

文章编号: 1672 - 058X(2009)04 - 0388 - 06

杂交稻种子萌发酶活性的变化

冉景盛, 向邓云, 韩宗先

(长江师范学院 生命科学系, 重庆 涪陵 408100)

摘要:在种子萌发过程中,酶活性的变化是最为明显的现象之一,用 3,5-二硝基水杨酸法、碱式滴定法、离体法、愈创木酚法分别测定了陵优 1 号、中优 9801 和宜香 93033 种杂交稻种子萌发过程中淀粉酶、脂肪酶、硝酸还原酶和过氧化物酶活性的变化,结果表明:杂交稻种子萌发率与淀粉酶和过氧化物酶的活性变化呈极显著相关。

关键词:水稻种子;萌发;酶活性;相关性

中图分类号: Q946.5

文献标志码: A

¹ 水稻种子萌发,其酶活性的变化是最显著的特征之一。廖宇静,周清元^[1]等认为在水稻种子萌发中,内源系列酶,由原束缚态酶转变为激活态酶,淀粉酶、脂肪酶等在原束缚态酶基础上重新合成,水稻种子萌发与淀粉酶的消长有很大关系。邓鹃德和王挂元^[2]发现杂交水稻具有最大的淀粉酶活性和萌发速率,证明了两者的平行关系。林榕辉、朱智伟^[3]等发现脂肪酶活性变化与棉子萌发期间物质动员速率及幼苗生长速度是一致的。稻谷中脂类含量约为 3%,是稻谷的重要营养物质之一,脂肪酶能与其他酶协同发挥作用催化分解脂类物质生成糖类,提供种子生根发芽所必需的养料和能量^[4]。硝酸还原酶是植物氮素代谢的关键酶,它对植物生长发育、产量形成和蛋白质含量都有重要影响,其活性常作为品种选育和营养诊断的重要生理生化指标^[5]。张玉平、刘强^[6]等分析比较了水稻不同生长阶段的氮代谢水平,从植物营养和生理生化角度分析和筛选了能广泛推广应用的蛋白质含量和产量均较高的水稻品种。过氧化物酶是植物体中活性较高的一种酶,与呼吸作用、生长素的氧化等相关,对植物细胞的生长和分化起调节作用。何之常、肖翊华^[7]研究表明超氧化物歧化酶活性的变化与杂交优势的相关性显著,然而过氧化物酶活性的变化与种子萌发的相关性还有待于进一步研究。

大量资料显示,对水稻种子萌发与酶活性的研究,因方法和侧重点不同,较缺乏统一性和规律性。实验选用重庆市涪陵区常规的 3 种水稻种子探讨种子萌发时淀粉酶、脂肪酶、硝酸还原酶、过氧化物酶的活性变化。

1 材料与方法

1.1 材料

陵优 1 号、中优 9801、宜香 9303,重庆市涪陵区农业科学研究所提供。

1.2 种子的处理

分别选取适量的陵优 1 号、中优 9801、宜香 9303,用清水充分漂洗后去除漂浮空粒,用 0.2% 的氯化汞

收稿日期: 2009 - 04 - 18;修回日期: 2009 - 05 - 28。

作者简介:冉景盛(1969 -),男,土家族,重庆酉阳人,讲师,从事植物生理学的研究。

消毒 30 min,各挑选 300 粒饱满且籽粒大小相当种子用蒸馏水反复洗 3 次,浸种 24 h,转入铺有湿润纱布的培养皿中,水培法,温度 28 ℃,连续培养 7 d,每一处理重复 6 次。

1.3 方法

1.3.1 萌发率统计

以种子芽长达到种子长度一半为发芽标准,观察统计不同培养时期的种子萌发情况。萌发率按方程^[8]进行统计: $G_r = \sum G_i / T \times 100\%$,其中: G_r 为发芽率, G_i 为在 i 日的发芽数; T 为供试种子总数。

