

不同含水量和包装方式杂交水稻种子贮藏后生理生化及ABA和GA₃相关基因表达的变化

林程, 沈杭琪, 关亚静, 安建宇, 胡伟民, 胡晋*

浙江大学农业与生物技术学院种子科学中心, 杭州310029

摘要: 选用‘Y两优689’杂交水稻种子为材料, 将11.0%、13.0%和14.5%含水量的种子采用纸袋和密封袋包装于室温和5°C下贮藏12个月, 测定贮藏后种子活力、生活力、酶活性、赤霉素(GA₃)和脱落酸(ABA)含量及其代谢基因表达量变化。发现不同含水量种子采用不同包装于5°C贮藏12个月后种子活力、生活力显著高于室温贮藏。室温下贮藏, 11.0%含水量种子活力和生活力显著高于13.0%, 13.0%显著高于14.5%, 但均显著低于贮藏前; 13.0%和14.5%含水量种子纸袋包装贮藏的活力和生活力显著高于密封袋, 而11.0%含水量密封袋包装贮藏种子的活力和生活力显著高于纸袋。5°C下, 不同含水量种子采用不同包装方式贮藏后发芽率仍保持在80.0%以上, 最高可达94.0%, 保持较高的活力和生活力。种子贮藏后 α -淀粉酶、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和超氧化歧化酶(SOD)活性变化与种子活力变化整体一致, 种子活力越低, α -淀粉酶、POD、CAT、APX和SOD活性也相对较低, 能反应出种子质量高低。贮藏后种子活力越低的种子ABA含量越高, 而GA₃含量越低, ABA和GA₃比值越高种子发芽能力越弱。进一步对GA₃和ABA合成和代谢基因的研究发现, 杂交水稻种子贮藏12个月后, 种子活力越高, ABA合成基因*OsABAox2*和分解基因*OsNCED2*相对表达量都较低, 相应的其ABA含量也较低, 而GA₃合成基因*OsGA20ox1*相对表达量较高, 分解基因表达量*OsGA2ox5*相对较低, 相应GA₃含量较高。因此高活力种子在萌发过程中有较多的GA₃积累, ABA含量较少, 促进了种子萌发。

关键词: 杂交水稻; 种子活力; 贮藏; 生理生化; 基因表达

杂交水稻是我国主要粮食作物之一, 常年种植面积约为1 500万公顷, 约占水稻面积的58%, 年增产量约240万吨, 每年可多养活8 000万人口, 对解决中国粮食需求问题起了重要作用(袁隆平2016)。但由于杂交水稻种子本身的生长习性和生产销售的复杂性与难预测性, 往往会对收获后种子进行贮藏。种子贮藏是种子工作中的一个重要环节, 是保证种子质量、搞好种子生产营销的重要措施。对种子进行科学、安全地贮藏, 能使种子在较长时间内保持活力, 减少种子的损失, 是农业丰收的保证。如果贮藏不当, 就会使种子失去种用价值, 给农业生产和种子经营带来不可弥补的损失(胡晋2001)。而杂交水稻种子与常规水稻种子相比, 对于贮藏条件的要求, 以及在贮藏期间所发生的生理生化变化有所不同。虽然对于杂交水稻种子的贮藏性及贮藏过程中生理生化变化已有报道, 但对其贮藏后内源激素及其相关基因表达情况变化鲜有研究。本研究旨在探索种子采用不同贮藏条件贮藏后种子活力、生活力、酶活性、内源激素及其代谢途径中相关基因表达变化情况, 以期对杂交水稻种子的安全贮藏提供理论依据。

材料与方法

1 试验材料

杂交水稻(*Oryza sativa* L.)粳型品种‘Y两优689’F₁代种子, 由浙江农科种业有限公司提供。

2 试验方法

2.1 种子贮藏

种子经清选后, 用晾晒和喷雾回潮的方法, 将种子含水量调成11.0%、13.0%和14.5%, 分别装于牛皮纸袋(文中简称纸袋)和加厚PE-PA材质包装袋(采用密封机封口)(文中简称密封袋), 每袋约装0.5 kg。于2015年1月初将种子置于室温(2~35°C)和5°C冷柜中贮藏, 贮藏12个月后取样测定各项指标。

