

白菜种子萌发的热抑制现象及其与细胞壁降解酶的关系

宋顺华¹, 宋松泉^{2,*}, 吴 萍¹, 孟淑春¹, 邢宝田¹

(¹北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 农业部都市农业(北方)重点实验室, 北京 100097; ²中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘 要: 为了探讨白菜种子萌发热抑制的机制, 以新收获的白菜种子为材料, 研究了种子萌发对不同温度的响应, 后熟、冷层积和植物激素处理对种子萌发的作用, 以及种子萌发和不同处理与细胞壁降解酶之间的关系。结果表明, 当萌发温度 $\geq 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 种子的萌发率显著降低, 热抑制的种子不表现次生休眠。后熟、层积和 GA_3 处理能有效地降低种子萌发的热抑制; 相反, ABA 处理则增强种子萌发的热抑制。种子萌发过程中内切- β -甘露聚糖酶、 β -甘露糖苷酶和 α -半乳糖苷酶的活性增加。与新收获的种子相比, 后熟、层积和 GA_3 处理增加上述 3 种酶的活性; ABA 处理增加内切- β -甘露聚糖酶的活性, 但不影响 β -甘露糖苷酶和 α -半乳糖苷酶的活性。在不同温度下吸胀 48 h 的种子的内切- β -甘露聚糖酶和 α -半乳糖苷酶的活性变化与随后种子的萌发没有直接关系。说明新收获的白菜种子具有明显的萌发热抑制, 这种特性能被后熟、层积和 GA_3 处理以增强细胞壁降解酶活性的方式有效地解除。

关键词: 白菜; 种子; 萌发热抑制; 植物激素; 后熟; 层积; 细胞壁降解酶

中图分类号: S 634.3

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 06-1115-10

Thermoinhibition of *Brassica rapa* ssp. *chinensis* Seed Germination in Relation to Degrading Enzymes of Cell Walls

SONG Shun-hua¹, SONG Song-quan^{2,*}, WU Ping¹, MENG Shu-chun¹, and XING Bao-tian¹

(¹Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China) and Urban Agriculture (North), Ministry of Agriculture, Beijing 100097, China; ²Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: In order to study mechanism of seed germination thermoinhibition, the mature *Brassica rapa* ssp. *chinensis* seeds were used to investigate the response of seed germination to different temperatures, the effect of after-ripening, cold stratification and phytohormones to seed germination, and the relationship between seed germination and different treatments and degrading enzymes of cell walls. The results showed that seed germination was significantly decreased at $\geq 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and in darkness, but the thermoinhibited seeds did not exhibit secondary dormancy. After-ripening, stratification and GA_3 treatment effectively decreased thermoinhibition of seed germination, in contrast ABA treatment notably

收稿日期: 2014-02-18; 修回日期: 2014-05-16

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAC01B05, 2011BAD35B07); 北京市科技计划项目 (D101105046510091)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: sqsong@ibcas.ac.cn; Tel: 010-62836484)

increased thermoinhibition. Activities of endo- β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase increased during seed germination. Compared with freshly-collected seeds, treatments of after-ripening, stratification and GA₃ increased the activities of above three enzymes, ABA treatment increased endo- β -mannanase activity and did not alter β -mannosidase and α -galactosidase activities. There was no direct correlation between seed germination and change in endo- β -mannanase and α -galactosidase activities of seeds imbibed at different temperatures for 48 h. The results indicated that freshly-collected *B. rapa* seeds had a typical germination thermoinhibition, which can be broken by after-ripening, stratification and GA₃ treatments in an increasing the degrading enzyme activity of cell walls.

Key words: *Brassica rapa* ssp. *chinensis*; seed; germination thermoinhibition; phytohormone; after-ripening; stratification; degrading enzyme of cell walls

种子的休眠和萌发是植物生活周期和繁殖的重要阶段 (Donohue et al., 2010), 是由遗传因子以及环境信号 (包括温度、水分和光照等) 决定的 (Bewley et al., 2013)。在所有的环境信号中, 温度是最重要的信号之一, 它能提供季节和局部微环境的信息, 种子能感受低温、高温和变温并产生反应 (Graeber et al., 2012; Huo et al., 2013)。在作物生产中, 种子萌发对温度的敏感性限制了作物的种植日期和生长季节, 从而直接影响作物的产量 (Barnabás et al., 2008; Varshney et al., 2011)。种子萌发被高温抑制 [热休眠 (thermodormancy) 或者热抑制 (thermoinhibition)] 是许多冬性一年生或者二年生物种的普遍现象, 能防止种子在水分不充足的夏季萌发 (Allen et al., 2007)。但是, 种子萌发热抑制的机制还不清楚。

莴苣种子萌发的热抑制与 ABA 生物合成和信号转导的基因 (例如 *NCED4* 和 *ABI5* 的上调) 有关 (Argyris et al., 2008; Huo et al., 2013)。莴苣种子萌发对外源 ABA 的敏感性随着温度的上升而增加, ABA 生物合成抑制剂氟啶酮 (fluridone) 和 GA 的共同应用能减轻种子萌发的热抑制 (Gonai et al., 2004; Argyris et al., 2008; Dong et al., 2012), ABA 8'-羟化酶 (ABA 降解酶) 抑制剂烯唑醇 (diniconazole) 和 GA 生物合成抑制剂多效唑 (paclobutrazol) 则增强种子萌发的热抑制, 氟啶酮在降低种子萌发热抑制中的作用被多效唑拮抗 (Dong et al., 2012)。拟南芥种子的低温层积能上调 GA 生物合成酶 (例如 GA₃ 氧化酶) 和下调 GA 降解酶 (例如 GA₂ 氧化酶), 从而增加 GA 含量, 促进种子萌发 (Yamauchi et al., 2004; Rieu et al., 2008)。低温诱导 ABA 8'-羟化酶的表达, 降低 ABA 含量 (Penfield & Hall, 2009); 相反, 高温上调 ABA 生物合成酶 (9-顺式-环氧类胡萝卜素加二氧酶, *NCED9*) 的表达, 导致拟南芥种子萌发的热抑制 (Toh et al., 2008)。然而, ABA 和 GA 调节种子萌发热抑制的方式还不清楚。

