

NaCl 胁迫对大豆种子萌发及 α -淀粉酶活性的影响

谢兆辉 (德州学院生物系, 山东德州 253023)

摘要 [目的]探讨盐胁迫对大豆种子萌发及 α -淀粉酶活性变化的影响。[方法]用不同浓度的 NaCl 盐溶液处理大豆种子, 对大豆种子的发芽率、发芽势、发芽指数和大豆种子萌发过程中淀粉酶活性进行测定分析。[结果]结果表明, NaCl 溶液浓度低于 60 mmol/L 时, 对大豆种子的发芽势、发芽指数的影响较小, 而 NaCl 溶液浓度高于 90 mmol/L 时, 对大豆种子的发芽率、发芽势等抑制作用显著增强; 发芽第 3 天大豆的 α -淀粉酶活力最高, 随着 NaCl 溶液浓度的增加, α -淀粉酶的活力呈下降趋势。[结论]该研究为大豆种子萌发条件的选择提供科学依据。

关键词 大豆; NaCl 胁迫; 发芽势; 发芽指数; α -淀粉酶

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)02-00477-03

Effects of NaCl Stress on Seeds Germination and α -amylase of Soybean

XIE Zhao-hui (Department of Biology, Dezhou University, Dezhou, Shandong 253023)

Abstract [Objective] The purpose of research was to discuss the effects of NaCl stress on seeds germination and α -amylase of soybean. [Method] NaCl solutions with different concentration were used for saline stress to measure and analyze the seed germination percentage, vigor, index and amylase of soybean by saturating the seeds. [Result] The results showed that the germination rate, germination index and germination rate of those seeds which were treated with NaCl solutions at higher concentration (≥ 90 mmol/L) was swelled evidently. The activity of amylase was the highest in the third day and dropped along with the increase of NaCl concentration. [Conclusion] This study will provide the scientific basis for choice of soybean seeds germination conditions.

Key words Soybean; NaCl stress; Sprouting potential; Germination index; α -amylase

大豆 [*Glycine max* (L.) Merrill] 属于蝶形花科、豆科大豆属亚属栽培种, 别名黄豆, 为一年生草本植物。大豆子粒具有丰富的蛋白质, 低糖、低脂肪, 富含维生素和低聚糖、异黄酮等生理活性物质, 秸秆、叶子和荚皮是牲畜的优良饲料。土壤盐渍化对农业的威胁是一个全球性问题。由于栽培设施的封闭性特点及肥水管理的不当, 常导致设施土壤盐类积聚, 土壤盐渍化已成为国内外设施栽培中普遍存在的问题。该试验通过对盐胁迫下大豆种子萌发过程的研究, 旨在探讨盐胁迫对大豆种子萌发及 α -淀粉酶活性变化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 大豆种子、分析纯 NaCl、恒温培养箱、培养皿、过滤纸、容量瓶、电子天平、量筒和烧杯等; 大豆; 1% (wt%) NaCl 溶液; 1% (wt%) 可溶性淀粉溶液; 2% (wt%) 麦芽糖标准溶液; pH 值为 7.0 的磷酸缓冲液; 酒石酸钾钠、柠檬酸均为分析纯; 3,5-二硝基水杨酸, 化学纯; 亚硫酸钠。

1.2 实法

1.2.1 发芽率与发芽势试验。用分析纯 NaCl 配制 30、60、90、120、150 和 180 mmol/L 不同浓度的 NaCl 溶液, 以蒸馏水为对照 (CK), 置于铺有 2 层滤纸的培养皿中, 每皿 20 粒, 分别加入 20 ml 不同浓度的 NaCl 溶液, 每处理重复 3 次, 而后在 26 °C 下避光培养, 每天用相应的处理溶液冲洗材料以保持湿润。种子胚根突破种皮, 长度达种子长度一半时计为发芽种子, 第 3 天统计不同处理种子的发芽势并开始每天统计不同处理种子的发芽数。

发芽指数 (GI) = $\sum G_t / D_t$, G_t 为第 t 天种子发芽数; D_t 为对应的种子发芽的天数。相对盐害率 = (对照发芽率 - 盐处理发芽率) / 对照发芽率 $\times 100\%$ 。发芽势是指种子在适宜的发环境, 数天内发芽种子占全部催芽种子粒数的百分