2.2 种子发芽指标测定

选用12 cm×12 cm发芽盒, 盒底铺3层水润湿滤纸, 每盒放入50粒种子, 3次重复。在30°C光照8

收稿 2017-02-13 修定 2017-04-13

资助 国家公益性行业(农业)科研专项(201203052)、浙江省科技厅项目(2013C02005和2013C32023)、浙江省自然科学基金项目(LZ14C130002和LY15C130002)和江苏省现代作物生产协同创新中心(JCIC-MCP)项目。

* 通讯作者(E-mail: jhu@zju.edu.cn)。

h和20°C黑暗16 h的发芽箱内发芽, 每天记录发芽种子数, 5 d计算发芽势, 14 d计算发芽率。

$$\text{发芽指数(GI)} = \sum(G_i/T_i)$$

$$\text{活力指数(VI)} = \text{GI} \times S$$

公式中: G_i 为逐日发芽种子数, T_i 为与 G_i 相对应的发芽时间(d), S 为10株正常幼苗的干重(g)。

2.3 幼苗苗高、根长和干重测定

种子发芽14 d时, 每盒随机取10株幼苗, 测量根长、苗高。每盒随机取10株正常幼苗置于牛皮纸袋中105°C杀青10 min, 80°C烘干24 h测重量, 即为幼苗干重 $[\text{g} \cdot (10\text{株})^{-1}]$ 。

2.4 种子酶活性测定

称取0.2 g吸胀48 h水稻种子参照李合生(2000)的3,5-二硝基水杨酸法进行 α -淀粉酶活性测定。称取0.5 g吸胀48 h水稻种子进行过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定, POD活性测定参考Guan等(2009)的愈创木酚法, CAT活性测定参考Rao等(1996)的过氧化氢法, APX活性测定参考Wang等(2013)的抗坏血酸法, SOD活性测定参考Qiu等(2005)的氮蓝四唑反应法。

2.5 种子激素含量测定

种子激素含量测定参考秦国臣(2013)方法。称取1 g吸胀48 h水稻种子去颖壳, 加液氮研成粉

末, 加入6 mL的冷乙腈, 密封放入4°C冰箱浸提24 h, 10 000 \times g低温4°C离心10 min, 取上清液, 再向残渣中加入4 mL冷乙腈, 低温超声振荡1 h, 10 000 \times g离心10 min, 取上清液, 重复提取2次, 合并3次上清液, 在35°C下用氮气吹干, 加入3 mL 0.1 mol \cdot L⁻¹ pH 8.0的磷酸缓冲溶液, 放入-80°C超低温冰箱中冰冻30 min, 在4°C条件下解冻, 在4°C以10 000 \times g离心15 min, 过滤弃去杂质, 用0.5 mol \cdot L⁻¹盐酸调节pH至3.0~3.5, 再用等体积的乙酸乙酯萃取3次, 合并酯相, 在35°C条件下氮气吹干, 用流动相定容至1 mL, 溶液经0.45 μm 的微孔滤膜过滤后用高效液相色谱仪测定(型号2487, Waters)。

2.6 基因相对表达量测定

取100 mg水稻种子采用GK类RNA提取试剂盒(Waryong, Beijing)提取RNA, 利用NanoDrop 1000分光光度计检验RNA浓度和纯度后, 添加RNase free H₂O调节浓度至200 ng \cdot mL⁻¹, 然后将所提RNA反转录为cDNA, 以 β -*OsActin*作为内参基因, 进行qRT-PCR反应, 检测*OsABA8ox2*、*OsNCED2*、*OsGA20ox1*、*OsGA2ox5*基因的相对表达量。所用引物均采用Primer 5软件设计(引物序列见表1), 反应体系如下: 5 \times SYBR Green Mix 10 μL , 特异性正向引物和反向引物各1 μL , cDNA模板2 μL , 补水至2 μL , PCR反应条件为: 95°C预变性30 s; 95°C变性5 s, 60°C退火20 s, 72°C延伸30 s, 进行40个循环。

表1 实时荧光定量PCR反应所用的引物序列

Table 1 The primer pairs of genes for quantitative RT-PCR

基因名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
<i>β-OsActin</i>	CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA	CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA
<i>OsABA8ox2</i>	CTACTGCTGATGGTGGCTGA	CCCATGGCCTTTGCTTTAT
<i>OsNCED2</i>	CCGTCACCGAGAAGACTATGCC	TGCAGGAGCCGATGACCA
<i>OsGA20ox1</i>	CTCCAGTTGTTGCTGTCACCTCG	TCCTTGAGCTTCCTGCATATCGTC
<i>OsGA2ox5</i>	CTCCTACCACACGCTCATCA	CCTGACGTCCTCCATGATCT