已知后熟和冷层积能解除种子的休眠 (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Li et al., 2009; Deng et al., 2010), 但需要研究后熟和冷层积能否减轻种子萌发热抑制。此外, 种子发育过程中的环境信号, 特别是温度和光照也影响萌发与休眠。在较低温度或者在远红光下成熟的莴苣种子获得最高发芽率时的温度比在温暖温度或者在红光下发育的莴苣种子要低 (Gray et al., 1988; Contreras et al., 2009)。同样, 在较低温度下发育和成熟的拟南芥种子表现出较强的休眠, 而在较高温度下发育和成熟的种子表现出较弱的休眠 (Donohue et al., 2005; Cheng et al., 2009)。

成熟种子中, 特别是其胚乳细胞壁中富含甘露聚糖的多聚物, 这些多聚物对种子萌发时的胚根伸出具有强的机械阻力 (Iglesias-Fernández et al., 2011)。已经发现, 细胞壁的酶促或者物理方法处理能够降低胚周围组织 (例如珠孔端胚乳) 的机械阻力, 促进胚根伸出 (Pinto et al., 2007; Nonogaki et al., 2010; Morris et al., 2011)。有报道在番茄 (Nonogaki et al., 2000; Mo & Bewley, 2003) 和拟南芥 (Iglesias-Fernández et al., 2011) 种子的萌发过程中, 内切- β -甘露聚糖酶的活性增加。细

胞壁降解酶与种子萌发热抑制的关系尚需证实。

白菜 (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) 种子普遍存在休眠现象, 因休眠影响当年及时播种造成延迟上市。赵妯云等 (2006) 研究了不同贮藏温度对白菜种子休眠的影响, 发现 25 °C 下贮藏有利于打破种子休眠, 4 °C 条件下贮藏的种子再给予 1 h 的 45 °C 高温能显著提高随后的种子萌发率, 但种子休眠解除与萌发的机理仍然不清楚。试验中以新收获的白菜种子为材料, 研究了种子萌发对不同温度的响应, 后熟、冷层积和植物激素对种子萌发的作用, 以及种子萌发和不同处理与细胞壁降解酶之间的关系; 试图为进一步理解种子萌发热抑制的机理, 有效地降低种子萌发热抑制, 为白菜种子繁育基地的选择和种子的适时销售提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为 2013 年 5 月底收获的‘奶白 3 号’白菜 (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* ‘Naibai 3’) 种子, 由北京蔬菜研究中心大白菜育种课题组提供。新收获的种子发芽率为 3%, 处于休眠状态。

1.2 种子萌发试验和恢复试验

将 50 粒种子均匀地播种在垫有两层滤纸的 9 cm 的培养皿中, 加入 6 mL 蒸馏水, 在种子上再覆盖两层滤纸, 用封口膜将培养皿封好, 分别放在 5、10、15、20、25、30、35 和 40 °C 下萌发 7 d。4 次重复。

将在 25、30、35 和 40 °C 下吸胀 3 d 的种子分别转入 15 °C 和 20 °C 下继续吸胀 7 d, 测定种子高温处理后的恢复萌发率。4 次重复。

以胚根突破种皮 2 mm 作为种子萌发的标准。

1.3 种子后熟和层积处理

将种子装入纸袋后, 在 (25 ± 2) °C 条件下进行干藏 (后熟); 将种子放在垫有两层湿润滤纸的培养皿中, 放在 4 °C 的条件下 (低温层积)。分别取处理不同时间的种子在 20 °C 和黑暗条件下进行萌发。萌发试验为 50 粒种子, 4 次重复。

1.4 GA₃、多效唑和 ABA 对种子萌发的作用

将 50 粒新收获的种子播种于培养皿中, 分别加入 6 mL 不同浓度的 GA₃; 将 50 粒完全后熟的种子播种于培养皿中, 分别加入 6 mL 不同浓度的多效唑 (paclobutrazol) 或 ABA 溶液, 然后放置在 20 °C 黑暗条件下萌发 7 d。4 次重复。

1.5 内切-β-甘露聚糖酶、β-甘露糖苷酶和 α-半乳糖苷酶活性的测定

每 20 粒种子加入 200 μL 0.1 mol · L⁻¹ Hepes-NaOH 缓冲液 (pH 8.0), 在冰上迅速研磨成匀浆, 倒入 1.5 mL 离心管中, 于 4 °C、13 000 × g 下离心 10 min, 取上清液测定内切-β-甘露聚糖酶的活性 (Downie et al., 1994)。

每 20 粒种子加入 200 μL 0.1 mol · L⁻¹ Hepes-NaOH 缓冲液 (含有 0.5 mol · L⁻¹ NaCl, pH 8.0), 在冰上迅速研磨成匀浆, 倒入 1.5 mL 离心管中, 在 4 °C、13 000 × g 下离心 15 min, 取上清液测定 β-甘露糖苷酶的活性 (Mo & Bewley, 2003)。