比, 它表明种子的发芽活力, 发芽势数值大, 说明种子活力旺盛。

1.2.2 大豆种子萌发过程中淀粉酶活性试验。

1.2.2.1 麦芽糖标准曲线的绘制。参照文献 [1] 的试验方法。准确移取浓度为 2% (wt%) 的麦芽糖标准溶液 1.00、0.80、0.60、0.50、0.40、0.30、0.20、0.10 和 0.05 ml 于 25 ml 的试管中, 依次加入蒸馏水 0、0.20、0.40、0.50、0.60、0.70、0.80、0.90 和 0.95 ml, 在 50 °C 水浴中预热 3 min 后, 加入 2 ml 浓度为 1% (wt%) 的淀粉溶液。在 50 °C 水浴中反应 5 min, 立即加入已在沸水浴中预热的 4 ml 3,5-二硝基水杨酸试剂, 摇匀后放入沸水浴中反应 10 min; 另取 1 支 25 ml 的试管, 加入 1 ml 蒸馏水, 同法操作, 作空白试验。

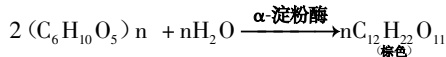
在波长 500 nm 处测定溶液的吸光度, 以浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $y = 0.9425x + 0.4452$ ($R^2 = 0.9894$)。

1.2.2.2 提取 α -淀粉酶。参考文献 [2] 的试验方法。取一定量的原料在不同盐浓度下恒温培养, 然后在第 1、2、3、4、5 和第 6 天分别取同等质量 (2.0 g) 的材料, 去皮后加入 5.0 ml 1% (wt%) 的 NaCl 溶液及 0.2 g 还原剂亚硫酸钠, 磨碎, 再加入一定量的缓冲溶液调节 pH 值至 7, 静置一段时间, 使其充分提取, 以 2 000 r/min 离心 10 min, 取上层清液即为提取液。

1.2.2.3 淀粉酶活性的测定。酶活力是通过测定酶促反应过程中单位时间内, 单位体积中底物的减少量或产物的增加量, 即测定酶促反应的速率来获得的。一般来说, 任何一个酶的催化反应, 如果底物或产物具有光吸收、旋光、电位差改变或荧光的变化等性质, 只要方法足够灵敏, 就可以直接加以检测。该试验采取蕪利娥等 [3] 的试验方法, 通过淀粉在 α -淀粉酶的催化作用下可生成麦芽糖, 利用麦芽糖的还原性与 3,5-二硝基水杨酸试剂反应生成棕色的 3-氨基-5-硝基水杨酸, 测定其吸光度, 从而确定酶液中的 α -淀粉酶活力。反应方程式如下:

作者简介 谢兆辉 (1968 -), 男, 山东茌平人, 硕士, 副教授, 从事植物分子生物学的教学与研究。

收稿日期 2008-10-17



取所得酶液均 6 ml,用 pH 值为 7.0 的缓冲溶液稀释 10 倍。取稀释后的酶液 1 ml,在 50 ℃ 的水浴中预热 3 min,立即加入 2 ml 1% 的淀粉溶液,在 50 ℃ 的水浴中反应 5 min,立即加入已在沸水浴中预热的 4 ml 3,5-二硝基水杨酸试剂,摇匀后放入沸水浴中反应 10 min,在波长 500 nm 处分别测定各自的吸光度。根据标准曲线酶的浓度,该试验规定:50 ℃ 时 5 min 内水解淀粉释放 1 mg 麦芽糖所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。计算酶活力公式为:酶活力单位 = C 酶 × V 酶 × n 酶, C 酶表示酶液中麦芽糖的浓度;V 酶表示提取酶液的总体积;n 酶表示酶液的稀释倍数。

