

大豆种子老化过程中生理特性变化的研究

乔燕祥, 周建萍, 田齐建, 穆志新
(山西省农业科学院农作物品种资源研究所, 太原 030031)

摘要: 以两个大豆种子为试材, 采用 $58^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 热水老化法, 进行了大豆种子不同老化水平生活力及生理特性的变化研究。结果表明: 大豆种子衰老过程中, 种子浸出液电导率值、丙二醛 (MDA)、可溶性糖含量逐渐上升, 种子活力与其呈负相关关系, 与过氧化物酶 (POD) 活性呈正相关关系; 随着种子老化程度加重, POD 同工酶酶带颜色变浅并发生丢失, 酶促防御系统解体。说明大豆种质资源更新标准不宜过低, 中期库大豆资源更新发芽率应确定为 70%~74% 之间, 70% 的发芽率应作为大豆种质资源更新的下限值。

关键词: 大豆资源; 老化; 生理特性; 变化

Changing of Physiological Characteristics of Soybean Seeds in Aging Course

QIAO Yan-xiang ZHOU Jian-ping TIAN Qi-jian MU Zhi-xin
(Institute of Crop Germplasm Resources Shanxi Academy of Agricultural Sciences Taiyuan 030031)

Abstract Soybean seeds of two varieties were used to investigate the physiological characteristics and germination activity changes by $58^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hot water method. The results showed that with the increase of aging in soybean seeds, electrical conductivity, MDA content and the soluble sugar content decreased. The correlations between seed physiological indexes and seed vigor were negative, but for POD, they were positive. As the aging of seeds, bands of POD isozyme disappeared, and the defend system of enzymes disintegrated. The results showed that the regeneration standard of soybean seeds in the Genebank should be confirmed at 70%.

Key words Soybean; Aging; Physiological characteristic; Changing

我国大豆种质资源极其丰富, 居世界各国之首。大豆作为高油分、高蛋白种子耐贮性差, 与其他作物相比, 较易发生劣变, 是大豆生产和大豆种质资源贮存过程中的突出问题。山西省农业科学院作物种质资源中期库已贮存大豆资源近 5000 份, 对于大豆种质资源贮存更新标准, 国内外尚无明确规定, 对于大豆种子老化劣变的生理变化机理也尚不明确。特别是大豆贮存过程中体内生理生化指标、遗传稳定性等方面的变化研究报道甚少, 对于种质资源的安全妥善保存、适时更新, 是亟待进行深入研究的问题。否则有可能造成大豆资源的遗传漂移, 或导致更新后代遗传稳定性改变, 严重者导致珍稀大豆遗传资源的丧失^[1-2]。

因此, 开展对大豆资源贮存过程中生理特性的变化研究, 了解大豆种子贮存过程中的衰老规律, 探讨油料、高蛋白种子易劣变、寿命短、不耐贮存的机理, 可为大豆种质资源的安全保存和制定适宜的更新标准提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料由山西省农业科学院作物遗传研究所提供。试材为两个大豆品种: 晋豆 3 号 (黑色种皮) 和晋豆 20 号 (黄色种皮)。晋豆 3 号水分含量为 8.2%, 种子原始发芽率为 98.0%; 晋豆 20 号水分含量为 7.8%, 种子原始发芽率为 98.5%。

收稿日期: 2010-05-17 修回日期: 2010-07-05

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAD13B10); 山西省科技攻关项目 (20100311014)

作者简介: 乔燕祥, 研究员, 主要从事种质资源贮存、作物生理遗传研究。E-mail: qyanxiang@yahoo.com.cn

1 2 方法

1 2 1 高温老化处理 在恒温水浴 58℃ ±1℃的条件下进行大豆种子老化处理。每个品种设 8 个处理, 1 个对照。处理时间间隔为 3m in 老化处理至 24m in 获得不同梯度的老化材料。处理后的种子自然晾干 (约 3~ 4d), 待种子含水量恢复状态后再进行发芽试验。

1 2 2 电导率的测定 取老化大豆种子 1g 用重蒸水洗 3 次, 用滤纸吸干表面水分后放入洁净的 15m l 具塞试管中加入 10m l 蒸馏水, 加塞后静置于 25℃ 恒温培养箱中。在室温条件下用上海产 DDS-11A 型电导仪, 测定各管 2 4 6 8 10 12 20 22 24h 时外渗液的电导率, 测完后于水浴中煮沸 10m in 待冷却至室温后, 测定浸液的绝对电导率, 并计算相对电导率。