1.3.2 酶活性的测定

以培养 24 h 的种子为第 1 d,连续 7 d,测定淀粉酶、脂肪酶、硝酸还原酶、过氧化物酶活性。淀粉酶活性测定用 3,5-二硝基水杨酸法^[9],定义在 25 ℃ 下,单位组织每 min 生成的麦芽糖含量 (mg) 表示一个酶单位^[10];脂肪酶活性的测定用碱式滴定法^[11],以滴定时消耗 1 mL 0.05 mol/L 的 NaOH 作为一个酶活力单位;硝酸还原酶活性的测定用离体法^[11]以单位组织每分钟生成的 NO_2^- 含量 (μg) 表示酶活性;过氧化物酶活性的测定用愈创木酚法^[12]以每 min 在 470 nm 波长下吸光度值变化 0.01 为 1 个活力单位表示酶活性。每项指标的测定均重复 6 次以上。

2 结果与分析

2.1 萌发率统计

表 1 不同水稻种子萌发率

萌发时间 /d	陵优 1 号	中优 9801	宜香 9303	%
1	0.00	0.00	0.00	
2	0.00	0.00	0.00	
3	41.00	22.33	21.67	
4	92.00	83.33	83.00	
5	99.00	94.00	93.67	
6	99.00	94.33	95.33	
7	99.00	94.33	95.33	

从表 1 知,水稻种子从第 3 d 开始发芽,培养第 5 d,陵优 1 号出现萌发率高峰期,萌发率为 99.00%,中优 9801、宜香 9303 萌发高峰期出现在第 6 d,萌发率分别为 94.33%、95.33%,仅相当于陵优 1 号培养第 4 d 种子萌发率 (92.00%),落后其 24~48 h。由此可见,在相同条件下,供试杂交稻种子的萌发率和萌发势呈现明显差异。萌发率越快,萌发势就越高,其种子萌发力越强。

2.2 酶活性的变化

2.2.1 淀粉酶活性的变化

由图 1 知,3 种水稻种子的淀粉酶活性上升趋势相似,发芽前两天酶活性均较低,但种子已萌动,说明浸种充分的种子已激活内存束缚态酶。淀粉酶是种子吸水后新合成的酶,在萌发过程中不断被合成。自然状态下,主要是淀粉酶的水解提供芽鞘伸长生长所需的能量^[13],其活性在胚根突破种皮后迅速大幅度上升,陵优 1 号和中优 9801 在萌发第 6 d 淀粉酶活性已达到最大值,分别为 8.60、8.33,此后淀粉酶活性开始下降。宜香 9303 的淀粉酶活性于第 5 d 达到最大值,随后逐步下降,其淀粉酶活性略低于陵优 1 号。淀粉酶活性出现这种先上升后下降的主要原因是,在种子萌发初期,淀粉酶不断催化淀粉分解供给幼苗生长的营养物质,当催化分解淀粉生成的糖含量达到一定浓度时,就反馈抑制淀粉酶活性,使其活性减小,因此随着种子培养时间的延长,淀粉酶活性呈下降趋势。这与赵玉锦^[14]研究水稻种子萌发过程

中 淀粉酶活性变化的结果一致。

由图 2 知,3 种水稻种子 淀粉酶的活性从开始一直呈上升趋势,在萌发前 1 d 酶活性大幅度上升,可能是种子萌发前需要大量的 淀粉酶水解淀粉,用以转化和提供种子萌发所需的物质和能量。而在发芽后, 淀粉酶活力有一个短暂的下降,继而又缓慢上升。一般干种子中主要是 淀粉酶或完全是 淀粉酶,种子吸水萌发过程中 淀粉酶被不断活化,同时在萌发的过程中不断被消耗,因而在萌发后呈下降的趋势。