每 20 粒种子加入 200 μL 0.1 mol · L⁻¹ Hepes-NaOH (pH 8.0) 和 12 μL 聚乙烯亚胺, 其它步骤同

β -甘露聚糖酶的提取。取上清液测定 α -半乳糖苷酶的活性 (Feurtdo et al., 2001)。

1.6 统计分析

利用单向方差分析模型(one-way ANOVA model)分析数据, 利用 SNK (Student-Newman-Keuls, $P = 0.05$) 检验平均数差异的显著性 (SPSS Inc. 2008)。

2 结果与分析

2.1 种子萌发对温度的响应

新收获的白菜种子在 10 °C 和 15 °C 条件下的萌发率分别为 96.5% 和 86%; 当温度 ≥ 20 °C 时, 种子的萌发率明显降低, 均低于 10% (图 1)。将在 25、30、35 和 40 °C 下萌发 3 d 的种子分别转移到 15 °C 或者 20 °C 下继续萌发 7 d, 结果发现这些种子能在 15 °C 下恢复萌发, 其萌发率与初始的萌发温度有关。例如, 当初始萌发温度为 30 °C 时, 恢复萌发后的种子萌发率为 72%; 初始萌发温度为 40 °C 时, 恢复萌发后的种子萌发率为 21.5% (图 2, A)。同时也观察到, 在 25、30、35 和 40 °C 下萌发 3 d 的种子转移到 20 °C 下几乎不能恢复萌发 (图 2, B)。

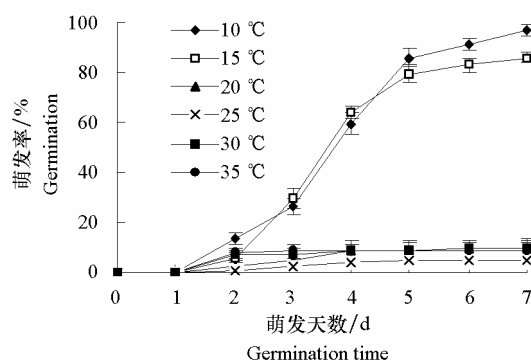


图 1 白菜种子萌发的热抑制

Fig. 1 The thermoinhibition of *Brassica rapa* ssp. *chinensis* seed germination

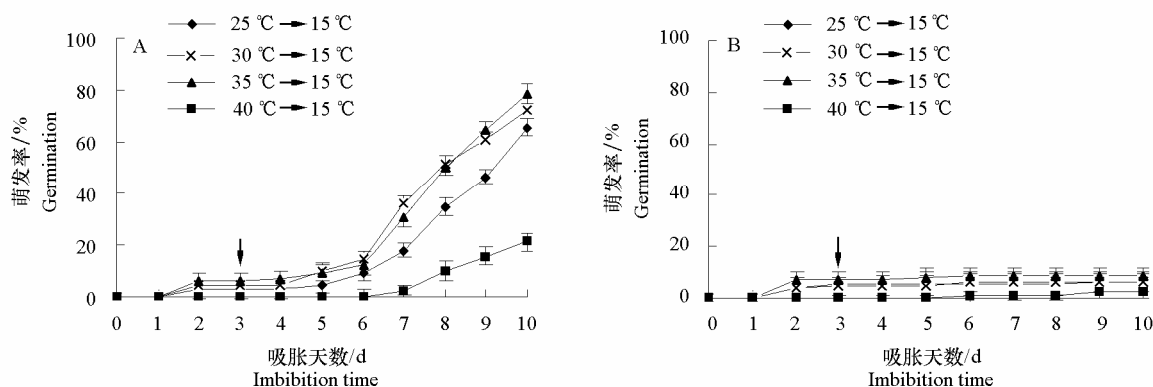


图 2 白菜种子萌发的恢复试验

箭头表示恢复萌发温度的开始时间。

Fig. 2 The recovery test of *Brassica rapa* ssp. *chinensis* seed germination

Arrows indicate the start time of recovering seed germination.

2.2 后熟和层积降低白菜种子萌发的热抑制

在 20 °C 黑暗条件下, 白菜种子的萌发率为 9.5%; 经后熟 (25 °C 干藏) 处理的种子随着后熟时间的延长, 种子的萌发率和萌发速率显著增加。例如, 后熟 21 d 种子的萌发率达 96%, 当后熟时

间超过 21 d 时, 种子的萌发率不再增加。

4 °C 层积也能迅速降低白菜种子萌发的热抑制。例如, 层积 6 h 时, 种子的萌发率达 50%; 随着层积时间的延长, 种子的萌发率进一步增加; 当层积 6 d 后, 种子萌发的热抑制被完全解除, 萌发率达 98%。

新收获的白菜种子的萌发温度范围较窄, 经后熟和层积处理的种子的萌发温度范围明显变宽。新收获的种子仅仅在 10 °C 和 15 °C 下的萌发率较高, 在其他温度下种子的萌发率都低于 10% (图 1); 但种子经后熟和层积处理后, 甚至在 35 °C 的条件下萌发率也接近 60% (图 3, A)。与新收获的种子比较, 经后熟和层积处理的种子的萌发率和萌发速率也显著增加。例如, 在 15 °C 下, 新收获种子萌发 50% 所需要的时间大约为 3.7 d (图 1), 而后熟 21 d 和层积 6 d 的种子萌发 50% 所需要的时间分别为 1.5 d 和 0.6 d (图 3)。

