

多作物上都有报道,包括利马豆^[3]、棉花^[4]、豌豆^[5]、黄瓜^[6-7]、玉米和大豆^[8]。

腐胺(Put)是多胺中的一种,在逆境胁迫下能够稳定生物大分子以及防止细胞膜变性,还可以通过提高活性氧清除系统来间接对活性氧起到清除作用,以及通过产生 H_2O_2 作为信号分子激活植物自身的防御系统提高植物抗逆性。目前在多种作物的研究报道中显示,低温胁迫下经外源 Put 处理能够提高植物抗性,如玉米^[9]、黄瓜^[10]、番茄^[11]等。但 Put 对菜豆的耐低温性尤其是对吸胀冷害下菜豆种子的影响尚鲜见报道。

该研究以菜豆“热那亚”作为试验材料,设置 CK、LT、LT+Put 3 个处理,通过调查种子发芽率、种子活性、测定种子相对电导率及各种酶活性,来探讨外源 Put 对吸胀冷害下菜豆种子萌发与种子抗性的影响,以期对菜豆产业提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为通过前期试验筛选得到的低温敏感型菜豆品种“热那亚”。试验挑选大小一致、成熟饱满的“热那亚”种子,用 0.1% 的升汞消毒 3 min,再用蒸馏水冲洗 3 次,用滤纸吸干水后放置于带有滤纸的培养皿中,每皿 50 粒种子。

1.2 试验方法

1.2.1 发芽试验

试验设置 3 个处理,每处理 3 次重复。①CK:培养皿中加入 30 mL 蒸馏水,放置于 25 ℃ 培养箱中暗培养;②LT(low temperature):培养皿中加入 30 mL 蒸馏水,放置于 4 ℃ 培养箱中暗培养 12 h 进行吸胀冷害处理,然后放入 25 ℃ 培养箱中继续暗培养;③ LT+Put:培养皿中加入 30 mL、 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Put,放置于 4 ℃ 培养箱中暗培养 12 h 进行吸胀冷害处理,然后转入 25 ℃ 培养箱中继续暗培养。

以胚根伸出种皮 2 mm 作为发芽标志,统计 4 d 的发芽数,并在第 4 天测量胚根长度。计算发芽率、发芽指数和活力指数。

1.2.2 抗性试验

试验设置 3 个处理,每处理 3 次重复。①CK:

培养皿中加入 30 mL 蒸馏水,放置于 25 ℃ 培养箱中暗培养;②LT(low temperature):培养皿中加入 30 mL 蒸馏水,放置于 4 ℃ 培养箱中暗培养;③ LT + Put:培养皿中加入 30 mL、 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Put,放置于 4 ℃ 培养箱中暗培养。12、24、48 h 后挑选生长状态比较一致的种子,去除种皮后取子叶的部分进行理化指标测定。

1.3 项目测定

电解质渗透率参照 SAIRAM 等^[12]的方法测定。超氧化物歧化酶(SOD)活性参照 GIANNO-POLITIS 等^[13]的 NBT(氮蓝四唑)法,利用紫外分光光度计进行测定。过氧化物酶(POD)活性参照 THOMAS 等^[14]的愈创木酚法,利用紫外分光光度计进行测定。过氧化氢酶(CAT)活性参照 CAKMAK 等^[15]的紫外吸收法,利用紫外分光光度计进行测定。可溶性蛋白质含量参考张志良^[16]的考马斯亮蓝法,利用紫外分光光度计进行测定。丙二醛(MDA)含量参考 DHINDSA 等^[17]的硫代巴比妥酸比色法,利用紫外分光光度计进行测定。脯氨酸含量方法采用茚三酮比色法^[18],利用紫外分光光度计进行测定。过氧化氢(H_2O_2)含量参照 PATTERSON 等^[19]的方法,利用紫外分光光度计测定其在 410 nm 处的 OD 值。 O_2^- 产生速率参照 ELSTNER 等^[20]的方法,利用紫外分光光度计测定其在 530 nm 处的 OD 值,计算 O_2^- 产生速率。

1.4 数据分析

所有测定指标均取 3 次重复的平均值,绘图采用 Excel 软件,差异显著性检验采用 SPSS 17.0 软件。

2 结果与分析

2.1 外源腐胺对吸胀冷害下菜豆种子发芽率的影响

由表 1 可知,与 CK 相比,4 ℃ 的吸胀冷害下 LT 处理菜豆种子的发芽率、发芽指数和种子活力分别下降了 52.70%、57.98% 和 77.79%;经 Put 处理后分别提高了 87.12%、124.21% 和 191.99%;但与 CK 相比,LT+Put 处理分别降低了 11.49%、5.81% 和 35.13%。说明在菜豆种子

