

PEG 引发提高大豆种子抗吸 胀冷害的作用机理

——引发对敏感大豆种子氧化磷酸化的效应*

燕义唐 梁 峰 郑光华
邹喻苹 赵 原 汤佩松

(中国科学院植物研究所, 北京)

吸胀冷害系指种子吸胀阶段的冷害现象。轻者减弱种子活力,削弱幼苗生长势,影响植物生长发育;重者降低田间成苗率,造成严重缺苗,给农、林、园艺生产带来经济损失。许多栽培与野生植物种子在播种后存在吸胀冷害问题,一些原产热带、亚热带的植物吸胀冷害为害尤其严重,一些大豆栽培品种也表现很敏感^[1]。已有的研究工作确认,PEG(聚乙二醇)引发能显著提高大豆种子抗吸胀冷害的能力^[2],甚至引发种子能以充分吸胀状态经受长达2个月之久的2—3℃低温而不降低活力^[3]。PEG处理老化种子还能恢复和提高种子活力^[4],利用PEG渗透调控技术于一些蔬菜种子例如菠菜^[5]、洋葱^[6]的效果也得以肯定。但是有关PEG引发作用机理的研究却较多的局限于种子呼吸及细胞透性方面^[6]。本文探索了PEG引发对种子线粒体氧化磷酸化的影响,以从这一方面阐明PEG引发提高种子活力及抗逆力的作用机制,为PEG引发这一新的种子处理技术的进一步应用提供理论依据。

一、材料和方法

1. 供试大豆品种 黑河3号,该品种对低温吸胀敏感。精选大小均匀,饱满无损伤种子为实验材料。

2. PEG 引发及低温处理方法 制备33% (W/V) PEG(MW = 6000)溶液,静置48h倒入棕色瓶置冰箱保存。PEG引发处理在10℃下进行,种子放烧杯内,倒入PEG溶液以淹没种子为度,烧杯用塑料膜覆盖并扎紧,引发时间为72h。种子引发后,播于预冷的二层滤纸上于2—3℃低温吸胀24h,然后移入22℃滤纸发芽床培养48h。以干种子(含水量6.8%)进行同样处理做为对照。

3. 线粒体的制备 取10g大豆子叶,加35ml研磨介质,按Booner等^[7]和梁峰等^[8]的方法研磨、分离和悬浮。研磨介质的成分为:0.4mol/l蔗糖,50mmol/l Tris-HCl(pH8.0),1mmol/l EDTA 钠盐,0.1% BSA,1%PVP。悬浮介质与研磨介质相同,但BSA为0.6%,没有PVP。加入悬浮介质0.5ml。悬浮后线粒体悬浮液体积为0.7ml。所有操作在4℃下进行。

4. 氧化磷酸化测定 用Clark氧电极测定。反应介质的组成为0.3mol/l蔗糖,10m

本文1987年2月25日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

mol/l 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2), 50m mol/l KCl, 5mmol/l MgCl₂, 10mmol/l Tris-HCl(pH 7.2)。每次反应加入反应介质 2ml, 加入线粒体悬浮液 0.1ml, 温度为 30℃。

5. 蛋白质测定 按 Bradford^[9] 方法。

二、结果和讨论

1. 低温吸胀后对照大豆种子氧化磷酸化活性的损伤 对照大豆种子 22℃ 培养 48h 后, 子叶线粒体虽然能氧化 L-苹果酸 (L-Mal)、 α -酮戊二酸 (α -Kg) 和琥珀酸 (Succ), 但缺乏氧化磷酸化活性, 线粒体呼吸的极谱图上没有状态 III 向状态 IV 的转变, 没有 ATP 的合成(图 1)。