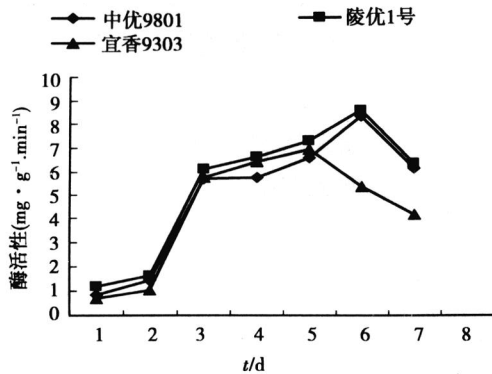


图 1 α -淀粉酶活性的变化

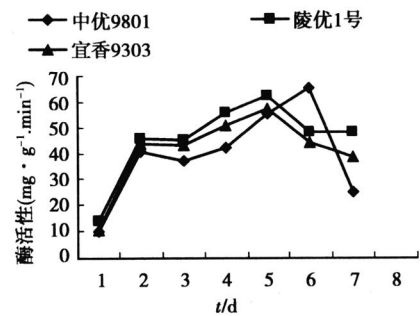


图 2 β -淀粉酶活性的变化

由图 3 知,3 种水稻种子的总淀粉酶活性从第 1 d 开始呈缓慢增大的趋势,陵优 1 号和宜香 9303 的总酶活性于第 5 d 达最大值,分别为 68.58、63.31。中优 9801 的总酶活性于第 6 d 达最大值,为 79.80,这与种子内贮藏物质淀粉的降解是一致的,此后总酶活性开始下降,中优 9801 的总酶活性在第 7 d 的下降尤为明显。

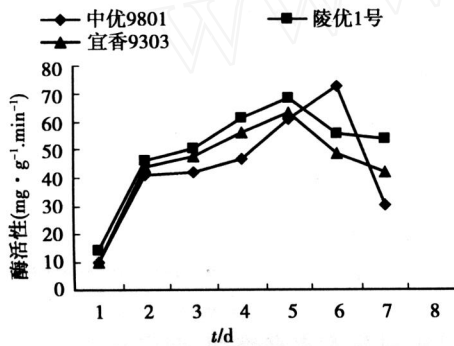


图 3 总淀粉酶活性的变化

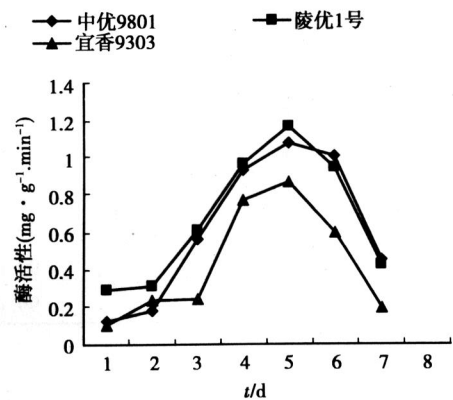


图 4 脂肪酶活性的变化

2.2.2 脂肪酶活性的变化

由图 4 知,3 个品种的水稻种子脂肪酶活性变化趋势一致,第 1 d 酶活性较低,从第 2 d 酶活性显著上升,至第 5 d 达最高峰。此时,陵优 1 号、宜香 9303 和中优 9801 的脂肪酶活性分别为 1.17、0.87 和 1.08,此后脂肪酶活性开始下降。出现这种变化趋势的主要原因是种子萌发过程中,种子中的脂肪分解酶、酯酶和脂肪氧化酶逐渐被激活,从而使脂类物质发生了一系列复杂的变化。脂肪被分解成甘油和脂肪酸,使游离脂肪酸增加,同时脂肪中饱和脂肪酸的比例也增加,这可能与种子萌发时首先利用不饱和的亚油酸、亚麻酸有关。随着种子培养时间的延长,脂肪酸逐渐消失,经过代谢,最终生成碳水化合物。脂肪酶是脂肪分解代谢中第一个参与反应的酶,一般认为它对脂肪的转化速率起着调控作用^[15]。

2.2.3 硝酸还原酶活性的变化

由图 5 知,在 3 种水稻种子的萌发过程中,硝酸还原酶活性均较低。陵优 1 号、宜香 9303 和中优 9801 的硝酸还原酶活性从第 3 d 开始显著增大,这与第 3 d 种子发芽长出叶片相对应,叶片是 NO_2^- 同化的主要器官,尤其以新生叶片硝酸还原酶活性较高。硝酸还原酶是一种诱导酶,是植物氮代谢的限速酶,可催化