表 1 腐胺对吸胀冷害下菜豆种子萌发的影响

Table 1 Effects of Put on germination of *Phaseolus vulgaris* seeds under imbibition and chilling injury

处理 Treatment	发芽率 Germination rate/%	发芽指数 Germination index	种子活力 Seed vigor
CK	98.67±0.01a	44.44±1.81a	316.88±12.92a
LT	46.67±0.03b	18.67±1.52b	70.39±5.73b
LT+Put	87.33±0.03c	41.86±2.13a	205.53±10.47c

注:平均数和标准误差均来自于3次独立试验,各列中不同小写字母表示在0.05水平上有显著差异。

Note: Average and standard errors were derived from three independent experiments, and there were significant differences at 0.05 level for different small letters in each column.

的吸胀阶段遇到低温冷害会明显抑制其萌发,通过添加外源 Put 能够明显缓解种子吸胀冷害促进其萌发。

2.2 外源 Put 对 4℃ 吸胀冷害下菜豆种子细胞膜透性的影响

由图 1 可知,与 CK 相比,LT 处理种子的相对电导率显著上升,经过 Put 处理后相对电导率均下降。12 h 时,与 CK 相比,LT 处理种子的相对电导率上升了 98.54%,与 LT 处理相比,LT+Put 处理种子的相对电导率下降了 29.31%;24 h 时,与 CK 相比,LT 处理种子的相对电导率上升了 113.48%,与 LT 处理相比,LT+Put 处理种子的相对电导率下降了 28.7%;48 h 时,与 CK 相比,LT 处理种子的相对电导率上升了 151.01%,与 LT 处理相比,LT+Put 处理种子的相对电导率下降了 30.46%。可见利用外源 Put 处理可以缓解吸胀冷害下菜豆种子电解质的外渗。

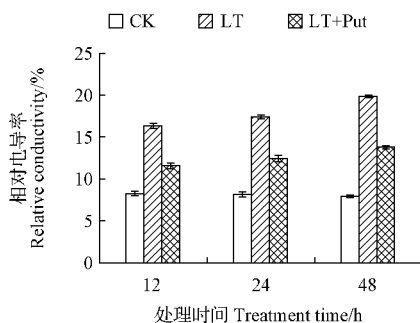


图 1 Put 处理对吸胀冷害下菜豆种子相对电导率的影响

Fig. 1 Effects of Put on relative conductivity of *Phaseolus vulgaris* seeds under imbibition and chilling injury

2.3 外源 Put 对 4℃ 吸胀冷害下菜豆种子抗氧化酶活性的影响

图 2 表明,菜豆种子经过 4℃ 低温处理后, SOD 活性均低于 CK,外源 Put 使吸胀冷害下菜豆种子中的 SOD 活性明显上升,且略高于 CK。如图 3 所示,与 CK 相比,4℃ 低温处理降低了菜豆种子中 POD 活性,经外源 Put 处理能够缓解吸胀冷害导致的 POD 活性下降,但与 CK 相比, POD 活性明显降低。

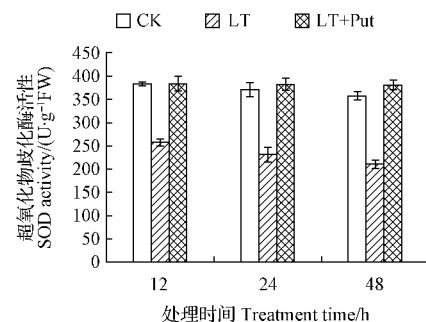


图 2 Put 处理对吸胀冷害下菜豆种子超氧化物歧化酶活性的影响

Fig. 2 Effects of Put on SOD activity of *Phaseolus vulgaris* seeds under imbibition and chilling injury

由图 4 可知,与 CK 相比,吸胀冷害导致菜豆种子中 CAT 活性有所下降,并且随着时间变化 CAT 活性越来越低。与 LT 处理相比,4℃ 下添加 Put 导致 CAT 活性明显提升,并且高于 CK。