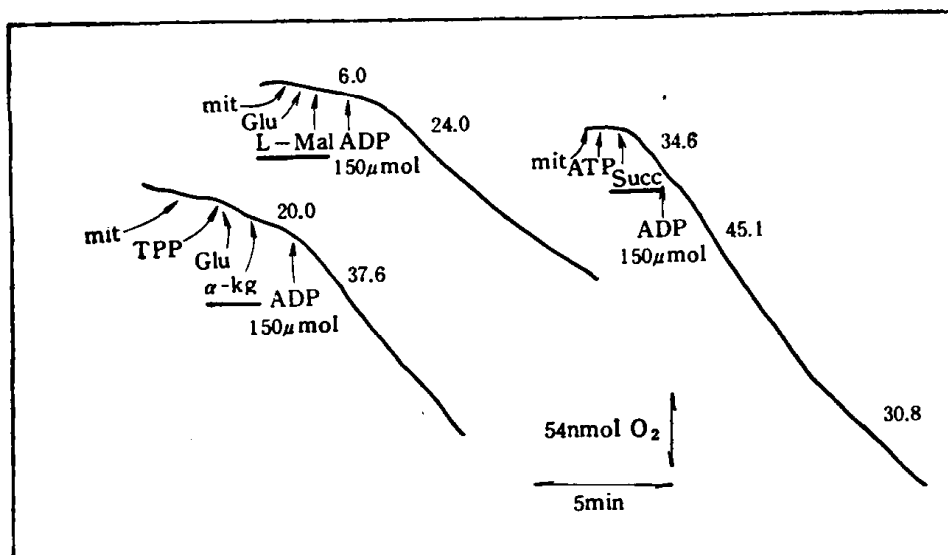


图 1 发生吸胀冷害后大豆子叶线粒体对呼吸底物的氧化
mit: 线粒体悬浮液; Glu: 谷氨酸; Tpp: 硫胺素焦磷酸

由表 1 可以看到, α -酮戊二酸和琥珀酸为底物时, 对照线粒体状态 III 呼吸强度比引发种子线粒体明显增加(分别提高 79% 和 45%), 但以 L-苹果酸为底物时, 二者呼吸强度相近。以 NADH (还原型辅酶 I) 为底物时, 对照线粒体呼吸比 PEG 引发高 49%。值得注意的是, 对照具有状态 III 向状态 IV 的转变, 但其 ADP/O 和 RC 值均比引发的为低(图 2、表 2)。

表 1 大豆子叶线粒体状态 III 呼吸强度*

底物	L-苹果酸	α -酮戊二酸	琥珀酸	NADH
PEG 引发	22.1	21.0	31.2	58.1
对照	24.0	37.6	45.1	86.4

* 单位: nmol O₂/min/mg 线粒体 Pr.

2. PEG 引发对大豆种子氧化磷酸化的保护效应 PEG 引发种子低温吸胀 24h, 再在 22℃ 培养 48h, 此时子叶线粒体以 L-苹果酸、 α -酮戊二酸和琥珀酸为底物时, 表现明显的状

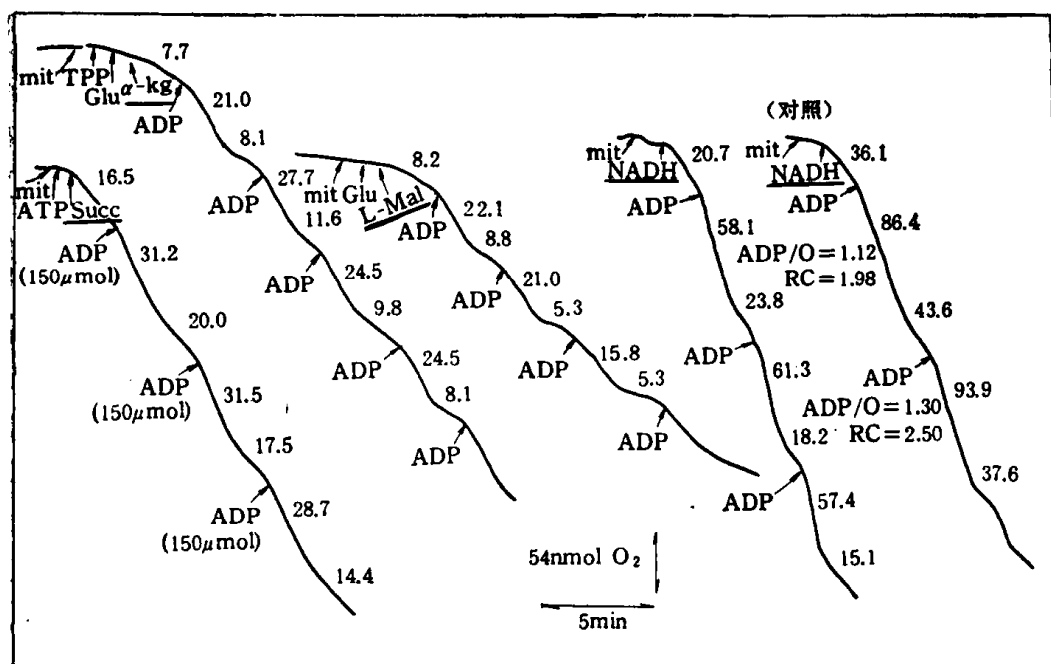


图 2 PEG 引发大豆子叶线粒体对呼吸底物的氧化

表 2 大豆子叶线粒体氧化磷酸化活性

底 物	处 理	循环 1		循环 2		循环 3		平均值	
		ADP/O	RC	ADP/O	RC	ADP/O	RC	ADP/C	RC
L-苹果酸*	PEG	2.66	2.52	2.80	4.00	3.12	3.00	2.86	3.17
α -酮戊二酸*	PEG	2.54	2.61	3.21	2.39	2.97	2.50	2.91	2.50
琥珀酸*	PEG	2.06	1.56	2.03	1.80	1.90	2.00	2.00	1.79
NADH	PEG	1.70	2.44	1.63	3.37	1.53	3.81	1.62	3.21
	CK	1.12	1.98	1.30	2.50			1.21	2.24

