

# 番茄种子衰老过程中 过氧化氢酶(CAT)活性变化

谷建田 范双喜 宋学锋

(北京农学院园艺系, 北京 102206)

欧阳新星

(北京蔬菜研究中心, 北京 100081)

**摘 要** 本试验以中蔬 5 号番茄种子为材料, 研究不同老化程度下, 种子萌发初期的 CAT 活性与种子活力的关系。试验结果表明, 活力指数与种子内 CAT 活性显著相关,  $r=0.995$ 。同时, CAT 标准液催化反应速度曲线显示, 在有充足的  $H_2O_2$  时, 酶活性与  $O_2$  产量(记录笔走纸高度)之间有极好的线性关系,  $r=0.997$ 。因此, 测定种子萌发初期的 CAT 活性, 是间接评判种子活力的一种可靠方法。

**关键词** 番茄种子 过氧化氢酶 种子活力

监测种子衰老程度最经典的方法是发芽率测定, 但它反映的是种子在理想条件下的表现。50 年代国际上提出种子活力的概念, 它能比较全面地反映种子在广泛的田间条件下的成苗能力, 因此, 深受人们重视。近半个世纪来, 人们不断地探索种子的监测手段, 已见报道的方法多达近百种<sup>[1]</sup>。Woodstock 将这众多的活力测定方法归为两大类<sup>[2]</sup>: 一类是根据种子的某一生理特性; 另一类则模拟田间条件。陶嘉龄等<sup>[3]</sup>则按方法本身的性质, 将其归纳为五大类: 生理测定法; 生化测定法; 物理测定法; 组织化学法和形态解剖鉴定法。

种子活力测定虽然方法很多, 但还存在很大的问题: 一方面对于种子活力难以确定一个可作为立法依据的量化标准; 另一方面, 测定方法难以规范化。除了列入 ISTA 和 AOSA《种子活力测定方法手册》的 8 种方法外, 其它的都还没有统一的规定。酶活性几乎涉及到所有的代谢活动, 因而在活力的生化测定上占有重要的地位。用得较多的是脱氢酶和谷氨酸脱羧酶。本试验以番茄种子为材料, 研究种子萌发初期体内 CAT 活性作为活力测定方法的准确性和可靠性。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

中蔬 5 号(强辉)番茄种子由中国农科院蔬菜花卉研究所提供。原始发芽率为 95% 以上。

### 1.2 加速老化

将种子分4个铝箔袋封装(10g/袋),一个在室温下放置待用。其它3个放入 $58\pm1^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中加速老化,分别隔6、8、12d各取出一袋。

### 1.3 发芽试验

用玻璃斜板发芽法。在 $25^{\circ}\text{C}$ 人工气候箱中进行,重复3次,各50粒种子。6d后测定发芽率,平均苗长,幼苗干重,计算活力指数和干物质转化效率。

### 1.4 CAT活性测定

配制10、20、30、40、50、60、70、80、90、100u/ml的CAT标准溶液,取 $10\mu\text{l}$ 入溶氧仪反应室,反应介质为pH7.0磷酸缓冲液(内含 $0.05\text{mol/L H}_2\text{O}_2$ ),保持温度 $25^{\circ}\text{C}$ ,分别记下第1、2、3、4min时的记录笔扫描位置。

未老化的和加速老化的种子各取1g,在 $25^{\circ}\text{C}$ 吸胀48h,重复2次,加入 $0.05\text{mol/L pH}7.0$ 磷酸缓冲液匀浆,定容 $100\text{ml}$ , $1500\times\text{g}$ 离心 $20\sim25\text{min}$ ,取上清液,测定方法同标准CAT酶液。

### 1.5 电导率测定

取100粒种子,用10ml去离子水浸泡9h。测定浸泡液的电导率(EC)。

## 2 结果与分析

### 2.1 种子衰老程度与发芽及幼苗生长的关系

表1的数据显示,在 $58\pm1^{\circ}\text{C}$ 条件下加速老化的番茄种子,与未老化的种子相比,发芽率下降,6d后所测的活力指数及干物质转化效率也降低,而且老化的时间越长,这几项指标下降的幅度越大;电导率则随着种子老化而增大。说明种子衰老伴随着生物膜的损伤,引起吸胀时电解质渗漏加剧。

表1 番茄种子老化对成苗及电导率的影响

序号	老化时间 (d)	发芽率(GR) (%)	活力指数 (VI)	干物质转化效率 (%)	电导率(EC) ( $\mu\text{S/cm}$ )
1	0	97	6.68	52.8	36.4
2	6	86	5.31	45.1	43.0
3	8	83	4.35	38.4	48.7
4	12	65	3.27	28.7	62.8