2.4 外源 Put 对 4℃ 吸胀冷害下菜豆种子 O_2^- 、 H_2O_2 和 MDA 含量的影响

图 5、6 结果显示,与 CK 相比,吸胀冷害下的菜豆种子中 O_2^- 和 H_2O_2 含量明显升高,并且随着时间的延长 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量呈上升趋势。与 CK 相比,LT 处理的 O_2^- 产生速率在 3 个时间点分别升高了 163.03%、132.34% 和

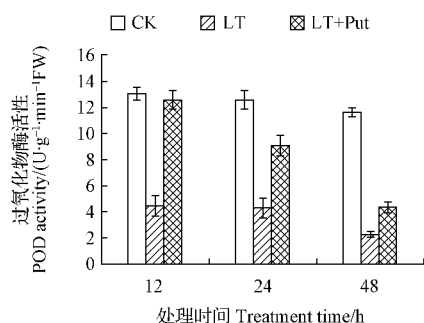


图 3 Put 处理对吸胀冷害下菜豆种子过氧化物酶活性的影响

Fig. 3 Effects of Put on POD activity of *Phaseolus vulgaris* seeds under imbibition and chilling injury

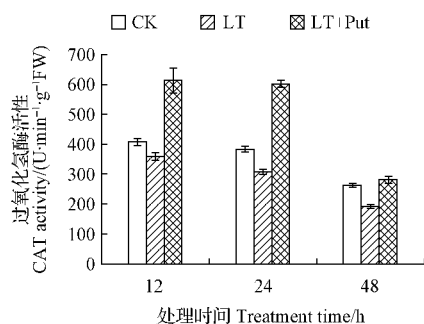


图 4 Put 处理对吸胀冷害下菜豆种子过氧化氢酶活性的影响

Fig. 4 Effects of Put on CAT activity of *Phaseolus vulgaris* seeds under imbibition and chilling injury

187.88%; H_2O_2 含量分别上升了 71.89%、74.03% 和 78.61%。吸胀冷害下添加 Put 明显的缓解了由于吸胀冷害造成的 O_2^- 和 H_2O_2 含量的上升, 与 LT 处理相比, LT+Put 处理 O_2^- 产生速率在 3 个时间点分别下降了 52.21%、44.09% 和 28.03%; H_2O_2 的含量分别下降了 34.08%、26.96% 和 22.37%。但依然高于 CK, 与 CK 相比, LT+Put 处理 O_2^- 产生速率在 3 个时间点分别高出 25.70%、29.89% 和 107.17%; H_2O_2 含量分别高出 13.13%、11.44% 和 38.65%。

从图 7 可以看出, 与 CK 相比, 吸胀冷害显著增加了菜豆种子中 MDA 含量, 并且随着处理时间的延长 MDA 含量增加, 与 CK 相比, LT 组在 3 个时间点分别上升了 106.06%、126.58% 和

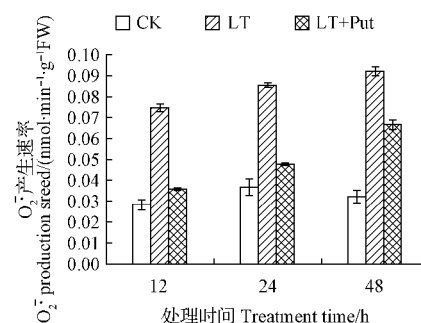


图 5 Put 处理对吸胀冷害下菜豆种子 O_2^- 产生速率的影响

Fig. 5 Effects of Put on O_2^- production speed of *Phaseolus vulgaris* seeds under imbibition and chilling injury

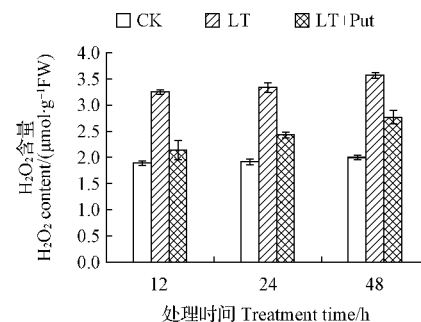


图 6 Put 处理对吸胀冷害下菜豆种子 H_2O_2 含量的影响

Fig. 6 Effects of Put on H_2O_2 content of *Phaseolus vulgaris* seeds under imbibition and chilling injury

108.25%。添加 Put 处理明显抑制了吸胀冷害对 MDA 含量的诱导, 与 LT 处理相比, LT+Put 处理 MDA 含量分别下降了 30.06%、37.63% 和 28.75%。