NO₃⁻还原为 NO₂⁻^[16],在调节植物吸收利用 NO₃⁻及维持体内多种代谢平衡中起着极为重要的作用。

2.2.4 过氧化物酶活性的变化

由图 6 知,过氧化物酶活性呈上升趋势。在萌发前期过氧化物酶活性较低,第 1 d 增长缓慢,随着萌发进程的持续,种子中过氧化物酶活性急剧增强,第 2 d 有较大幅度的增长,此后持续上升,这与种子第 2 d 开始露白、出芽、胚根突破种皮相对应。一些研究表明休眠种子的呼吸代谢以糖酵解和三羧酸循环途径为主,而非休眠种子则以磷酸戊糖途径为主,要使种子打破休眠而萌发,必须使种子的呼吸代谢途径转为磷酸戊糖途径,而过氧化物酶活性的提高有利于磷酸戊糖途径的进行^[17],可能是促使种子休眠解除的原因之一。

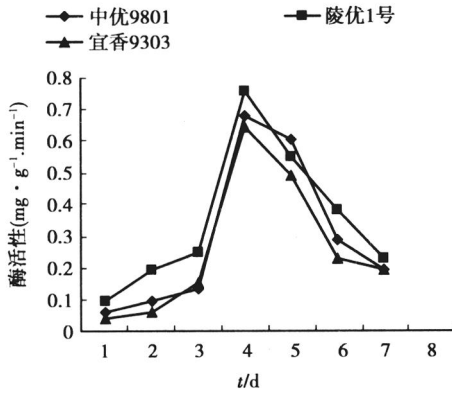


图 5 硝酸还原酶活性的变化

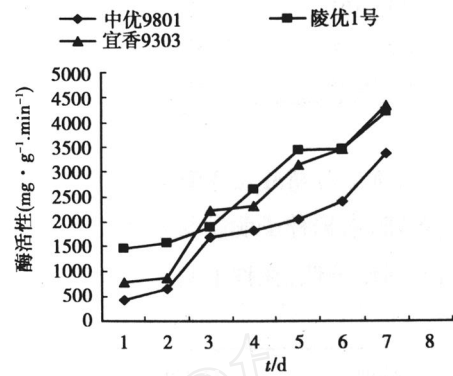


图 6 过氧化物酶活性的变化

2.3 相关性分析

2.3.1 种子萌发与淀粉酶活性的相关性

由表 2 知,宜香 9303、中优 9801 和陵优 1 号的淀粉酶活性与萌发率的相关系数分别达到了 0.76、0.87 和 0.93。说明水稻种子萌发与淀粉酶活性密切相关,尤其是与 淀粉酶活性呈极显著正相关。在种子萌发过程中,淀粉酶活性逐渐增大,陵优 1 号的萌发率、淀粉酶活性大于其他两个品种。在种子萌芽的第 7 d,各品种的淀粉酶活性都出现了不同程度的下降,此时种子萌发率不再增大。由此可知,淀粉提供着种子萌发的主要物质来源,淀粉酶在种子萌发中起着重要作用,其活性高低直接影响种子的萌发,见表 3、表 4。

表 2 萌发率与 淀粉酶的相关性

品种	t 检验值	P 值	F 值	显著水平	相关系数
中优 9801	3.916 2	0.008 7	15.336 9	0.011 2	0.87**
陵优 1 号	5.443 6	0.001 6	29.632 9	0.002 8	0.93**
宜香 9303	2.589 0	0.041 3	6.703 1	0.048 9	0.76*

表 3 萌发率与 淀粉酶的相关性

品种	t 检验值	P 值	F 值	显著水平	相关系数
中优 9801	2.314 2	0.059 9	5.355 4	0.068 6	0.72*
陵优 1 号	4.321 1	0.005 0	18.276 3	0.007 6	0.89**
宜香 9303	2.795 9	0.031 3	7.817 2	0.038 2	0.78*

表 4 萌发率与总淀粉酶的相关性

品种	t 检验值	P 值	F 值	显著水平	相关系数
中优 9801	2.569 8	0.043 2	6.603 9	0.050 0	0.75*
陵优 1 号	4.780 6	0.003 1	22.853 7	0.005 0	0.91**
宜香 9303	2.796 2	0.031 3	7.817 7	0.038 2	0.78*