相对电导率 (%) = 煮沸前浸出液电导率 / 绝对电导率 × 100%

1 2 3 可溶性糖含量测定 本试验采用蒽酮比色法测定种子浸液中可溶性糖的含量^[3]。准确称取 2 0g 种子装入试管, 每管各加 10m l 蒸馏水, 于保温箱中保持恒温状态, 24h 后取出。将浸液稀释 5 倍 (0. 2m l 浸液: 0. 8m l 蒸馏水), 吸取 1m l 加入 5m l 蒽酮试剂混合, 沸水浴煮 10m in 取出冷却后, 在 625nm 处测 OD 值。

1 2 4 丙二醛 (MDA) 含量测定 参照赵世杰等^[4]的方法进行测定。据 Lambert-Beer 定律可得如下公式, 计算样品提取液中 MDA 的含量 (C)。

$$C = 6.45 OD_{532} - 0.56 OD_{450}$$

1 2 5 过氧化物酶 (POD) 活性测定 参照波钦诺克^[5]和朱广廉等^[6]介绍的愈创木酚法进行过氧化物

酶活性的测定。用 7550 紫外—可见分光光度计测量 470nm 波长下的 OD 值。在有过氧化氢条件下, 过氧化物酶能使愈创木酚发生氧化反应, 生成茶褐色物质, 测定生成物的含量。上清酶液在分光光度计 470nm 波长下测量 OD 值的变化, 酶活性以每 g 鲜重每 m in 光密度值表示。

1 2 6 过氧化物酶 (POD) 同工酶电泳分析 本试验采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行过氧化物同工酶分析。分离胶浓度为 7. 0%, 浓缩胶浓度为 2. 5%, 用醋酸联苯胺显色法染色。

2 结果与分析

2 1 大豆种子老化过程中电导率分析

由图 1 可以看出, 两个大豆品种经高温老化处理后, 种子浸液的电导率均大于相同浸泡时间内 CK 的电导率, 随着老化时间延长, 生活力衰退, 浸出液中含物质外渗量明显增加, 测得电导率值增大。这是由于种子发生老化劣变, 致使细胞膜完整性受到破坏, 透性增大, 并且在吸胀时的修复能力和速度降低所致。而且随着老化处理时间的延长, 种子劣变程度加剧, 所有样品的电导率都呈递增规律上升, 但不同活力种子之间差异较大。晋豆 20 号吸胀过程中电导率增长缓慢, CK 浸泡 24h 电导率为 17. 8%, 老化 24m in 的材料浸泡 24h 电导率上升为 60. 2%, 是对照的 3. 393 倍。而晋豆 3 号 CK 浸泡 24h 电导率为 11. 1%, 老化 24m in 的材料浸泡 24h 电导率上升为 37. 4%, 是对照的 3. 387 倍。由此可见, 两个大豆品种在老化过程中电导率的递增规律基本相同, 但不同活力的种子其老化损伤程度不同, 浸出液电导率值增加幅度差异较大。浸出液电导率和种子活力成典型的负相关关系。相关分析结果见表 1。