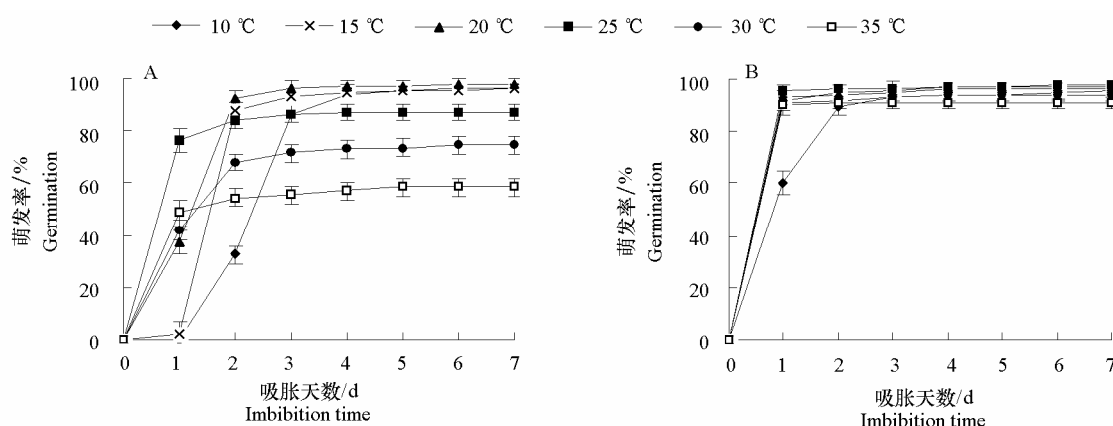


图 3 不同温度对后熟 (A, 25 °C, 21 d) 和冷层积 (B, 4 °C, 6 d) 的白菜种子萌发的影响

Fig. 3 Effects of different temperatures on germination of *Brassica rapa ssp. chinensis* seeds after-ripened (A, 25 °C, 21 d) and stratified (B, 4 °C, 6 d)

2.3 GA₃、多效唑和 ABA 对种子萌发的作用

如图 4 所示, 50 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ 处理可显著降低 20 °C 对新鲜种子萌发的热抑制, 而当 GA₃ 的浓度为 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 种子的萌发被明显地抑制 (萌发率为 2%)。

多效唑是 GA 生物合成途径中的内根—贝壳杉烯氧化酶 (ent-kaurene oxidase) 的抑制剂, 用不同浓度的多效唑处理完全后熟的白菜种子, 10 ~ 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度处理明显地抑制后熟白菜种子的萌发率 (图 5, A)。

ABA 对后熟种子萌发的抑制作用与浓度有关, 1 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理的种子萌发与对照无显著差异; $\geq 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 显著抑制种子的萌发率; 当 ABA 的浓度 $\geq 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 种子的萌发率为 0 (图 5, B)。

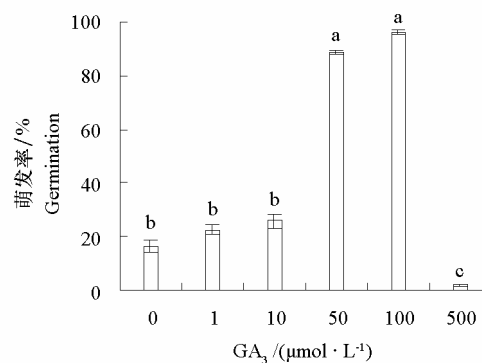


图 4 GA₃ 在 20 °C 条件下对白菜种子萌发的作用

Fig. 4 Effects of phytohormone GA₃ on germination of *Brassica rapa ssp. chinensis* seeds at 20 °C

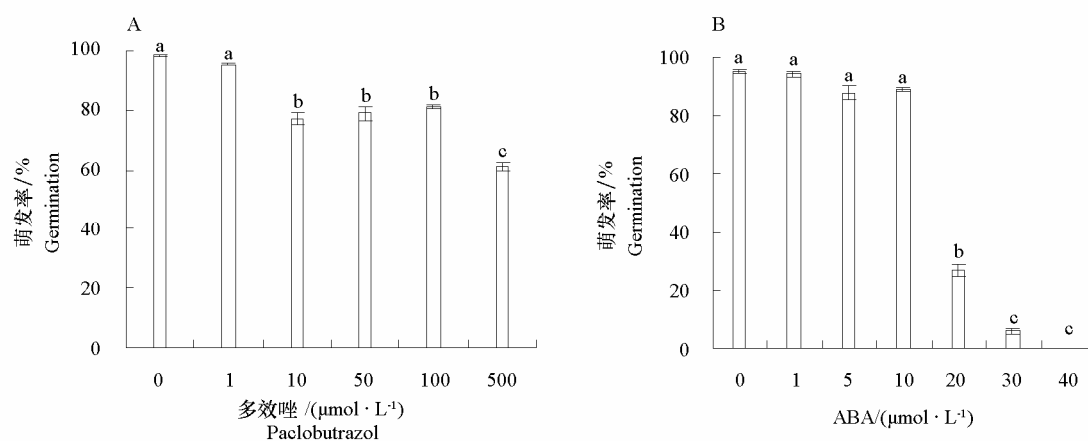


图5 多效唑 (A) 和 ABA (B) 在 20 °C 条件下对白菜种子萌发的作用

Fig. 5 Effects of paclobutrazol (A) and ABA (B) on germination of *Brassica rapa* ssp. *chinensis* seeds at 20 °C