2.3.2 种子萌发与脂肪酶活性的相关性

由表 5 知,中优 9801 和陵优 1 号的萌发与脂肪酶活性变化存在一定程度的相关性,相关系数分别为 0.82 和 0.76。而宜香 9303 的萌发与脂肪酶的活性变化不显著。由此可见,在种子萌发过程中,脂肪酶活性逐步升高,分解脂类物质,为种子萌发提供一定的养料。脂肪酶活性的变化在水稻种子萌发中的作用因品种而异。

表 5 萌发率与脂肪酶的相关性

品种	<i>t</i> 检验值	<i>P</i> 值	<i>F</i> 值	显著水平	相关系数
中优 9801	3.223 3	0.018 1	10.389 4	0.023 4	0.82*
陵优 1 号	2.633 7	0.038 9	6.936 5	0.046 3	0.76*
宜香 9303	2.117 6	0.078 5	4.484 2	0.087 8	0.69

2.3.3 种子萌发与硝酸还原酶活性的相关性

由表 6 知,水稻种子萌发与硝酸还原酶的相关性不显著。由于在种子萌发初期未经 NO_3^- 诱导,所以硝酸还原酶的活性较低,在种子萌发过程中所起的作用不显著。

表 6 种子萌发率与硝酸还原酶的相关性

品种	<i>t</i> 检验值	<i>P</i> 值	<i>F</i> 值	显著水平	相关系数
中优 9801	2.154 8	0.074 6	4.643 0	0.083 7	0.69
陵优 1 号	2.071 0	0.083 8	4.289 1	0.090 0	0.68
宜香 9303	2.069 2	0.084 0	4.281 6	0.093 3	0.68

2.3.4 种子萌发与过氧化物酶活性的相关性

由表 7 知,水稻种子的萌发与过氧化物酶的活性变化极显著,宜香 9303、中优 9801 和陵优 1 号的过氧化物酶活性变化与萌发率的相关系数分别达到 0.86、0.89 和 0.91。由此可知,在水稻种子萌发过程中,过氧化物酶起重要作用。其活性不断增大,逐步解除种子的休眠,从而促进种子萌发。

表 7 种子萌发率与过氧化物酶的相关性

品种	<i>t</i> 检验值	<i>P</i> 值	<i>F</i> 值	显著水平	相关系数
中优 9801	4.459 1	0.004 3	19.883 3	0.006 6	0.89**
陵优 1 号	4.917 2	0.002 7	24.178 5	0.004 4	0.91**
宜香 9303	3.835 4	0.008 6	14.710 6	0.012 2	0.86**

3 讨 论

种子中贮藏的富含化学能的有机物,在种子萌发时释放出大量的能量,同时转变成易于吸收的形态,向种胚提供形成新组织的所需物质和发芽所需的能量。种子吸水萌发期间发生了许多生理代谢变化,主要表现在酶的活化、生成,细胞生理活性的恢复,同时进行着复杂的生化代谢,使种子的营养成分和理化性质发生了重大变化。

在种子萌发过程中,随着种子含水量增加,各种水解酶被活化,种子内贮藏物质被分解,呼吸强度迅速升高,过氧化物酶活性也急剧增强,与呼吸强度呈极显著正相关,直到种子萌发结束活性达到最高。过氧化物酶在植物体内与多种代谢活动有关,参与细胞分化,影响一系列生理活性分子的合成与降解,与种子萌发密切相关,可看作是植物细胞生长和植物体生物发育的重要生化标志之一。种子萌发初期是过氧化物酶最

活跃的关键时期^[18],这一时期种子中 DNA 和 RNA 进行活跃的转录和表达,从而使整个生理代谢活跃起来,关于过氧化物酶在种子萌发中的调控机制还有待于在分子水平上进一步研究。

淀粉酶是水稻种子萌发初期最重要的水解酶,对水稻种子萌发速率起重要调控作用。淀粉酶是淀粉内切酶,可以随机切断并彻底水解直链淀粉,而 淀粉酶是端解酶,只能从淀粉的非还原端开始依次进行水解。两种酶的共同作用,可将种子内贮藏的 95%的淀粉转化为可利用的小分子糖,为种子的萌发和生长阶段提供碳素营养和能量,保证种子萌发初期物质与能量的供应。结果表明:水稻种子的萌发与过氧化物酶和淀粉酶尤其是 淀粉酶极显著相关。