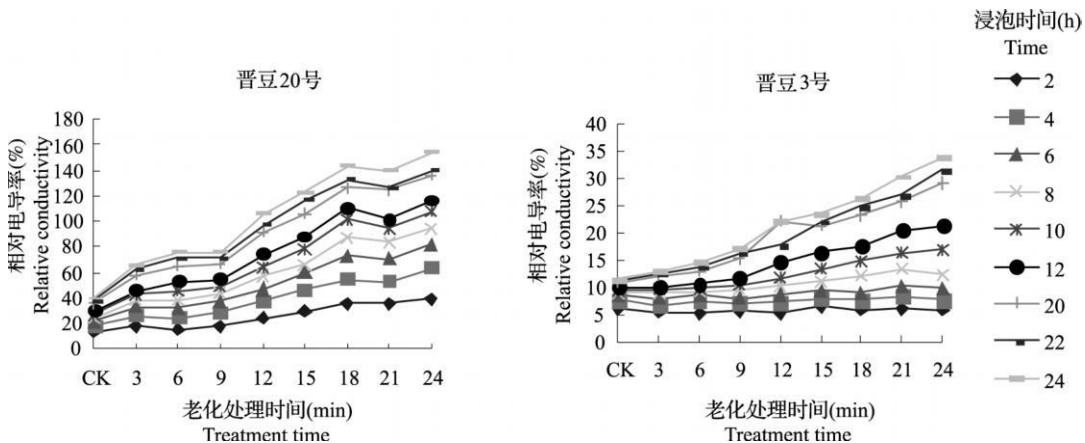


图 1 老化种子吸胀过程中不同老化时间的电导率

Fig 1 The electrical conductivity of aging soybean seeds during inh bition

表 1 大豆种子老化过程中电导率与种子生活力、活力的相关关系

Table Correlations between electrical conductivity and gemination percentage vigor of ageing soybean seeds

发芽指标	品种名称	老化处理时间 (min) Treatment time				
		4	8	12	20	24
发芽势	晋豆 20号	- 0.9565**	- 0.9603**	- 0.9773**	- 0.9714**	- 0.9705**
Gemination potential	晋豆 3号	- 0.5336	- 0.9333**	- 0.9859**	- 0.9829**	- 0.9894**
发芽率	晋豆 20号	- 0.9639**	- 0.9720**	- 0.9708**	- 0.9631**	- 0.9541**
Gemination percentage	晋豆 3号	- 0.5725	- 0.9354**	- 0.9854**	- 0.9675**	- 0.9786**
发芽指数	晋豆 20号	- 0.9582**	- 0.9643**	- 0.9731**	- 0.9714**	- 0.9674**
Gemination index	晋豆 3号	- 0.5730	- 0.9324**	- 0.9816**	- 0.9593**	- 0.9736**
活力指数	晋豆 20号	- 0.9635**	- 0.9685**	- 0.9784**	- 0.9762**	- 0.9729**
Activity index	晋豆 3号	- 0.6153*	- 0.9519**	- 0.9893**	- 0.9629**	- 0.9756**

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

随着种子劣变,种子的膜结构受损甚至解体,细胞内含物质大量外渗,电解质含量增加,导致电导率上升。随着种子老化时间的延长,种子劣变越严重,膜受损越严重,电导率 and 外渗量也就越大。

由此可见,种子老化致使种子活力降低的结果,是由种子细胞本身膜受损,透性发生改变而产生一系列的生理生化变化,使其生理活性降低所致。

2.2 浸出液中可溶性糖含量的变化分析

浸出液可溶性糖的变化也是反映种子外渗电解质含量的一个指标,实际上也反映了膜的受损程度。而且种子为了适应逆境条件,也会主动积累一些可溶性糖。原则上,应在标准曲线上读出与 OD 值相应的糖浓度值,但由于从 CK 到 24min 的 OD 值跨度较大,而标准曲线 OD 值最大为 1.0 因此只能间接分析出糖含量的变化。由标准曲线可知,糖含量与 OD 值成正比。由图 2 可见,随老化处理时间的延长,测出的 OD 值逐渐增大,因此,可溶性糖含量也相应增大。另外,晋豆 20 号的 18~ 24min 3 个老化时间段的 OD 值已很接近,可以推断这一时间段老化种子细胞外渗电解质糖含量已达到一定的峰值,也反映出晋豆 20 号不耐贮存的特点。而晋豆 3 号在这个时间段还未出现峰值。

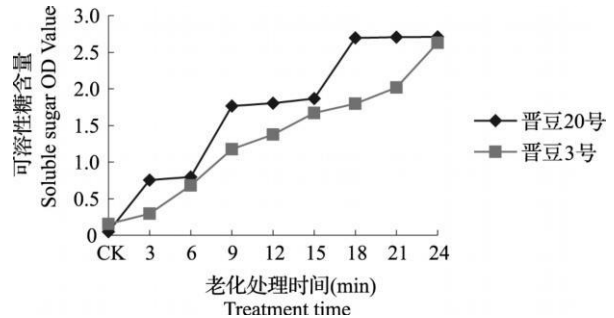


图 2 老化大豆种子浸出液可溶性糖含量

Fig 2 The soluble sugar content in the soaking solution of the aging soybean seeds