表 1 NaCl 胁迫对大豆种子发芽率的影响

Table 1 Effects of NaCl stress on the germination rate of soybean seeds

NaCl 浓度//mmol/L NaCl concentration	发芽率 Germination rate//%						合计 Total	相对盐害率//% Relative salt-injury rate
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d		
0	55.00	30.00	15.00	0	0	0	100.00	0
30	40.00	30.00	15.00	10.00	0	0	95.00	5.00
60	10.00	50.00	25.00	10.00	0	0	95.00	5.00
90	10.00	40.00	35.00	0	0	0	85.00	15.00
120	10.00	10.00	30.00	10.00	0	0	60.00	40.00
150	5.00	10.00	25.00	15.00	0	0	55.00	45.00
180	0	5.00	0	10.00	0	0	15.00	85.00

胞膜,导致渗透物外渗,引起伤害。NaCl 溶液浓度越高,前 2 天发芽数所占比例越小。

2.1.2 NaCl 胁迫对大豆种子萌发芽势的影响。由图 1 可知,大豆种子的发芽势随 NaCl 浓度的升高而逐渐降低,呈极显著的负相关关系。不同浓度的 NaCl 处理能明显降低大豆种子发芽势,30 mmol/L 与对照差异不显著,发芽势高峰在第一天。60 和 90 mmol/L 之间差异不显著,但与 30 mmol/L 和对照差异显著,发芽势高峰在第 2 天。120 和 150 mmol/L 差异不显著,但与 30 mmol/L 和对照差异更为显著,发芽势高峰在第三天。其他处理间发芽势差异均达极显著水平。

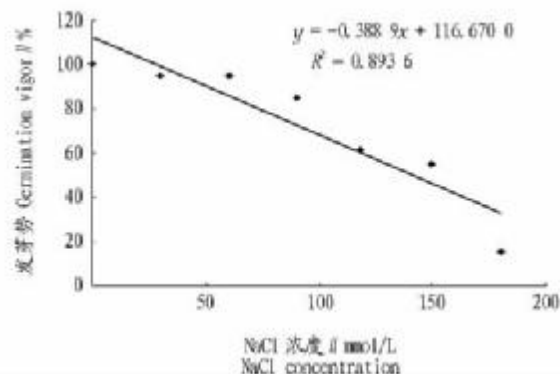


图 1 NaCl 浓度与种子发芽势之间的相关性

Fig. 1 Correlation between the NaCl concentration and the seed germination vigor

2.1.3 胁迫对大豆种子萌发芽指数的影响。由图 2 可知,大豆种子的发芽指数随 NaCl 浓度的升高而逐渐降低,呈极显著的负相关关系。除 30 mmol/L 外各处理种子与对照组发芽指数差异均达极显著水平,60 和 90 mmol/L 与 120、150、180 mmol/L 之间,120 与 180 mmol/L 之间差异达显著水平。

2 结果与分析

2.1 NaCl 胁迫对大豆种子发芽率和发芽势的影响

2.1.1 对大豆种子发芽率的影响。Foolad 等认为在一定胁迫条件下种子萌发表现为速率不变或加快^[4],但大多数研究认为盐胁迫对种子萌发有显著的抑制作用^[5-6],该试验结果表明,大豆种子经过不同浓度的 NaCl 处理后,其发芽率均受到不同程度的抑制作用,且各处理间差异显著(表 1),低浓度(≤60 mmol/L)NaCl 溶液对种子的发芽率抑制作用较小,而 NaCl 溶液浓度高于 90 mmol/L 时,盐胁迫对种子发芽率的抑制作用极为显著。由表 1 可知,NaCl 处理能明显推迟大豆种子的萌发,表明盐胁迫对种子萌发造成的阻碍可能在种子吸胀并萌发的初期就开始,并在种子萌发的过程中破坏细