2.5 外源 Put 对 4 °C 吸胀冷害下菜豆种子中可溶性蛋白质和脯氨酸含量的影响

如图 8、9 所示, 与 CK 相比, 4 °C 吸胀冷害显著提高了菜豆种子中脯氨酸和可溶性蛋白质的含量, 在 12 h 时为最大值, 与 CK 相比, LT 处理种子分别升高了 153.62% 和 33.61%。经过外源 Put 处理会进一步提升菜豆种子中脯氨酸和可溶性蛋白质的积累, 也是在 12 h 时为最大值, 与 LT 处理相比, 分别增加了 20.72% 和 18.26%。

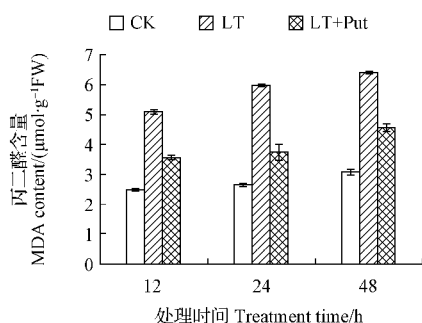


图7 Put处理对吸胀冷害下菜豆种子丙二醛含量的影响

Fig. 7 Effects of Put on MDA content of *Phaseolus vulgaris* seeds under imbibition and chilling injury

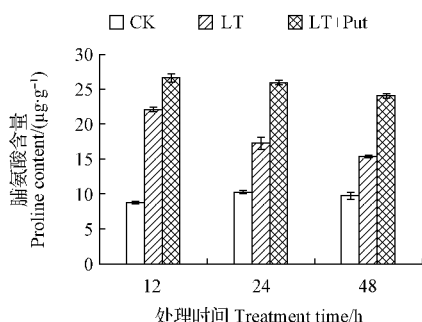


图8 Put处理对吸胀冷害下菜豆种子脯氨酸含量的影响

Fig. 8 Effects of Put on proline content of *Phaseolus vulgaris* seeds under imbibition and chilling injury

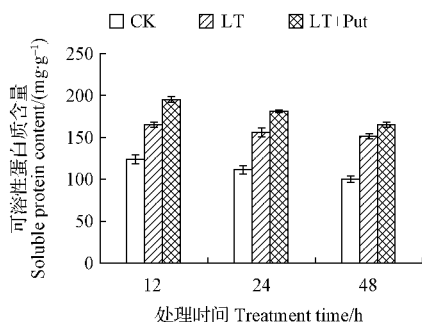


图9 Put处理对吸胀冷害下菜豆种子中可溶性蛋白质含量的影响

Fig. 9 Effects of Put on soluble protein content of *Phaseolus vulgaris* seeds under imbibition and chilling injury

3 讨论与结论

前人研究已经证明 Put 能够调节多种植物对各种非生物胁迫的反应,通过稳定质膜,抑制 NADPH 氧化酶活性和依赖 NADPH 的超氧化物生成以及作为应激信号调节剂来提高植物的抗逆性^[21]。在过去的几十年中,种子吸胀冷害是降低农作物产量的主要环境限制因素之一。在该试验中,4℃低温降低了菜豆种子发芽率和种子活力,但通过 Put 处理能够改善这一不利影响,与前人的研究结果是一致的^[9,22],并且与 NO、CaCl₂ 等对吸胀冷害下种子萌发的影响也大致相同^[23-25]。

可溶性物质,如脯氨酸和可溶性蛋白质是在种子抗氧化过程中重要的渗透调节物质,可以保护植物抵御各种非生物胁迫^[26]。在早期的研究中发现脯氨酸在植物细胞内积累可以很大程度的影响植物抗逆性,并且还可以与蛋白质互作,增加蛋白质的可溶性,从而提高植物的抗逆性。该研究中,外源 Put 的施用增加了可溶性蛋白质和脯氨酸含量。类似结果在拟南芥^[27-28]、苜蓿^[29]、番茄^[30]的叶片中已有报道^[28]。这一结果表明 Put 诱导的耐低温性与可溶性物质含量的增加相关。

在植物抵抗生物和非生物胁迫的过程中,ROS 爆发是最早的反应之一。有研究表明,对植物进行低温处理的过程中能够观察到 ROS 的积累^[31]。而 H₂O₂ 是生物系统中 ROS 的主要类型,会在低温胁迫下积累^[32]。MDA 是脂质过氧化的产物,其含量反映了氧化损伤的程度^[33-34]。许多研究都表明在响应胁迫条件下,多胺可以清除 ROS 以及通过减少脂膜过氧化稳定细胞膜^[35]。该研究发现,在吸胀冷害下菜豆种子中 MDA、O₂⁻、H₂O₂ 含量增加,经过外源 Put 处理后 MDA、O₂⁻、H₂O₂ 含量显著下降,并改善了吸胀冷害对种子萌发造成的不利影响。