2.4 种子萌发抑制与细胞壁降解酶的关系

2.4.1 吸胀过程中

由图 6 可见, 在新收获的干种子 (吸胀 0 h 的种子) 中几乎检测不到内切- β -甘露聚糖酶的活性, 在 15 °C 下随着种子的吸水, 内切- β -甘露聚糖酶的活性在 12 h 时迅速增加, 48 h 时活性达到最高, 72 h 时活性有所下降, 但仍为吸胀 24 h 时的 3.9 倍; α -半乳糖苷酶的活性在吸胀 0~24 h 就有较高水平, 24 h 和 48 h 明显增加, 72 h 时有所降低; β -甘露糖苷酶的活性在吸胀 12 h 后增加, 随后保持较高的活性。

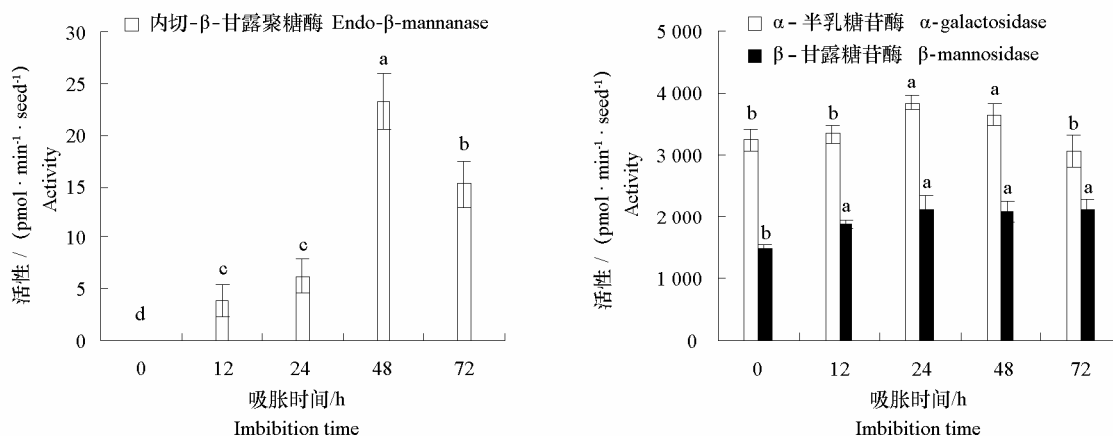


图6 白菜种子在 15 °C 下的吸胀过程中内切- β -甘露聚糖酶、 β -甘露糖苷酶和 α -半乳糖苷酶活性的变化

Fig. 6 Changes in activity of endo- β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase during imbibition of *Brassica rapa* ssp. *chinensis* seeds at 15 °C

为了检测种子中内切- β -甘露聚糖酶、 β -甘露糖苷酶和 α -半乳糖苷酶活性对不同萌发温度的响应, 将新收获的种子置于不同的温度下吸胀 48 h 后, 测定酶活性的变化。结果发现, 内切- β -甘露聚糖酶的活性在 5 °C 吸胀的种子中检测不到, 但在 10~35 °C 吸胀的种子中的活性增加; β -甘露糖苷酶的活性不随温度而变化; α -半乳糖苷酶活性在 5~20 °C 变化不明显, 在 25 °C 时增加, 在 35 °C 时下降 (图 7)。

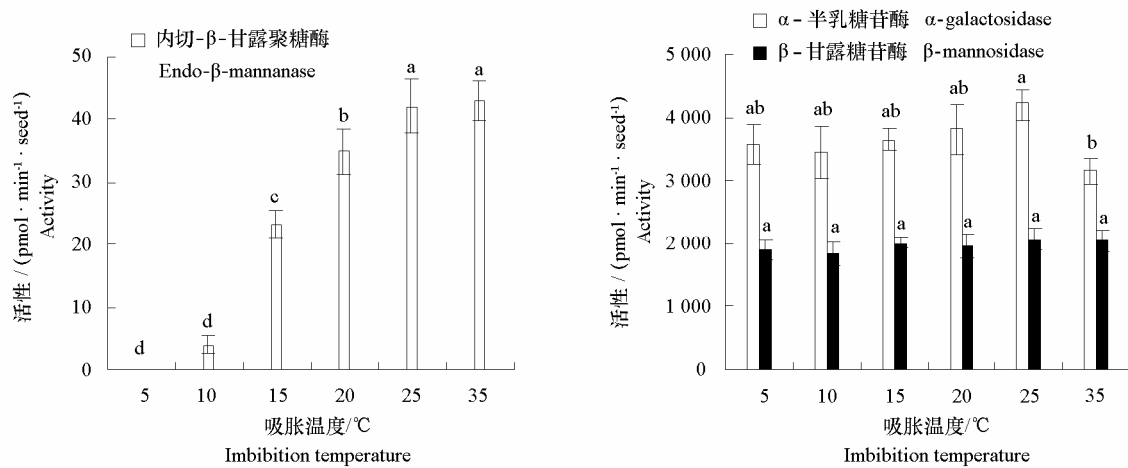


图7 不同温度下吸胀 48 h 对白菜种子中内切-β-甘露聚糖酶、β-甘露糖苷酶和 α-半乳糖苷酶活性的影响

Fig. 7 Effect of different imbibition temperatures for 48 h on activity of endo-β-mannanase, β-mannosidase and α-galactosidase of *Brassica rapa* ssp. *chinensis* seeds

