种子蛋白质 SDS-PAGE 图谱

1~3 含水量分别为 1.4%, 3.3%, 11.4% 的老化菠菜种子

Fig 1 Protein bands of SDS-PAGE in spinach seeds with different moisture content
Lane 1, 2 and 3 represent aging spinach seeds of 1.4%, 3.3% and 11.4% moisture content respectively

图 1 结果表明, 在萌动 2 d 时, 菠菜不同含水量的老化种子蛋白质谱带无显著差异。

3 讨 论

(1) 干燥种子在常温或低温条件下活力下降很慢, 为了缩短试验时间, 一般采用高温老化来研究种子的耐藏性。Ellis 等^[11]研究认为, 温度为-13 ~ +80 时种子的老化规律是一致的。本研究结果表明, 菠菜种子含水量为 3.3%~5.4% 时种子活力最强。因此, 菠菜种子适宜超干贮存, 超干能显著提高种子抗老化能力, 但含水量不宜过低。含水量为 2.0% 时已对种子造成了超干损伤, 保护酶系活性下降, 丙二醛含量升高。因此, 菠菜种子超干贮藏的适宜含水量为 3.3%~5.4%。

(2) 种子萌发过程中, 由于各种代谢活跃, 不可避免地产生许多活性氧, 如 H_2O_2 , $\cdot OH$ 等。这些类型的活性氧造成细胞膜结构破坏。而细胞结构的完整性是种子活力的基础, 细胞膜受损是种子劣变的重要原因^[12]。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)及过氧化氢酶(CAT)是种子清除活性氧、自由基等有害物质的清除剂。超干种子吸胀后仍能保持较高的酶活性, 这有利于萌发过程中清除细胞中因脂质过氧化产生的有毒物质, 维持膜结构的完整性。

本研究结果表明, 丙二醛含量与种子活力关系密切, 适度超干处理可以大大降低MDA 的积累。这

可能是由于缺乏化学反应介质, 使包括脂氧合酶介导在内的脂质过氧化反应受到抑制, 反过来超干种子中脂质过氧化程度的减弱又可以降低非酶类自由基清除剂的消耗, 形成一种良性循环。尽管超干状态下自由基与敏感区域的接触机会增加, SOD, POD 和 CAT 等在种子极干燥状态下不能启动, 但仍然能有效避免脂质自动氧化。另外, 在极干燥条件下, 种子内 SOD 等酶类自由基清除剂并未受到破坏, 一旦种子吸水萌动, 就可以协同抗氧化剂共同清除贮藏期间劣变积累的自由基等毒害物质, 阻止膜脂的自动氧化, 维持膜的完整性, 从而保持种子的高活力状态^[13], 但含水量过低又会对种子造成超干损伤, 种子MDA 的含量又大量增加。

(3) 种子活力与种子蛋白的关系已经有很多报道。刘军等^[8]研究了不同活力玉米种子胚萌发过程中蛋白质的变化, 结果表明, 高活力的种胚与低活力种胚 SDS-PAGE 图谱有所不同。而 Gidrol 等^[14]通过电泳分析老化对大豆等种子多肽的变化时发现, 不同活力的胚与“萌发特异性多肽”并无相关性。本研究结果表明, 不同活力的种子蛋白质图谱无显著差异, 与 Gidrol 等^[14]的报道一致, 说明不同种子萌发时蛋白质的合成和降解的机制可能不同, 也可能与种子的特性及萌发状态有关。

[参考文献]

- [1] Kong X H, Zhang H Y. The effect of ultra-dry methods and storage on vegetable seeds[J]. Seed Sci Res, 1998, 8: 41- 45
- [2] Zheng G H, Jing X M, Tao K L. Ultra-dry seed storage cuts cost of gene bank[J]. Nature, 1998, 393: 223- 224
- [3] 胡家恕, 朱 诚, 曾广文. 超干红花种子抗老化作用及其机理[J]. 植物生理学报, 1999, 25(2): 171- 177.
- [4] 李玉红, 对三汗, 陈 鹏, 等. 辣椒种子的超干研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(4): 663- 666
- [5] 国家技术监督局. 农作物种子检验规程[M]. 北京: 中国标准出版社, 1995: 23- 25
- [6] 高俊凤. 植物生理实验技术[M]. 西安: 世界图书出版社, 2000
- [7] 林 坚, 郑光华, 程红焱. 超干贮藏杜仲种子的研究[J]. 植物学通报, 1996, 13(增刊): 58- 62
- [8] 刘 军, 黄上志, 傅家瑞. 不同活力玉米种子胚萌发过程中蛋白质的变化[J]. 热带亚热带植物学报, 1999, 7(1): 65- 69
- [9] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680- 684
- [10] 乔燕祥, 高平平, 马俊华. 两个玉米自交系在种子老化过程中的生理特性和种子活力变化的研究[J]. 作物学报, 2003, 29(1): 123- 127
- [11] Ellis R H, Roberts E H. Improved equations for the prediction of seeds longevity[J]. Ann Bot, 1980, 45: 13- 30
- [12] 王海华, 蒋明义, 康 健, 等. 低浓度镍处理下玉米种子的萌发与活性氧代谢的关系[J]. 作物学报, 2003, 29(4): 601- 605
- [13] 任晓米, 朱 诚, 曾广文. 超干处理种子的某些生理生化特性[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(5): 265- 268
- [14] Gidrol X, Noubhani A, Mocquot B, et al. Effect of accelerated aging on protein synthesis in two legume seeds[J]. Plant Physiology Biochem, 1994, 32: 65- 73

(下转第 102 页)

A preliminary report on identifying Chinese cabbage's low calcium resistance by inserting detached leaves

JI Xue-hua, ZHANG Lu-gang, ZHANG Shao-li

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this paper, detached leaves from Chinese cabbage were inserted into detecting solution to study the resistance and character of symptom of leaves of Chinese-cabbage under low calcium. The results indicated that the distribution of spots and rots are all "T" shape, and there is no relation between spots and rots. To identify material's resistance to low calcium should be based on these two symptoms. The starting of tip-burn mainly distributes on leaf's marginal and stem. Spots and rots are tip-burn's main symptoms, only 50% materials show water strain. There is deep relation between symptom and variety and genotype.

Key words: detached insertion; tip-burn; low calcium; Chinese cabbage

(上接第 98 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)08-0096-EA

Studies on spinach seeds' physiological characteristics of aging-resistance after ultra-dry storage

LI Yu-hong^a, CHEN Peng^b, WANG Qi^a, GUAN Zhi-hua^a, CHENG Zhi-hui^a

(a College of Horticulture, b College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Spinach seeds were used to investigate the ultra-dry effect of aging-resistance. The results showed that ultra-dry seeds became more tolerant to aging conditions. When spinach seeds were dried to about 3.3% - 5.4% of moisture content, they became more tolerant to aging and were easier to store. Under the same aging condition, the activity of SOD, POD, CAT and dehydrogenase of ultra-dry seeds were higher while MDA were lower than seeds with original moisture content. The protein of SDS-PAGE bands were almost the same in spinach seeds of different moisture content.

Key words: spinach seeds; ultra-dry storage; SOD; POD; CAT; dehydrogenase; MDA; SDS-PAGE