当植物细胞中 ROS 累积时,为了减轻胁迫条件下 ROS 引起的伤害,细胞中的抗氧化酶会表达^[34]。在抗氧化酶中 SOD 在清除 ROS 中起着重要作用,SOD 通过形成 H₂O₂ 来清除 O₂⁻,同时 POD 和 CAT 会分解 H₂O₂^[36]。该研究中,与对照相比吸胀冷害下的菜豆种子中 SOD、POD 和 CAT 的活性都显著下降,外源 Put 的施用缓解了

低温导致的这3种酶活的降低。这一现象表明Put可以通过增强抗氧化酶活性,调节ROS清除系统来提高菜豆种子对吸胀冷害的抗性。

综上所述,在吸胀冷害下,外源Put的施用可能通过降低细胞膜透性,增加可溶性物质含量,诱导抗氧化酶活性,直接或间接调节ROS清除系统来提高菜豆种子对吸胀冷害下抗性,提高菜豆种子的发芽率、发芽指数和种子活力。

参考文献

- [1] BEWLEY J D. Seed germination and dormancy[J]. Plant Cell, 1997(9):1055-1066.
- [2] WEITBRECHT K, MULLER K, LEUBNER-METZGER G. First off the mark: Early seed germination[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62: 3289-3309.
- [3] POLLOCK B M. Imbibition temperature sensitivity of lima bean seeds controlled by initial seed moisture[J]. Plant Physiology, 1969, 44: 907-911.
- [4] CHRISTENSEN M N. Periods of sensitivity to chilling in germinating cotton[J]. Plant Physiology, 1967, 42: 431-433.
- [5] POWELL A A, MATTHEWS S. The damaging effect of water on dry pea embryos during imbibition[J]. Journal of Experimental Botany, 1978, 29: 1215-1229.
- [6] MAKEEN A M, NORMAH M N, DUSSERT S, et al. Seed moisture characteristics in relation to total lipid content of five Citrus taxa using an equilibrium dehydration protocol[J]. Seed Science and Technology, 2006, 34: 453-464.
- [7] POSMYK M M, BALABUSTA M, WIECZOREK M, et al. Melatonin applied to cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds improves germination during chilling stress[J]. Journal of Pineal Research, 2009, 46: 214-223.
- [8] HOBBS P R, OBENDORF R L. Interaction of initial seed moisture and imbibitional temperature on germination and productivity of soybean[J]. Crop Science, 1972, 12: 664-667.
- [9] 郑昀晔, 曹栋栋, 张胜, 等. 多胺对玉米种子吸胀期间耐冷性和种子发芽能力的影响[J]. 作物学报, 2008, 34(2): 261-267.
- [10] ZHANG W, JIANG B, LI W, et al. Polyamines enhance chilling tolerance of cucumber (*Cucumis sativus* L.) through modulating antioxidative system[J]. Scientia Horticulturae, 2009, 122(2): 200-208.
- [11] SONG Y, DIAO Q, QI H. Putrescine enhances chilling tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through modulating antioxidant systems[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(11): 3013-3027.
- [12] SAIRAM R K, SRIVASTAVA G C. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress[J]. Plant Science, 2002, 162(6): 897-904.
- [13] GIANNOPOLITIS C N, RIES S K. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants[J]. Plant Physiology, 1977, 59(2): 309-314.
- [14] THOMAS R L, JEN J J, MORR C V. Changes in soluble and bound peroxidase, IAA oxidase during tomato fruit development[J]. J Food Sci, 1981, 47: 158-161.
- [15] CAKMAK I, MARSCHNER H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves[J]. Plant Physiology, 1992, 98(4): 1222-1227.
- [16] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 268-269.
- [17] DHINDSA R S, PULM-DHINDSA P, THORPE T A. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase[J]. Journal of Experimental Botany, 1981, 32(126): 93-101.
- [18] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 商教育出版社, 2003.
- [19] PATTERSON B D, MACRAE E A, FERGUSON I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium(IV)[J]. Analytical Biochemistry, 1984, 139(2): 487-492.
- [20] ELSTNER E F, HEUPEL A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: A simple assay for superoxide dismutase[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 70(2): 616-620.
- [21] ANDRONIS E A, MOSCHOU P N, TOUMI I, et al. Peroxisomal polyamine oxidase and NADPH-oxidase cross-talk for ROS homeostasis which affects respiration rate in *Arabidopsis thaliana*[J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5(2): 132.
- [22] WANG Y F, WANG P C, WU J H, et al. Effect of polyamine priming on chilling tolerance of *Lolium perenne* during seed imbibitions[J]. Agricultural Science & Technology, 2012(9): 1859-1863, 1869.
- [23] 杨德光, 马月, 刘永玺, 等. 低温胁迫下外源 CaCl_2 对玉米种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 玉米科学, 2018(3): 83-88.
- [24] 赵萌, 魏小红. 吸胀冷害下外源 NO 对紫花苜蓿种子萌发及抗氧化性的影响[J]. 草业学报, 2015, 24(4): 87-94.
- [25] 刘姗姗, 杨特武, 黄海东, 等. 吸胀期低温与水分条件对油菜种子萌发的耦合效应[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(1): 44.
- [26] CHEN T H H, MURATA N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes[J]. Curr Opin Plant Biol, 2002, 5(3): 250-257.
- [27] KAPLAN F, KOPKA J, HASKELL D W, et al. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2004, 136(4): 4159-4168.
- [28] USADEL B, BLASING O E, GIBON Y, et al. Multilevel-genomic analysis of the response of transcripts, enzyme activities and metabolites in *Arabidopsis* rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range[J]. Plant Cell Environ, 2008, 31(4): 518-547.