注: (1) 老化条件 $58\pm1^{\circ}\text{C}$ , 铝箔袋封装; (2) 发芽温度 $25^{\circ}\text{C}$ , 时间6d; (3) 活力指数(VI) = 发芽率(%)  $\times$  平均苗长(cm); 干物质转化效率 = 幼苗干重/种子干重(据含水量折算); (4) 重复3次。

### 2.2 种子衰老过程中CAT活性的变化

图1是将4个活力水平番茄种子CAT测定原始扫描图重叠而成。图中曲线表明,随着种子的老化,CAT酶促反应时间曲线的斜率减小,就是说,CAT活性逐渐下降。但反应时间不同,所测出的CAT活性有差别(表2)。虽然反应时间从1~4min所测出的CAT活性都能反映种子活力的变化趋势,但测定的准确性都有差别,反应时间定为 $2\text{min}$ 时CAT与VI及EC之间的回归与相关关系最好。

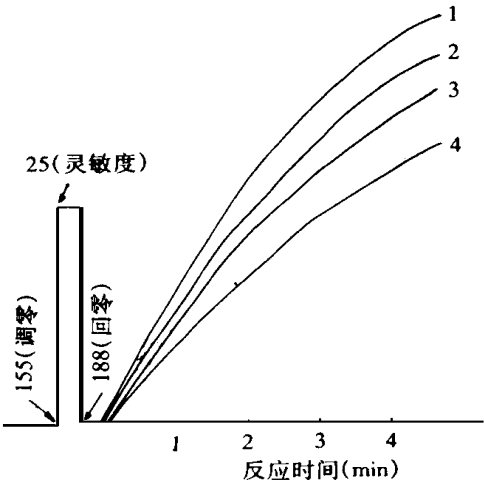


图 1 种子老化对 CAT 活性的影响

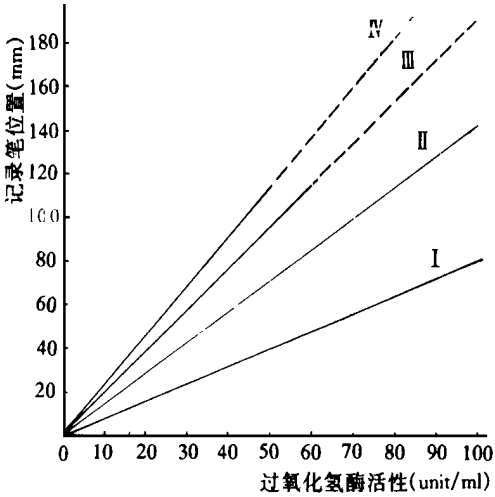


图 2 不同反应时间的 CAT 标准曲线

注: (1) 将 4 个活力水平种子 CAT 活性扫描图重叠; (2) 序号 1~4 老化时间分别为 0、6、8、12d, 条件见表 1 标注; (3) 测定前种子吸胀 48h; (4) 重复 2 次; (5) 反应温度 25℃; (6) ~ 分别代表反应 1、2、3、4min。

2.3 反应时间与 CAT 活性测定准确性的关系

从图 2 看出, 用溶氧法测定 CAT 活性, 当反应时间为 1min 和 2min 时, 在 0~100u/ml 范围内, 酶活性与记录笔走纸高度(O<sub>2</sub> 产量) 之间都有很好的线性关系, 相关系数均为 0.997。当反应时间为 3min 时, 在 0~60u/ml 范围内有极好的线性关系, 相关系数高达 0.999。但当酶活性在 60u/ml 以上时, 记录笔走纸高度明显偏低。反应时间在 4min 时, 线性关系更差一些。

表 2 不同反应时间对 CAT 活性测定结果的影响

序 号	老化时间 (d)	不同反应时间测出的 CAT 活性( × 10 <sup>2</sup> u/g)			
		1min	2min	3min	4min
1	0	34.6	36.2	38.0	39.9
2	6	30.5	31.5	32.6	33.1
3	8	29.9	29.7	30.5	30.7
4	12	23.9	24.0	24.5	24.2
与 VI 的相关系数		0.988	0.995	0.989	0.984
与 EC 的相关系数		- 0.986	- 0.989	- 0.985	0.977

