

## 甜高粱种子人工老化过程中活性氧清除酶活性的变化

刘宣雨, 刘树君, 程红焱, 宋松泉\*

中国科学院植物研究所, 北京 100093

**摘要:** 研究甜高粱品种‘意达利’种子人工老化过程中种子活力与活性氧清除酶活性之间关系的结果表明: 随着老化处理(100% RH, 43 ℃)的时间进程, 种子的萌发率、活力指数以及由存活种子形成的幼苗鲜重下降, 相对渗漏率增加, 丙二醛含量下降。超氧化物歧化酶、抗坏血酸过氧化物酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶和脱氢抗坏血酸还原酶的活性在人工老化初期增加, 而后下降。据此认为活性氧清除酶活性下降可能是甜高粱种子活力丧失的原因之一。

**关键词:** 甜高粱种子; 人工老化; 种子活力; 活性氧清除酶; 能源植物

## Changes in Activities of Reactive Oxygen Species Scavenging Enzymes of Sweet Sorghum Seeds during Artificial Aging

LIU Xuan-Yu, LIU Shu-Jun, CHENG Hong-Yan, SONG Song-Quan\*

Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

**Abstract:** Seeds of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* Moench ‘Yidali’) which is one of energy plants were used as materials, to investigate the relationship between the changes of seed vigor and the activities of reactive oxygen species (ROS) scavenging enzymes during artificial aging in this paper. The results showed that with extension of the time by aging treatment (100% relative humidity, 43 ℃), all of the germination percentages, the vigor index of seeds and the seedling fresh weight produced by the survived seeds decreased, the relative electrolyte leakage was increased, and the contents of malondialdehyde were decreased. Activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase, glutathione reductase and dehydroascorbate reductase were increased during the initial phase of artificial aging, and were then obviously decreased. It suggests that decrease of activities of ROS scavenging enzymes during artificial aging may result in vigor loss of sweet sorghum seeds.

**Key words:** sweet sorghum seed; artificial aging; seed vigor; ROS scavenging enzymes; energy plant

甜高粱是一种 C<sub>4</sub> 植物, 不仅具有高生物量、茎秆含糖量高和乙醇转化效率高的特性, 还抗旱、耐贫瘠、耐盐碱(张福耀等 2006); 可在边际性土地上正常生长发育, 是目前公认的一种具有产业化应用前景的能源作物。甜高粱以种子进行繁殖, 种子活力的高低直接影响到播种质量和田间出苗率, 进而影响植株的生长发育及其抗逆性。有研究表明甜高粱种子在室内(25 ℃, 70% RH)条件下, 生活力下降 50% 所经历的时间大约是 6 个月。在黄河以北地区, 甜高粱种子在 9 月下旬至 10 月上旬成熟; 而播种的时间为来年的 4 月中、下旬, 种子的贮藏时间约为 6 个月。因此, 探明这一期间甜高粱种子老化的原因并保持高活力是生产中需要解决的问题。此外, 一般认为活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生与清除之间的不平衡, 以及由 ROS 所引起的脂质过氧化作用可能是种子老化的原因之一

(McDonald 1999)。关于种子老化与脂质过氧化作用之间的关系已有较多的研究(Priestley 1986; Smith 和 Berjak 1995; Walters 1998), 但作为能源植物甜高粱种子的研究尚少报道。本文用人工老化模拟自然老化, 探讨甜高粱种子的老化与 ROS 清除酶活性之间的关系, 寻找评价种子活力下降的有效参数, 为延缓种子活力下降提供参考。

### 材料与方法

材料为甜高粱品种‘意达利’(*Sorghum bicolor* Moench ‘Yidali’)种子, 于 2007 年 11 月采自吉林省

收稿 2008-05-06 修定 2008-05-30  
资助 中国科学院植物园和系统生物学项目(KSCX2-YW-Z-058)。  
\* 通讯作者(E-mail: sqsong@ibcas.ac.cn; Tel: 010-62836484)。

松原市郊。种子采收后脱水至含水量为 $(0.144 \pm 0.003) \text{ g (水)·g}^{-1}$  (DW)。种子千粒重为 $(19.4545 \pm 0.206) \text{ g}$ 。

种子人工老化时, 将种子置于 43%、100% RH (relative humidity) 中进行老化处理, 处理不同时间后取样, 测定种子生活力和 ROS 清除酶活性。

测定种子含水量时, 取 10 粒种子置于 103 的烘箱中烘 17 h, 以干重为基础表示种子的含水量  $[\text{g (水)·g}^{-1}$  (DW)]。5 次重复。