2.3 丙二醛含量的变化研究

大豆是高蛋白、高油分种子,细胞膜中脂肪酸含量高,而脂肪酸很容易发生过氧化作用造成膜的损害,过氧化作用产生活跃的自由基,可以导致一系列的细胞损伤和毒害作用发生,使细胞正常生理活动受到抑制^[7-8]。MDA 可与蛋白质结合使酶钝化,与核酸结合可引起染色体变异。种子劣变越严重,其细胞膜脂过氧化程度越强。当 MDA 含量增大时说明种子细胞膜受到的损害也在增大,种子的老化程度越严重。因此可将其作为细胞膜过氧化程度的指标,亦可作为测定老化种子活力间接指标。

由图 3 可以看出,随着老化程度的加深,MDA 值逐渐增大,从处理 3min 开始,晋豆 20 号的 MDA 含量均高于晋豆 3 号。随着老化时间的延长,晋豆 20 号 MDA 的增长比晋豆 3 号更为显著,且晋豆 20 号的 MDA 含量在老化处理 15~ 24min 时一路攀升。晋豆 3 号 MDA 含量增速偏缓,说明了其种子的活力强。晋豆 20 号处理 24min 时 MDA 的含量达到最高值 4.738 $\mu\text{mol/g}$ 耐贮性差,与前面的实验结果相吻合。

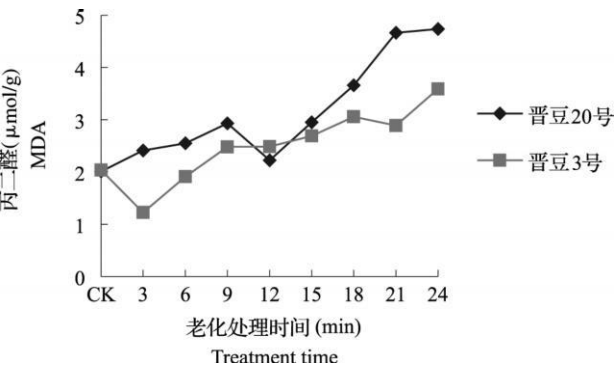


图 3 老化大豆种子丙二醛含量

Fig 3 TheMDA content of the aging soybean seeds

2 4 过氧化物酶同工酶活性分析

过氧化物酶能催化 H_2O_2 与多种氢供体发生氧化还原反应,其作用一方面与植物正常的形态发生和形态构建有关,另一方面与植物的抗逆性有关,是植物细胞中保护酶系的重要保护酶之一。过氧化物酶的含量 (OD 值) 愈高,其活性愈高,种子活力愈强;OD 值愈低结果反之。种子活力与过氧化物酶的含量成正比。

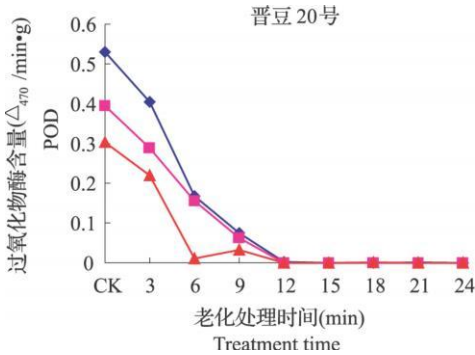


图 4 老化大豆种子过氧化物酶活性的变化

Fig 4 The changes of peroxidase activity of the aging soybean seeds

2 5 过氧化物酶同工酶的电泳分析

由图 5 可见,晋豆 20 号过氧化物酶同工酶根据酶带迁移率的不同,仅有 R_f 值为 0.06 0.12 0.26 和 0.55 4 条谱带。 R_f 值为 0.26 的次级酶带,在 CK 和老化 3min 时微弱显现,老化 6min 时完全消失。 R_f 值为 0.06 0.12 两条谱带在老化至 6min 时明显的变浅;老化处理 15min 时,完全消失。酶带变浅,表明酶活性下降,酶的合成能力减弱;酶带开始丢失则意味着其蛋白质发生了降解,种子本身发生了质的变化。可以认为,晋豆 20 号在老化处理 6min 时种子本身已发生了较大的生理改变。该品种种子作为种质繁殖更新时,标准应确定在老化 6min 之前,即 3min 的老化水平上,相对应的发芽率水平为 74%。