2.4.2 后熟、层积和激素处理后

后熟、层积和 GA₃ 处理显著降低白菜种子萌发的热抑制，ABA 处理抑制后熟白菜种子的萌发。为了测定这些处理对内切-β-甘露聚糖酶、α-半乳糖苷酶和 β-甘露糖苷酶活性的影响，将新收获的种子分别在 25 °C 后熟 21 d、4 °C 层积 5 d 和 100 μmol · L⁻¹ GA₃ 处理 60 h，或者后熟 21 d 的种子经 35 μmol · L⁻¹ ABA 处理 72 h，然后测定酶活性。与新收获的种子比较，后熟、层积和 GA₃ 处理显著地增加内切-β-甘露聚糖酶、β-甘露糖苷酶和 α-半乳糖苷酶的活性，但 GA₃ 处理增加内切-β-甘露聚糖酶和 β-甘露糖苷酶活性的作用明显大于后熟和层积处理；ABA 处理增加内切-β-甘露聚糖酶的活性，对 β-甘露糖苷酶和 α-半乳糖苷酶的活性没有影响（图 8）。

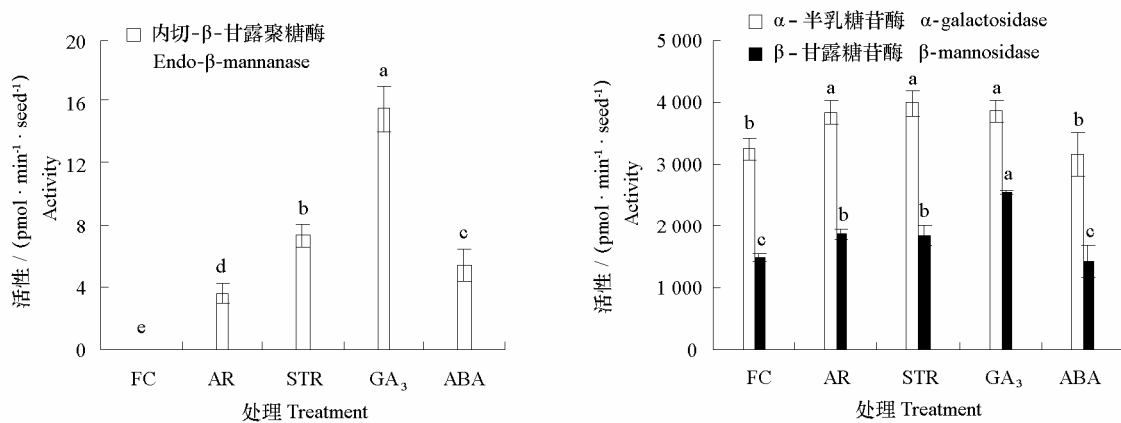


图8 后熟 (AR)、层积 (STR)、GA₃ 和 ABA 处理对白菜种子中内切-β-甘露聚糖酶、β-甘露糖苷酶和 α-半乳糖苷酶活性的影响

FC: 新鲜收获的种子。

Fig. 8 Effect of after-ripening, stratification, GA₃ and ABA on activity of endo-β-mannanase, β-mannosidase and α-galactosidase of *Brassica rapa* ssp. *chinensis* seeds

FC: Freshly-collected seed.

3 讨论

赵岫云等(2006)发现新收获的白菜种子在 25 °C 下的萌发率为 35%，并提出白菜种子具有休眠现象。本试验结果表明，新收获的白菜种子具有典型的萌发热抑制现象。与莴苣(Gonai et al., 2004; Argyris et al., 2008; Deng & Song, 2012; Dong et al., 2012)和拟南芥(Toh et al., 2008)种子萌发的热抑制类似。25 ~ 40 °C 对种子萌发的抑制作用能够在恢复到 15 °C 时有效解除，表明热抑制的白菜种子不发生次生休眠。因此，白菜种子在 25 °C 下的休眠实际上是“热休眠(thermodormancy)”或者“热抑制(thermoinhibition)”。

后熟和层积能有效地解除种子休眠(Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Li et al., 2009; Deng et al., 2010)。随着后熟和层积时间的延长，白菜种子在 20 °C 下的萌发率显著增加；后熟 21 d 或者冷层积 6 d 的种子都能完全解除热抑制，表明后熟和层积能有效地减轻白菜种子萌发的热抑制，层积比后熟更有效。种子经后熟和层积处理后，萌发的温度范围明显变宽，在 10 ~ 35 °C 下都可以萌发，甚至在 35 °C 的条件下萌发率也接近 60%。

Dong 等(2012)发现，莴苣种子萌发的热抑制明显地被 GA 减轻，被多效唑增加；不管在光照和黑暗下，外源 ABA 都增加莴苣种子萌发的热抑制，当 ABA 的浓度 $\geq 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，种子的萌发率为零。本研究结果表明，50 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ 处理显著降低白菜种子萌发的热抑制，10 ~ 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 多效唑明显地抑制后熟白菜种子的萌发率；ABA 的浓度 $\geq 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时显著抑制白菜种子的萌发率，当 ABA 的浓度 $\geq 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时萌发被完全抑制。这些结果与 Dong 等(2012)的结果类似，表明白菜种子萌发的热抑制被 GA 和 ABA 调节。