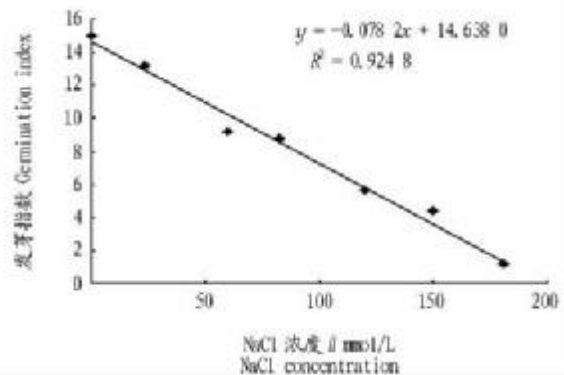


图 2 NaCl 浓度与种子发芽指数之间的相关性

Fig. 2 Correlation between the NaCl concentration and the seed germination index

2.2 NaCl 胁迫对大豆淀粉酶活性的影响

2.2.1 不同处理对酶液吸光度的影响。不同处理酶液的吸光度如表 2 所示。

表 2 不同时间和处理的酶液吸光度

Table 2 Absorbency of enzyme solution at different time under different treatments

浓度//mmol/L Concentration	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
0	0.735	0.765	0.796	0.773	0.756
0.3	0.694	0.739	0.768	0.745	0.724
0.6	0.677	0.694	0.726	0.703	0.688
0.9	0.659	0.662	0.682	0.668	0.654
1.2	0.635	0.643	0.651	0.649	0.640
1.5	0.623	0.638	0.642	0.635	0.625

2.2.2 不同处理对酶液 α-淀粉酶活力的影响。不同处理大

豆 α -淀粉酶活力如图 3 所示。

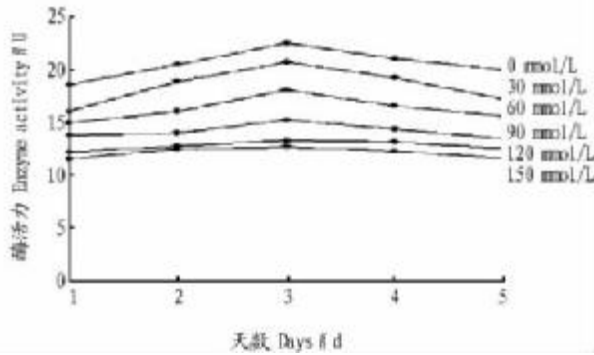


图 3 发芽黄豆在不同浓度、不同时间下 α -淀粉酶的活力

Fig. 3 Activity of α -amylase extracted from germinated soybean under different concentrations at different time

由图 3 可知,正常条件下(对照组),大豆 α -淀粉酶的活力前 3 天逐渐上升,发芽第 3 天酶活力最高。但在随后的几天里,酶活力不太稳定,酶活力下降。在其他盐胁迫条件下,对于同等浓度来说, α -淀粉酶活力随发芽天数的变化情况和对照组基本相同,但在同一时间内,随着盐浓度的不断提高, α -淀粉酶的活力呈下降的趋势比较明显。

3 小结

有研究表明,NaCl 胁迫下,种子萌发过程中水分的吸收

受到抑制,并且在种子萌发的第 3 个阶段吸水受到的抑制作用尤为严重。而种子萌发的第 3 个阶段迅速吸水的原因是种子内贮藏的有机物大规模的水解为渗透性很强的小分子物质。在 NaCl 胁迫下,种子萌发过程中吸水受阻,将会进一步抑制细胞内正常的代谢活动。如物质的运输、酶的活化等。该试验中,过高的盐浓度,如当种子处在 120、150 mmol/L NaCl 的盐溶液中时,淀粉酶的活性一直较低,变化很平缓。

综上所述,随 NaCl 浓度的增加,其抑制种子萌发、幼苗生长以及 α -淀粉酶活力的程度也逐渐增加,最根本原因可能是种子渗透吸水被抑制,进而抑制酶的活性。

参考文献

- [1] REN H, THOMPSON J F, MADISON J T. Biochemical and physiological studies of soybean α -amylase [J]. *Phytochemistry Oxford*, 1993, 33 (3): 541-548.
- [2] 张秀芳, 吴桂霞, 钱华萍. 白豆中 α -淀粉酶提取条件的研究 [J]. *陕西科技大学学报*, 2006 (2): 79-81.
- [3] 靳利娥, 董文琳. 发芽黄豆 β -淀粉酶的提取研究 [J]. *太原理工大学学报*, 2004, 5 (3): 338-340.
- [4] FOOLAD M R, LIN G Y. Relationships of cold and salt-tolerance during seed germination in tomato: Germplasm evaluation [J]. *Plant Breeding*, 1999, 118: 45-48.
- [5] 斯琴巴特尔, 吴红英. 盐胁迫对玉米种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. *干旱区资源与环境*, 2000, 14 (4): 76-80.
- [6] 杨秀玲, 郁继华, 李雅佳, 等. NaCl 胁迫对黄瓜种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2004, 39 (1): 6-9.