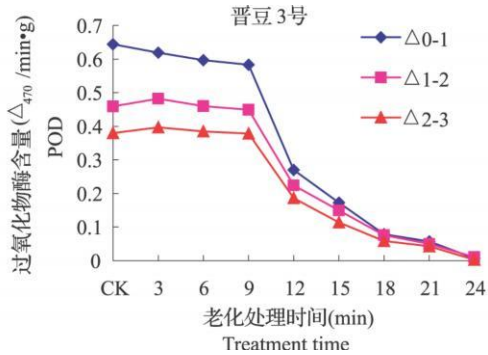


图 5 晋豆 20 号过氧化物酶同工酶电泳图谱

Fig 5 Peroxidase isozymogram of Jindou 20

图 6 可见,晋豆 3 号过氧化物酶同工酶谱带共有 6 条。分别为 R_f 值 0.06 0.14 0.20 0.24 0.49 和 0.58。其中, R_f 值为 0.20 0.24 两条酶带在 6min 变浅,12min 完全消失。晋豆 3 号品种繁殖更新时,标准应确定在老化 12min 之前,即 9min 的老化水平上,相对应的发芽率水平为 70%。

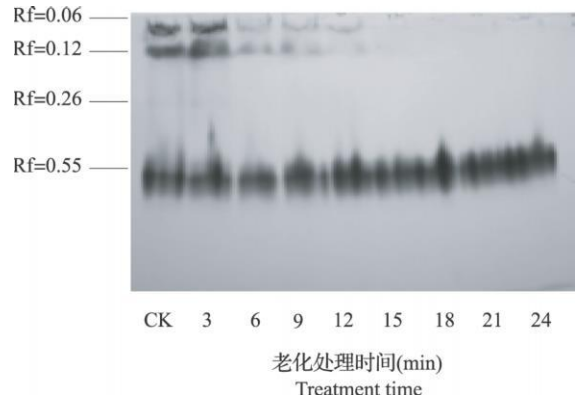
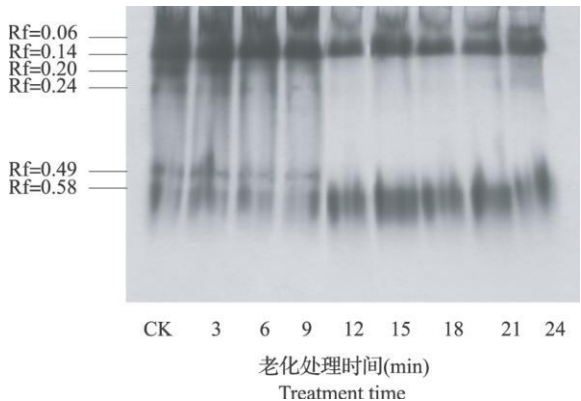


图 6 晋豆 3 号过氧化物酶同工酶电泳图谱

Fig 6 Peroxidase isozymogram of Jindou 3

比较晋豆 20 号和晋豆 3 号种子同工酶谱带发现,晋豆 20 号种子不但酶带条数少 (4 条),而且酶带普遍浅,酶带消失出现早 (老化 6min);晋豆 3 号酶带条数多 (6 条),而且酶带着色深,酶带消失出现相对较迟 (老化 12min)。又一次说明了晋豆 3 号活力强,较晋豆 20 号耐贮。



3 讨论

不同老化水平大豆种子生活力及活力丧失特性研究表明,相同处理条件下,晋豆 3号较晋豆 20号抗老化能力强。说明同一种作物的不同品种抗老化能力不同,耐贮存水平各异。另外,大豆种子衰老过程中,发芽势、发芽指数、活力指数都先于发芽率出现明显的下降,与玉米老化试验结果相似^[9]这个结果表明种质监测时有必要增加活力及生理指标。从种子活力水平和生理生化变化研究结果显示黑种皮大豆种子比黄种皮种子耐贮,种子的耐贮性是否真正与种皮颜色以及品种本身有关,有待进一步深入研究。

通过以上研究认为,在大豆种子老化劣变过程中,过氧化物酶活性不断降低,合成能力逐渐减弱,甚至完全丧失。检测大豆种子过氧化物同工酶的变化,应该作为大豆种质资源安全保存适时更新的生理指标之一。大豆作为油料、高蛋白作物种质资源安全保存适时更新的指标不可过低,应确定在过氧化物酶带发生消失之前,即发芽率水平应考虑确定在 70%~74% 之间,70% 的发芽率应作为大豆种质资源更新的下限值。另外,大豆种子老化的深入