- [29] WANG X, SHI G, XU Q, et al. Exogenous polyamines enhance copper tolerance of *Nymphoides peltatum* [J]. J Plant Physiol, 2007, 164: 1062-1070.
- [30] 宋永骏. 多胺在番茄幼苗耐低温胁迫中的调控作用[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2014.
- [31] PRASAD T K. Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings[J]. Plant Physiol, 1997, 114: 1369-1376.
- [32] ZHANG W, JIANG B, LI W, et al. Polyamines enhance chilling tolerance of cucumber (*Cucumis sativus* L.) through modulating antioxidative system[J]. Sci Hortic, 2009, 122: 200-208.
- [33] TAMBUSSI E A, BARTOLI G G, GUIAMET J J, et al. Oxidative stress and photo damage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves[J]. Plant Sci, 2004, 167: 19-26.
- [34] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. Plant Physiol Biochem, 2010, 48: 909-930.
- [35] BOUCHEREAU A, AZIZ A, MARTIN-TANGUY J, et al. Polyamines and environmental challenges: Recent development[J]. Plant Sci, 1999, 140(2): 103-125.
- [36] JALEEL CA, RIADH K, GOPI R, et al. Antioxidant defense response: Physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints[J]. Acta Physiol Plant, 2009, 31: 427-436.

Effects of Put on Seed Germination and Resistance of *Phaseolus vulgaris* Under Imbibition and Chilling Injury

LIU Chang, LI Jiayin, LIU Dajun, YANG Xiaoxu, FENG Guojun
(Crop Research Institute, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150000)

Abstract: In order to improve the germination rate of *Phaseolus vulgaris* seeds under imbibition and chilling injury, and alleviate the damage of imbibition and chilling injury to snap bean seeds. In the study, the seeds of *Phaseolus vulgaris* 'Renaya', which were of low temperature sensitivity were used as experimental materials. And three treatment groups were set, respectively CK (normal temperature control), LT (4 °C low temperature treatment) and LT+Put (4 °C low temperature treatment with Put of 1 mmol · L⁻¹ added) to study the effect of exogenous Put on the germination and resistance of *Phaseolus vulgaris* seeds under imbibitional chilling. The results showed that the germination rate, germination index and seed vigor in group LT+Put were increased by 87.12%, 124.21% and 191.99%, respectively, compared with the group LT. Also, as for the seeds of group LT+Put, their cell membrane permeability and soluble material content increased, antioxidant enzyme activity and content of O₂⁻, H₂O₂ and MDA also increased compared with those in group LT. It indicated that the addition of exogenous Put may increase the cell membrane permeability and the content of soluble material, induce the activity of antioxidant enzymes, directly or indirectly regulate the ROS scavenging system to improve the resistance of *Phaseolus vulgaris* seeds to imbibitional chilling, and improve the germination rate, germination index and seed vigor of *Phaseolus vulgaris* seeds.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*; seed; imbibition and chilling injury; Put