(上接第 473 页)

15 min 故蒸馏时间选择 25~30 min 为宜。在 30~60 min 范围内,蒸馏时间越短,SO₂ 含量越大(图 3)。

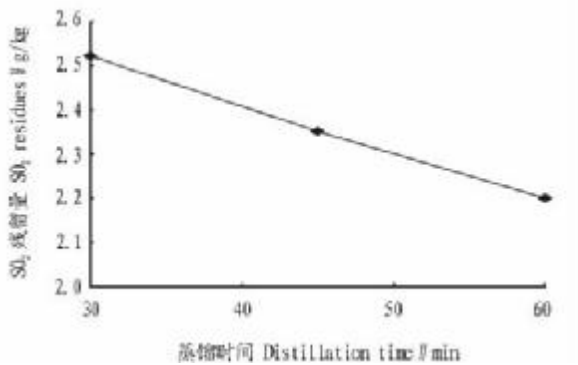


图 3 蒸馏时间对 SO₂ 残留量的影响

Fig. 3 Effects of distillation time on SO₂ residues

2.3.3 蒸馏温度的影响。试验结果表明,第一滴馏出液流出时蒸馏温度在 90℃ 左右,整个蒸馏过程温度保持在 90~100℃ 较好。

3 结论与讨论

从试验结果得出,盐酸副玫瑰苯胺法的测定结果整体比常量蒸馏微量滴定法的结果偏大些,但相差不是太大。使用 2 种测定方法结果都表明,3 种不同产地的魔芋精粉中 SO₂ 残留量呈如下趋势:云南健晶白芋 > 四川宜宾白芋 > 四川宜

宾花芋。按照国家标准(GB/T5009.34-2003)相比较这 3 种魔芋精粉试样中 SO₂ 含量均较高。盐酸副玫瑰苯胺法试验操作比较繁琐,耗时较多,而且使用了甲醛和四氯汞钠,对环境有一定的污染。用常量蒸馏微量滴定法,减少了试剂用量,成本较低,缩短了测定时间,其中使用乙醇作为溶剂,降低了加热时的起泡现象。试验结果表明,这 2 种测定方法不存在显著性差异($P > 0.05$)。目前,魔芋的种植产业在我国有很大的发展前景,魔芋精粉的应用也越来越广泛,如何降低加工过程中产生的 SO₂ 残留量,使产品更加绿色化,是值得整个行业重视的。

参考文献

- [1] 张盛林, 牛义, 刘佩瑛. 中国魔芋粉市场回顾与展望 [J]. *中国食品添加剂*, 2006 (3): 78-81.
- [2] 方竞, 沈月新. 魔芋精粉的研究进展及其在食品工业中的应用 [J]. *食品研究与开发*, 2003 (1): 30-32.
- [3] 贾莉薇. SO₂ 在魔芋片干制中的作用及其含量测定方法的比较 [J]. *贵州环保科技*, 2003 (2): 11-14.
- [4] 王成云, 李英. 魔芋精粉中 SO₂ 的测定 [J]. *辽宁化工*, 2004, 33 (4): 239-242.
- [5] 凌关庭, 王亦芸, 唐述潮. 食品添加剂手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1989.
- [6] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 食品中亚硫酸盐的测定 GB/T 5009.34-2003 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003: 269-273.
- [7] 陈浩, 郭付俊, 孙海峰, 等. 微量滴定法测定魔芋精粉中 SO₂ 的研究 [J]. *食品科学*, 2005, 26 (1): 198-200.
- [8] 喻利娟, 金明, 史玉坤. 无汞吸收盐酸副玫瑰苯胺比色法测定食品中的 SO₂ 的含量 [J]. *交通医学*, 2002 (5): 482.