已经证明，胚乳细胞壁中的半乳甘露聚糖对种子萌发时的胚根伸出具有强的机械阻力(Bewley, 1997; Nonogaki et al., 2010; Iglesias-Fernández et al., 2011)。半乳甘露聚糖的降解需要内切- β -甘露聚糖酶、 α -半乳糖苷酶和 β -甘露糖苷酶的共同作用(Ren et al., 2008; Bewley et al., 2013)。Reid 等(1973)报道，很多植物的干种子和吸胀种子中这 3 种酶都具有活性。内切- β -甘露聚糖酶是一种内水解酶，水解甘露糖的多聚物成为甘露二糖或者甘露三糖。 α -半乳糖苷酶是一种外多糖酶(exopolysaccharidase)，水解半乳糖侧链和甘露糖骨架之间的 α -(1→6) 连接。 β -甘露糖苷酶水解甘露二糖和甘露三糖成为甘露糖，也起一种外切-甘露多糖酶(exo-mannopolysaccharidase)的作用，从寡聚甘露糖链上水解单个甘露糖残基。在这 3 种酶中，内切- β -甘露聚糖酶较为关键(Feurtdo et al., 2001)。内切- β -甘露聚糖酶的活性在新收获的干种子中几乎检测不到，在种子萌发过程中迅速增加，种子在 15 °C 下吸水 48 h 时达到最高，但此时的种子萌发率为 6%。这些结果表明，内切- β -甘露聚糖酶活性是在白菜种子吸水后被诱导的。本研究中也发现 β -甘露糖苷酶和 α -半乳糖苷酶在新收获的干种子中活性较高，随着种子吸水这两种酶的活性进一步增加，但 β -甘露糖苷酶活性增加的时间比 α -半乳糖苷酶早。这些结果表明，这 3 种酶的活性与种子萌发密切相关，与任艳芳等(2007)在萌发后的水稻种子中的研究结果类似。

将新收获的白菜种子置于不同的温度下吸胀 48 h，随温度的上升，内切- β -甘露聚糖酶的活性增加；不同温度对 β -甘露糖苷酶和 α -半乳糖苷酶活性的影响不明显，而且与随后的种子萌发没有直接的关系。这些结果表明，种子萌发热抑制的机理是复杂的，除了通过细胞壁降解酶起作用外，还有其他原因，需要进一步的研究。

与新收获的种子比较，在 25 °C 后熟 21 d 或者 4 °C 层积 5 d 以及 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ 处理 60 h，显著增加了内切- β -甘露聚糖酶、 β -甘露糖苷酶和 α -半乳糖苷酶的活性。表明后熟和层积能有效地降低种子萌发的热抑制，而且这种作用与这 3 种细胞壁降解酶活性的增加有关。35 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

ABA 处理对 β -甘露糖苷酶和 α -半乳糖苷酶的活性没有影响(图 6); 与新收获的种子比较, ABA 增加内切- β -甘露聚糖酶的活性, 这些结果与任艳芳等(2007)的研究结果类似。

Finkelstein 等(2008)提出, 尽管种子生物学的研究已经取得了很大的进展, 但种子休眠仍然被描述为理解最少的现象之一, 而且还存在一些混乱。随着分子生物学和组学技术的不断发展, 可以预期种子休眠/萌发组学(dormomics/germinomics)技术的应用, 将有助于探明种子萌发热抑制的机理。

References

- Allen P S, Benech-Arnold R L, Batlla D, Bradford K J. 2007. Modeling of seed dormancy//Bradford K J, Nonogaki H. Seed development, dormancy and germination. Oxford, UK: Blackwell Publishing: 72 - 112.
- Argyris J, Dahal P, Hayashi E, Still D W, Bradford K J. 2008. Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with temperature-sensitive expression of abscisic acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes. *Plant Physiology*, 148: 926 - 947.
- Barnabás B, Jäger K, Fehér A. 2008. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell and Environment*, 31: 11 - 38.
- Bewley J D. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9: 1055 - 1066.
- Bewley J D, Bradford K J, Hilhorst H W M, Nonogaki H. 2013. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. 3rd ed. New York: Springer.
- Cheng W H, Chiang M H, Hwang S G, Lin P C. 2009. Antagonism between abscisic acid and ethylene in *Arabidopsis* acts in parallel with the reciprocal regulation of their metabolism and signaling pathways. *Plant Molecular Biology*, 71: 61 - 80.
- Contreras S, Bennett M A, Metzger J D, Tay D, Nerson H. 2009. Red to far-red ratio during seed development affects lettuce seed germinability and longevity. *HortScience*, 44: 130 - 134.
- Deng Z J, Cheng H Y, Song S Q. 2010. Effects of temperature, scarification, dry storage, stratification, phytohormone and light on dormancy-breaking and germination of *Cotinus coggygia* var. *cinerea* (Anacardiaceae) seeds. *Seed Science & Technology*, 38: 572 - 584.
- Deng Z J, Song S Q. 2012. Sodium nitroprusside, ferricyanide, nitrite and nitrate decrease the thermo-dormancy of lettuce seed germination in a nitric oxide-dependent manner in light. *South African Journal of Botany*, 78: 139 - 146.
- Dong T T, Tong J H, Xiao L T, Cheng H Y, Song S Q. 2012. Nitrate, abscisic acid and gibberellin interactions on the thermoinhibition of lettuce seed germination. *Plant Growth Regulation*, 66: 191 - 202.
- Donohue K, Dorn L, Griffith C, Kim E, Aguilera A, Polisetty C R, Schmitt J. 2005. Environmental and genetic influences on the germination of *Arabidopsis thaliana* in the field. *Evolution*, 59: 740 - 757.
- Donohue K, Rubio de Casas R, Burghardt L, Kovach K, Willis C G. 2010. Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 41: 293 - 319.
- Downie B, Hilhorst H W M, Bewley J D. 1994. A new assay for quantifying endo- β -D-mannanase activity using Congo Red dye. *Phytochemistry*, 36: 829 - 835.
- Feurtdo J A, Banik M, Bewley J D. 2001. The cloning and characterization of α -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1239 - 1249.
- Finch-Savage W E, Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171: 501 - 523.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 387 - 415.
- Gonai T, Kawahara S, Tougou M, Satoh S, Hashiba T, Hirai N, Kawaide H, Kamiya Y, Yoshioka T. 2004. Abscisic acid in the thermoinhibition of lettuce seed germination and enhancement of its catabolism by gibberellin. *Journal of Experimental Botany*, 55: 111 - 118.
- Graeber K, Nakabayashi K, Miatton E, Leubner-Metzger G, Soppe W J J. 2012. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell and Environment*, 35: 1769 - 1786.
- Gray D, Wurr D C E, Ward J A, Fellows J R. 1988. Influence of post-flowering temperature on seed development, and subsequent performance of crisp lettuce. *Annals of Applied Biology*, 113: 391 - 402.