研究,应通过 SSR 分子标记的方法进行老化种子遗传完整性变化的检测^[10-11]。

参考文献

- [1] 卢新雄,曹永生.作物种质资源保存现状与展望[J].中国农业科技导报,2001,3(3):43-47
- [2] Zheng G H, Jing X M, Tao K L. Ultrady seed storage cuts cost of gene bank[J]. Nature, 1998, 393: 223-224
- [3] 汤章诚.现代植物生理学试验指南[M].北京:科学出版社,1999
- [4] 赵世杰,许长成,邹琦,等.植物组织中丙二醛的测定方法的改进[J].植物生理学通讯,1994,30(3):207-210
- [5] 波钦诺克 X H.植物生物化学分析方法[M].北京:科学出版社,1981:197-201
- [6] 朱广廉,钟梅文,张爱琴.植物生理学实验[M].北京:北京大学出版社,1990
- [7] Zhang M, Nakanan Y, Tsuda S et al. Enzymatic conversion of volatile metabolites in dry seeds during storage[J]. Plant Cell Physiol 1995 36 (1): 157-164
- [8] Zhang M, Maeda Y, Fufihata Y, et al A mechanism of seed deterioration in relation to the volatile compounds evolved by dry seeds themselves[J]. Seeds Science Research 1994, 4: 49-65
- [9] 乔燕祥,高平平,马俊华,等.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
- [10] 张晗,卢新雄,张志娥,等.种子老化对玉米种质资源遗传完整性变化的影响[J].植物遗传资源学报,2005,6(3):271-275
- [11] 王栋,卢新雄,张志娥,等. SSR 标记分析种子老化及繁殖世代对大豆种质遗传完整性的影响[J].植物遗传资源学报,2010,11(2):192-199

欢迎 订阅

《草地学报》是中国科协主管、中国草学会主

办、中国农业大学草地研究所承办的学术刊物,中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国农业核心期刊,并被多家数据库收录。2008 年影响因子为 0.957(据中信所 2009 版《中国科技期刊引证报告》核心版)。

双月刊,邮发代号:80-135,国外代号:Q1949,每期定价 20 元,全年 120 元。

地址:(100193)北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农大 神内楼 318 室

电话:010-62733894

E-mail cdxh@cau.edu.cn

《花生学报》是由山东省花生研究所主办的专业学术刊物,全国农业核心期刊。季刊,48 页,每期定价 5.00 元,全年定价 20.00 元。

《花生学报》由本刊编辑部自办征订和发行,另外,本刊参加了全国非邮发报刊联合征订,请读者向天津市大寺泉集北里别墅 17 号(邮编 300381)全国非邮发报刊联合征订服务部直接汇款订阅,不必先索取定单,本刊负责将刊物寄给订户。

地址:(266100)青岛市李沧区万年泉路 126 号山东省花生研究所《花生学报》编辑部

电话:0532-87632131

E-mail hshl@163169.net

《园艺学报》是中国园艺学会和中国农业科学院蔬菜花卉

研究所主办的学术期刊,中文核心期刊,被中国科学引文数据库等多家重要数据库收录。2008 年《园艺学报》总被引频次 4591 次,影响因子 1.075

月刊,2011 年每期定价 40.00 元,全年 480.00 元。邮发代号 82-471,国外发行代号 M448

地址:(100081)北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部

电话:010-82109523

E-mail yuanyixuebao@126.com

《中国草地学报》是由中国农业科学院草原研究所和中国草学会共同主办的草学学术期刊,现为中国草学界影响最大的专业期刊之一,是全国中文核心期刊、中国科技核心期刊和中国农业核心期刊,《中国科学引文数据库》来源期刊,第四届全国优秀农业期刊。2008 年影响因子达 1.010 以上。

双月刊,大 16 开 A4 版本,120 页,国内外公开发行,每期定价 15.00 元,全年共 90.00 元。邮发代号 16-32,全国各地邮局(所)均可订阅,错过订期可直接向本刊编辑部补订。

地址:(010010)呼和浩特市乌兰察布东街 120 号

电话:0471-4928361(办公室);0471-4926880(总编室)

电子信箱:zgcdxb@126.com