注: 同图 1。

3 讨论

关于种子衰老, 人们提出过多种理论, 其中比较广泛的是自由基损伤学说, 即种子衰老是由于自由基攻击种胚细胞膜脂分子, 引起过氧化作用<sup>[3,7,8,9,11]</sup>。电导率和丙二醛(MDA) 含量测定就是依据这种理论作为种子活力测定的指标。电导率反应电解质渗漏情况, 生物膜完整性被破坏程度; 而 MDA 是膜脂过氧化作用的产物。根据上述理论, 种子内部对超氧自由基的清除

能力,也可以用来评判种子活力。CAT 是这个清除系统中与超氧歧化酶(SOD)协同作用的一个重要的酶。

根据酶学原理,CAT 活性是以它催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化的速度来表示。测定其活性一般是测定  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化产物( $\text{O}_2$ )增加量。由于酶促反应速度只在最初一段时间保持恒定,随着反应时间的延长,反应速度逐渐下降,因此,酶活性测定一般以初速度为准。图 2 中当反应时间为 1min 和 2min 时的标准曲线,反映的就是 CAT 酶促反应的初速度,反应时间与  $\text{O}_2$  产量(记录笔走纸高度)有很好的线性关系。当反应时间延长到 3min 和 4min 时,在较低的活性范围( $0 \sim 60\text{u/ml}$ )内,还有较好的线性关系,当酶活性提高到  $60\text{u/ml}$  以上时, $\text{O}_2$  产量偏低,这可能是由于底物  $\text{H}_2\text{O}_2$  消耗过快所致,同时也有产物  $\text{O}_2$  增加所造成的抑制作用。从真实反映 CAT 活性的角度看,1~2min 是最适宜的反应时间。

图 1 中 4 个样品提取液的 CAT 反应速度曲线与标准酶液的反应速度曲线相符。从表 2 看,虽然在 4 个不同的反应时间下,CAT 反应速度与种子活力指数呈正相关,与电导率值呈负相关,而且相关系数的绝对值都在 0.97 以上,但酶活性在不同活力水平的种批间的差距,随着反应时间延长而有增大的趋势。因此 CAT 活性测定作为评价种子活力的一项指标,其精确度就会受到一定影响。4 个样品的测定结果与标准酶液测定结果同样表明,溶氧法测定种子萌发初期的 CAT 活性,以 1~2min 的反应时间最佳。

## 参 考 文 献

- 1 王国龙(译).种子活力测定的生理学基础.农业译文.1986,(4): 11~16
- 2 张志良,吴光耀主编.植物生物化学技术和方法.北京:农业出版社,1986,57~59
- 3 谷建田,孔祥辉,陈杭.番茄种子人工老化前后吸湿-回干处理的生理生化变化.植物生理学报,1993,19(2): 131~136
- 4 陶嘉龄,郑光华著.种子活力.北京:科学出版社,1991,107~165
- 5 颜启传,毕辛华译,ISTA 著.国际种子检验规程.北京:农业出版社,1985,20~44
- 6 Basu RN.Seed Viability.Science of Culture,1982,48: 129~134
- 7 Bewley JD.Physiology of Seed Deterioration.CSSA Spec,1986,27~45
- 8 Priestley DA.Seed Aging.Cornell University Press,Comstock,1986,125~195
- 9 Stewart RC,Bewley JD.Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes.Plant Physiology,1980,65: 245~248
- 10 Tao KL,McDonald MB.Methods of Measuring Seed Vigor.ASSO Offi.Seed Anal,1980,17~28
- 11 Willson DO,McDonald M B.The lipid peroxidation model of seed aging.Seed Sci and Technol,1986,14: 269~300
- 12 Woodstock LW.Physiological and biochemical tests for seed vigor.Seed Sci and Technol,1973,1: 127~157

## Studies on Catalase Activity in Aging of Tomato Seeds

Gu Jiantian      Fan Shuangxi      Song Xuefeng

(Dept of Horticulture, Beijing Agricultural College, Beijing 102206)

Ouyang Xinxing

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100081)

**Abstract** Seeds of tomato(cv. zhongshu. 5) were aged in sealed aluminum foil bags under  $58 \pm 1^{\circ}\text{C}$  for 0, 6, 8, 12 days. The germination rate(GR), vigor index(VI), mobilization efficiency(ME), electro-conductivity(EC) and catalase(CAT) activity of the unaged and aged seeds were tested. Results show that as the seed ages, the declination of CAT activity is positively related to the decrease of VI, and negatively related to the increase of EC. From these results, it is concluded that CAT activity is a reliable parameter for seed vigor tests, and the optimal duration of reaction lasts 1—2 min.

**Key words:** Tomato seed; Catalase; Seed vigor