- Huo H, Dahal P, Kunusoth K, McCallum C M, Bradford K J. 2013. Expression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase is essential for thermoinhibition of lettuce seed germination but not for seed development or stress tolerance. *The Plant Cell*, 25: 884 – 900.
- Iglesias-Fernández R, Rodríguez-Gacio M C, Barrero-Sicilia C, Carbonero P, Matilla A. 2011. Three endo- β -mannanase genes expressed in the micropylar endosperm and in the radicle influence germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Planta*, 233: 25 – 36.
- Li Y J, Cheng H Y, Song S Q. 2009. Effects of temperature, after-ripening, stratification, and scarification plus hormone treatments on dormancy release and germination of *Acer truncatum* seeds. *Seed Science & Technology*, 37: 554 – 562.
- Mo B, Bewley J D. 2003. The relationship between β -mannosidase and endo- β -mannanase activities in tomato seeds during and following germination: A comparison of seed populations and individual seeds. *Journal of Experimental Botany*, 54: 2503 – 2510.
- Morris K, Linkies A, Müller K, Oracz K, Wang X, Lynn J R, Leubner-Metzger G, Finch-Savage W E. 2011. Regulation of seed germination in the close *Arabidopsis* relative *Lepidium sativum*: A global tissue-specific transcript analysis. *Plant Physiology*, 155: 1851 – 1870.
- Nonogaki H, Bassel G W, Bewley J D. 2010. Germination-still a mystery. *Plant Science*, 179: 574 – 581.
- Nonogaki H, Gee O H, Bradford K J. 2000. A germination-specific endo- β -mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiology*, 123: 1235 – 1246.
- Penfield S, Hall A. 2009. A role for multiple circadian clock genes in the response to signals that break seed dormancy in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21: 1722 – 1732.
- Pinto L V A, Da Silva E A A, Davide A C, De Jesus V A M, Toorop P E, Hilhorst H W M. 2007. Mechanism and control of *Solanum lycocarpum* seed germination. *Annals of Botany*, 100: 1175 – 1187.
- Ren Y F, Bewley J D, Wang X F. 2008. Protein and gene expression patterns of endo- β -mannanase following germination of rice. *Seed Science Research*, 18: 139 – 149.
- Ren Yan-fang, He Jun-yu, Wang Xiao-feng. 2007. Changes in activities of three enzymes degrading galactomannan during and following rice seed germination. *Chinese Journal of Rice Science*, 21: 275 – 280. (in Chinese)
- 任艳芳, 何俊瑜, 王晓峰. 2007. 水稻种子萌发过程中半乳甘露聚糖的三个酶活性的动态变化. *中国水稻科学*, 21: 275 – 280.
- Rieu I, Eriksson S, Powers S J, Gong F, Griffiths J, Woolley L, Benlloch R, Nilsson O, Thomas S G, Hedden P, Phillips A L. 2008. Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20: 2420 – 2436.
- Toh S, Imamura A, Watanabe A, Nakabayashi K, Okamoto M, Jikumaru Y, Hanada A, Aso Y, Ishiyama K, Tamura N, Iuchi S, Kobayashi M, Yamaguchi S, Kamiya Y, Nambara E, Kawakami N. 2008. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology*, 146: 1368 – 1385.
- Varshney R K, Bansal K C, Aggarwal P K, Datta S K, Craufurd P Q. 2011. Agricultural biotechnology for crop improvement in a variable climate: Hope or hype? *Trends in Plant Science*, 16: 363 – 371.
- Yamauchi Y, Ogawa M, Kuwahara A, Hanada A, Kamiya Y, Yamaguchi S. 2004. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *The Plant Cell*, 16: 367 – 378.
- Zhao Xiu-yun, Xu Jia-bing, Zhang Feng-lan, Yu Yang-jun, Zhang De-shuang. 2006. Research on influence factor of *Brassica campestris* seeds dormancy. *Liaoning Agricultural Science*, (3): 71 – 72. (in Chinese)
- 赵妯云, 徐家炳, 张凤兰, 余阳俊, 张德双. 2006. 小白菜种子休眠影响因素的研究. *辽宁农业科学*, (3): 71 – 72.