参考文献:

- [1] 廖宇静,周清元,张毅,等. 杂交水稻种子萌发中淀粉酶活性研究 [J]. 西南农业大学学报, 1998, 20 (4): 355-357
- [2] 邓鹏德,王挂元. 论水稻杂种优势与酯酶同工酶谱 [J]. 杂交水稻, 1986 (1): 42-46
- [3] 林榕辉,朱智伟,李丙东. 棉花种子萌发过程中脂肪酶活性研究 [J]. 棉花学报, 1993, 5 (2): 37-44
- [4] 叶霞,李学刚,张毅,等. 稻谷中游离脂肪酸与脂肪酶活力的相关性 [J]. 西南农业大学学报, 2004, 26 (1): 75-80
- [5] 赵洪祥,徐克章,李大勇,等. 吉林省不同年代育成大豆品种硝酸还原酶活性变化及其与产量的关系 [J]. 南京农业大学学报, 2007, 30 (2): 13-17
- [6] 张玉平,刘强,荣湘民,等. 几个早稻品种(组合)氮代谢关键酶活性的比较研究 [J]. 湖南农业大学学报, 2006, 32 (2): 177-181
- [7] 何之常,肖翊华. 杂交水稻超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性的研究 [J]. 武汉大学学报:自然科学版, 1990 (1): 100-104
- [8] 杨持. 生态学实验与实习 [M]. 北京:高等教育出版社, 2003
- [9] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京:高等教育出版社, 2000
- [10] 杨小勇,马飞. 重金属胁迫对水稻萌发种子淀粉酶活性的影响 [J]. 西北农业科技大学学报, 2002, 30 (3): 27-30
- [11] 张志良,瞿伟菁. 植物生理学实验指导 [M]. 北京:高等教育出版社:第 3 版, 2003
- [12] 张帆,梁宏伟,熊丹. 香果树种子萌发过程中生理生化变化的研究 [J]. 种子, 2007, 26 (10): 21-23
- [13] 陈爱国,陈进红. 胚芽鞘的伸长机理和生理生态响应 [J]. 山西农业大学学报, 2002, 33 (4): 438-441
- [14] 赵玉锦,王台. 水稻种子萌发过程中 淀粉酶与萌发率关系的分析 [J]. 植物学通报, 2001, 18 (2): 226-230
- [15] 叶霞,李学刚. 稻谷中游离脂肪酸与脂肪酶活力的相关性 [J]. 西南农业大学学报, 2004, 26 (1): 75-80
- [16] 彭勇,彭福田,姜远茂,等. 冬枣硝酸还原酶特性研究 [J]. 林业科学, 2006, 42 (11): 52-57
- [17] 梁宏伟,刘姝,陈发菊,等. 银鹊树种子萌发过程中的过氧化物酶和酯酶同工酶的变化 [J]. 种子, 2006, 25 (5): 38-40
- [18] 步洪凤,张显. 几个唐菖蒲品种过氧化物酶同工酶初探 [J]. 西北农业学报, 2006, 15 (3): 101-103

Change of enzyme activity of hybrid seeds during the process of gemination

RAN Jing-sheng, XIANG Deng-yun, HAN Zong-xian

(Department of Life Science, Yangtze Normal University, Chongqing Fulin 408100, China)

Abstract: In the process of seeds gemination, enzyme activity was one of the most significant phenomenon this article detemined the changes of amylase, lipase, nitrate reductase and peroxidase activity during the process of the three hybrid seeds gemination of Lingyou 1, Zhongyou 9801, Yixiang 9303 by 3, 5-dinitrosalicylic acid method, basic titration, vitro method and guaiacol method. The results showed that there are a significant correlation between gemination rate of hybrid seed and activity of α -amylase and peroxidase

Key words: hybrid rice; gemination; enzyme activity; correlation

责任编辑:田 静