* 以其为底物时,对照线粒体不表现状态 IV 呼吸,故无 ADP/O 和 RC. ADP/N: 磷氧比, RC: 呼吸控制比。

态 III 和状态 IV 呼吸(图 2),其 ADP/O 和 RC 值如表 2。氧化 L-苹果酸、 α -酮戊二酸和琥珀酸时 ADP/O 值分别为 2.86, 2.91, 2.00, 此结果与理论值相符。引发大豆种子即使在 2—3℃ 低温吸胀 24h, 在培养 48h 后线粒体结构与功能已经完善,表现在此时具有较高的氧化磷酸化活性(表 2)。PEG 引发处理对于预防低温吸胀后敏感大豆种子线粒体氧化磷酸化功能降低或丧失的效果是显著的,这一结果从呼吸代谢的一个方面阐明了 PEG 引发提高大豆种子抗吸胀冷害能力的作用。

值得注意的是,对照和引发种子线粒体氧化 NADH 时,均表现状态 III 和状态 IV 呼吸,但对照 ADP/O 比 PEG 引发的低 25%, RC 则下降 30%(表 2)。对照线粒体虽然能以 NADH 为底物进行氧化磷酸化合成 ATP,但其能力比 PEG 引发的明显降低。氧化不同底

物时,对照种子线粒体氧化磷酸化功能表现不同程度的障碍。

以上结果说明,对照大豆种子吸胀阶段低温引起线粒体氧化磷酸化功能的不可逆障碍,导致线粒体氧化 L-苹果酸、 α -酮戊二酸和琥珀酸时呼吸不能由状态 III 向状态 IV 转变,线粒体不能磷酸化合成 ATP,或者降低磷酸化效率(氧化 NADH 时)。而引发种子在低温吸胀后线粒体具有较高的氧化磷酸化活性,保证了种子萌发及幼苗生长过程中的能量需求,种子活力和幼苗健壮度得以提高。在吸胀阶段随着种子细胞含水量逐步增加,生物膜由六角型结构逐渐恢复为正常的液态镶嵌脂质双层结构,而吸胀时膜结构的转化过程可能是对环境因子敏感的^[10]。这就支持了我们的观点,低温吸胀时敏感种子膜系统,例如线粒体膜由于快速吸胀产生物理性损伤,伴随着代谢过程的启动与活化,这种损伤能进行一定程度的修复。但这种修复作用是有限的,当伤害超过一定限度,将影响线粒体膜系统的重建和分化,使其结构与功能产生不可逆损伤。PEG 引发处理 3 天后种子含水量达 34% 左右,种子细胞与环境的水势差降低,可以有效地防止生物膜特别是线粒体膜系统在吸胀过程中的物理性损伤;由于引发处理时代谢活动的加强,细胞的自我修复能力也得以提高,并且在此含小量水平上种子细胞膜系统已经在温度合适条件下完成了对环境敏感的构型转换。这些也许就是引发种子具有较强抗逆力的基础。

参 考 文 献

- [1] 郑光华等,科学通报,26(1981),9:564—567.
- [2] 郑光华等,植物学报,27(1985),329—333.
- [3] 燕义唐,植物生理学通讯,1987,4:24—27.
- [4] Woodscock, L.W. et al., *Physiol. Plant*, 51(1981), 133—139.
- [5] 郑晓鹰等,中国农业科学,1986,3:36—41.
- [6] Khan, A. A. et al., *Israel J. of Botany*, 29(1981), 133—144.
- [7] Booner, W.D., *Enzymology*, A/P, Vol.X, 1967, 126—133.
- [8] 梁峥等,科学通报,30(1985),16: 1258—1260.
- [9] Bradford, M.M., *Analyt. Biochem.*, 72(1976),248—254.
- [10] Simon, E.W., *Dry Biological Systems*(Eds. Crowe, J.H., Clegg, J.S.), Academic Press, New York, 1978, 205—224.