种子萌发实验中, 随机选取 100 粒种子, 用有效氯含量为  $250 \text{ mg·L}^{-1}$  的 84 消毒液灭菌 20 min 后, 再用无菌水清洗 3 次, 然后放入垫有 2 层滤纸的培养皿中。将培养皿置于 25℃ 和黑暗下。播种后每 6 h 记录一次萌发数, 并补充蒸发的水分; 以胚根突破种皮 2 mm 作为萌发的标准。萌发 7 d 后统计萌发率。幼苗的鲜重和干重不包括胚乳。活力指数  $VI = S \times \Sigma (Gt/Dt)$ , 其中 S 为幼苗的单株平均干重 (mg), Gt 为不同萌发时间 (h) 的萌发种子数, Dt 为不同的萌发时间 (h)。

相对渗漏率的测定参照宋松泉和傅家瑞 (1997) 文中的方法。丙二醛 (MDA) 含量测定参照 Hodges 等 (1999) 文中的方法。

将老化不同时间的甜高粱种子置于潮湿的滤纸中吸胀 4 h (30℃、暗中), 然后在液氮中研磨成细粉。超氧化物歧化酶 (SOD, EC 1.15.1.1) 活性按照 Beauchamp 和 Fridovich (1971) 文中的方法, 抗坏血酸过氧化物酶 (APX, EC 1.11.1.7) 活性按照 Nakano 和 Asada (1981) 文中的方法, 过氧化氢酶 (CAT, EC 1.11.1.6) 活性按照 Aebi (1983) 文中的方法, 谷胱甘肽还原酶 (GR, EC 1.6.4.2) 活性按照 Halliwell 和 Foyer

(1978) 文中的方法, 脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR, EC 1.8.5.1) 活性按照 Arrigoni 等 (1992) 文中的方法进行测定。蛋白质含量测定按照 Bradford (1976) 文中的方法。数据均为重复 3 次的平均值  $\pm$  SD (标准差)。数据采用 SPSS 13.0 进行分析。

## 结果与讨论

### 1 甜高粱种子活力的变化

随着人工老化处理的进程, 种子含水量逐渐增加 ( $P < 0.001$ ), 种子萌发率 ( $P < 0.001$ ) 和活力指数 ( $P < 0.001$ ) 逐渐下降 (表 1)。种子萌发率下降 50% 的时间约为 7 d; 人工老化处理 16 d 时的种子萌发率为零。此外, 由存活种子产生的幼苗鲜重也显著降低。如人工老化 10 d 的幼苗的鲜重比未老化种子降低 43%。这些结果类似于花生 (宋松泉等 1992)、小麦 (Guy 和 Black 1998) 和甜菜 (Song 等 2001) 种子的人工老化。Priestley (1986) 认为种子人工老化过程中的生理和生化变化可以作为老化的参数。但由于在低含水量下正常性种子自然老化所需的时间较长, 所以, 种子自然老化与人工老化之间的差异还不清楚。

### 2 人工老化对甜高粱种子相对渗漏率和 MDA 含量的影响

从图 1 可见, (1) 种子吸胀初期, 水分进入干种子的细胞, 而细胞中的溶质和小分子量的代谢物则渗漏入周围的介质中 (Bewley 1997)。甜高粱种子的相对渗漏率随着老化时间的延长明显增加 ( $P < 0.001$ , 图 1), 表明膜的结构和功能受到伤害。

(2) 甜高粱种子人工老化过程中 MDA 含量下降 ( $P < 0.001$ , 图 1), 人工老化 8 d 的种子中 MDA

表 1 人工老化过程中甜高粱种子含水量和生活力参数的变化

Table 1 Changes in water contents and viability parameters of sweet sorghum seeds during the artificial aging process

老化时间/d	含水量 /g (水)·g <sup>-1</sup> (DW)	萌发率 /%	活力指数	鲜重 /mg·株 <sup>-1</sup>
0	0.144±0.003 <sup>Aa</sup>	92.67±1.15 <sup>Aa</sup>	138.37±10.78 <sup>Aa</sup>	48.78±0.56 <sup>Aa</sup>
2	0.277±0.009 <sup>Bb</sup>	89.33±2.52 <sup>ABa</sup>	135.45±6.72 <sup>Aa</sup>	50.57±0.95 <sup>Aa</sup>
4	0.379±0.009 <sup>Cc</sup>	84.33±1.53 <sup>Bb</sup>	111.22±16.18 <sup>Bb</sup>	40.99±1.28 <sup>Bb</sup>
6	0.452±0.009 <sup>Dd</sup>	68.33±3.40 <sup>Cc</sup>	81.92±15.3 <sup>Cc</sup>	35.74±0.66 <sup>Cc</sup>
8	0.499±0.011 <sup>Ed</sup>	40±1.41 <sup>Dd</sup>	36.96±8.51 <sup>Dd</sup>	33.42±1.02 <sup>Dd</sup>
10	0.531±0.008 <sup>Ff</sup>	20±2.65 <sup>Ed</sup>	13.93±3.33 <sup>EFef</sup>	27.78±0.69 <sup>EFef</sup>
12	0.550±0.006 <sup>Gg</sup>	11±2 <sup>Ff</sup>	5.48±2.89 <sup>Ff</sup>	27.58±0.56 <sup>Ff</sup>
14	0.560±0.008 <sup>GHg</sup>	5.67±0.58 <sup>Gg</sup>	2.07±0.28 <sup>Ff</sup>	26.96±2.16 <sup>Ff</sup>
16	0.571±0.007 <sup>Hh</sup>	0±0 <sup>Hh</sup>	0±0 <sup>Ff</sup>	0±0 <sup>Gg</sup>

同一列中大写字母不同表示 0.01 显著差异水平, 小写字母不同表示 0.05 显著差异水平; 幼苗的鲜重不包括胚乳。

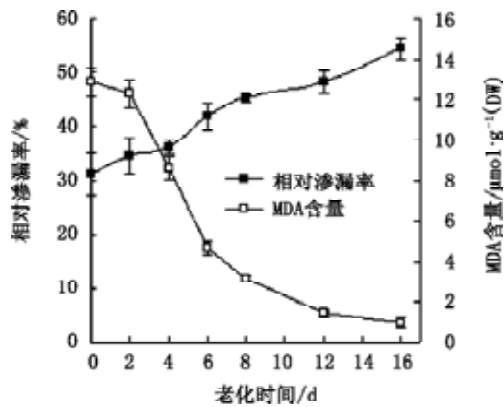


图1 甜高粱种子人工老化过程中相对渗透率和MDA含量的变化

Fig.1 Changes in relative leakage and MDA contents of sweet sorghum seeds during the artificial aging process

含量下降76%。这与Walters (1998)、McDonald (1999)和Song等(2007)的报道不同;但与陈润政等(1996)的水稻种子人工老化过程中种子活力下降与挥发性醛含量呈正相关的结果相似。

### 3 甜高粱种子人工老化过程中ROS清除酶活性的变化

从表2可见, SOD、APX、CAT、GR和DHAR的活性在甜高粱种子老化初期增加,而后迅速下降;但它们的活性高峰位于不同的人工老化时间( $P < 0.001$ )。当人工老化16 d、种子的萌发率为零时, SOD、APX、CAT、GR和DHAR的活性分别比未经人工老化的下降69%、88%、80%、91%和59% (表2)。人工老化初期, ROS清除酶活性的增

表2 甜高粱种子人工老化过程中活性氧清除酶活性的变化

Table 2 Changes in activities of reactive oxygen species scavenging enzymes of sweet sorghum seeds during the artificial aging process

老化时间/d	SOD 活性/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{蛋白})$	APX 活性/ $\text{nmol}$ $(\text{AsA})\cdot\text{mg}^{-1}(\text{蛋白})\cdot\text{min}^{-1}$	CAT 活性/ $\mu\text{mol}$ $(\text{H}_2\text{O}_2)\cdot\text{mg}^{-1}(\text{蛋白})\cdot\text{min}^{-1}$	GR 活性/ $\text{nmol}$ $(\text{NADPH})\cdot\text{mg}^{-1}(\text{蛋白})\cdot\text{min}^{-1}$	DHAR 活性/ $\text{nmol}$ $(\text{AsA})\cdot\text{mg}^{-1}(\text{蛋白})\cdot\text{min}^{-1}$
0	$10.92\pm 0.11^{\text{BCbc}}$	$301.18\pm 31.43^{\text{Aa}}$	$35.56\pm 0.73^{\text{ABbc}}$	$51.34\pm 7.29^{\text{BCbc}}$	$141.59\pm 16.35^{\text{Ab}}$
2	$12.91\pm 0.72^{\text{Aa}}$	$341.18\pm 17.57^{\text{Aa}}$	$39.41\pm 2.48^{\text{Aa}}$	$65.33\pm 10.67^{\text{ABab}}$	$164.10\pm 6.39^{\text{Aab}}$
4	$10.32\pm 0.21^{\text{Cc}}$	$307.24\pm 45.32^{\text{Aa}}$	$32.99\pm 2.28^{\text{Bc}}$	$76.98\pm 10.18^{\text{Aa}}$	$179.28\pm 5.47^{\text{Aa}}$
8	$7.44\pm 0.47^{\text{Dd}}$	$183.24\pm 26.60^{\text{BCb}}$	$22.82\pm 0.71^{\text{Cd}}$	$44.19\pm 8.99^{\text{CDe}}$	$142.67\pm 22.88^{\text{Ab}}$
12	$4.95\pm 0.37^{\text{Ee}}$	$123.14\pm 19.46^{\text{Cc}}$	$13.75\pm 1.16^{\text{De}}$	$28.67\pm 4.10^{\text{Dd}}$	$72.44\pm 16.37^{\text{BCcd}}$
16	$3.41\pm 0.12^{\text{Ff}}$	$35.08\pm 29.77^{\text{Dd}}$	$6.96\pm 1.54^{\text{Ef}}$	$4.51\pm 4.51^{\text{Ee}}$	$58.73\pm 14.16^{\text{Cd}}$

同一列中大写字母不同表示0.01显著差异水平,小写字母不同表示0.05显著差异水平。

加可能是由于100% RH和43℃下高粱种子的呼吸速率增加,从而引起电子泄漏,产生较多的活性氧自由基,导致酶活性增加所致;而后随着人工老化时间的延长,酶活性下降。这些也与Tian和Song (2007)的结果类似。

前述结果的方差分析表明, SOD、APX和CAT活性与萌发率、VI和幼苗鲜重这3项参数之间均呈极显著正相关, GR和DHAR活性则与这3项参数之间呈显著正相关; MDA与萌发率和VI这2项参数之间均呈极显著正相关,而与幼苗鲜重呈显著正相关;相对电导率与这3项参数之间均呈极显著负相关(资料未列出)。据此我们认为, (1) SOD、APX、CAT、GR和DHAR活性以及相对电导率均似可用作甜高粱种子活力参数; (2) ROS清除酶活性的下降可能是甜高粱种子老化的原因之一。

### 参考文献

- 陈润政, 张宏伟, 傅家瑞, 宋松泉(1996). 水稻种子活力与挥发性醛关系的研究. 中山大学学报, 35 (增刊): 54~57
- 宋松泉, 傅家瑞(1997). 黄皮种子脱水敏感性与脂质过氧化作用. 植物生理学报, 23 (2): 163~168
- 宋松泉, 傅家瑞, 夏伟(1992). 花生种子人工老化与膜脂过氧化作用的研究. 中国油料, (3): 31~34
- 张福耀, 赵威军, 平俊爱(2006). 高能作物——甜高粱. 中国农业科技导报, 8: 14~17
- Aebi HE (1983). Catalase. In: Bergmeyer HU (ed). Methods of Enzymatic Analysis. Weinheim: Verlag Chemie, 3: 273~282
- Arrigoni O, De Gara L, Tommasi F, Liso R (1992). Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. Plant Physiol, 99: 235~238
- Beauchamp C, Fridovich I (1971). Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. Anal Biochem, 44: 276~287
- Bewley JD (1997). Seed germination and dormancy. Plant Cell, 9: 1055~1066
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the

- quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248~254
- Guy PA, Black M (1998). Germination-related proteins in wheat revealed by differences in seed vigour. *Seed Sci Res*, 8: 99~111
- Halliwell B, Foyer CH (1978). Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta*, 139: 9~17
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207: 604~611
- McDonald MB (1999). Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci Technol*, 27: 177~237
- Nakano Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22: 867~880
- Priestley DA (1986). *Seed Ageing*. Ithaca NY: Comstock Publishing Associates
- Smith MT, Berjak P (1995). Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerance and desiccation-sensitivity seeds. In: Kigel J, Galili G (eds). *Seed Development and Germination*. New York: Marcel Dekker, Inc, 701~746
- Song SQ, Fredlund KM, Møller IM (2001). Changes in low-molecular weight heat shock protein 22 of mitochondria during accelerated ageing of *Beta vulgaris* L. seeds. *Acta Phytophysiol Sin*, 27: 73~80
- Song SQ, Tian XR, Fu JR (2007). Possible involvement of programmed cell death events during accelerated ageing of soybean (*Glycine max* L.) axes. In: Adkins SW, Ashmore SE, Navie SC (eds). *The Biology of Seeds: Recent Research Advances*. Oxon: CABI Publishing, 71~84
- Tian XR, Song SQ (2007). Cell death and reactive oxygen species during accelerated ageing of soybean (*Glycine max* L.) axes. In: Thangadurai D, Tang W, Song SQ (eds). *Plant Stress and Biotechnology*. Jaipur, India: Oxford Book Company, 40~52
- Walters C (1998). Understanding the mechanisms and kinetics of seed ageing. *Seed Sci Res*, 8: 223~244