3 数据统计分析

试验所得百分率数据先进行反正弦转换, 结果用SAS软件进行方差分析和多重比较(LSD, $\alpha=0.05$)

实验结果

1 不同含水量和包装方式杂交水稻种子贮藏后发芽变化

11.0%、13.0%和14.5%含水量种子采用纸袋

和密封袋包装5°C下贮藏12个月后发芽势、发芽率、发芽指数和活力指数显著高于室温(表2)。

室温下, 3种含水量种子采用两种不同包装方式贮藏后种子发芽势、发芽率、发芽指数和活力指数均显著低于贮藏前; 相同包装3种含水量间, 14.5%含水量贮藏种子的发芽率、发芽指数和活力指数显著低于13.0%, 13.0%显著低于11.0%, 且密封袋包装的14.5%含水量贮藏种子已丧失发芽

表2 不同含水量和包装方式‘Y两优689’种子贮藏后发芽变化

Table 2 Changes of seed germination in ‘Y Liangyou 689’ seeds with different moisture contents and packing methods after storage

包装方式	贮藏温度/°C	种子含水量/%	发芽势/%	发芽率/%	发芽指数	活力指数
贮藏前			88.7 ^{ab}	92.7 ^a	16.73 ^a	1.68 ^a
纸袋	室温	11.0	76.7 ^e	81.3 ^d	11.68 ^e	0.94 ^e
		13.0	54.0 ^f	58.7 ^e	8.23 ^f	0.70 ^f
		14.5	49.3 ^f	51.3 ^f	7.37 ^e	0.55 ^e
	5	11.0	86.7 ^{abc}	88.0 ^b	13.23 ^{cd}	1.27 ^{bc}
		13.0	78.7 ^{de}	82.0 ^{bc}	11.98 ^e	1.09 ^d
		14.5	75.3 ^e	80.0 ^d	11.88 ^e	0.93 ^e
密封袋	室温	11.0	83.3 ^{bcd}	84.7 ^{bcd}	13.04 ^d	1.16 ^{cd}
		13.0	33.3 ^g	39.3 ^g	5.07 ^h	0.40 ^h
		14.5	0 ^h	0 ^h	0 ⁱ	0 ⁱ
	5	11.0	92.7 ^a	94.0 ^a	14.23 ^b	1.34 ^b
		13.0	84.7 ^{bcd}	86.0 ^{bc}	13.81 ^{bc}	1.30 ^b
		14.5	80.7 ^{cde}	81.3 ^d	12.88 ^d	1.18 ^{cd}

不同小写字母表示同一指标不同含水量、包装方式和贮藏温度贮藏的种子间差异显著性($\alpha=0.05$, LSD), 下同。

能力; 相同含水量两种包装间, 11.0%含水量密封袋包装种子发芽势、发芽指数和活力指数显著高于纸袋, 而13.0%和14.5%含水量纸袋包装显著高于密封袋。

不同含水量和包装贮藏种子5°C贮藏发芽率均高于80.0%, 保持着较高的发芽能力。与贮藏前相比, 除了11.0%含水量密封袋包装贮藏种子发芽率外, 其他不同贮藏条件贮藏的种子发芽率、发芽指数和活力指数均显著降低。11.0%含水量种子贮藏后发芽势、发芽率、发芽指数和活力指数显著高于14.5%。3种含水量种子密封袋包装贮藏发芽指数显著高于纸袋, 11.0%含水量种子密封袋

包装贮藏后发芽率显著高于纸袋, 而13.0%和14.5%含水量两包装贮藏种子发芽率无显著差异, 不同包装方式对不同含水量种子5°C下贮藏的发芽势和活力指数无显著影响。

2 不同含水量和包装方式杂交水稻种子贮藏后幼苗生长变化

三种含水量种子采用两种包装方式5°C下贮藏后苗高、根长和幼苗干重显著高于室温(表3)。

室温下, 不同含水量种子采用不同包装方式贮藏12个月后苗高、根长和幼苗干重显著低于贮藏前。两种包装11.0%含水量种子贮藏后苗高、根长和幼苗都显著高于14.5%, 贮藏后种子含水量

表3 不同含水量和包装方式‘Y两优689’种子贮藏后幼苗生长变化

Table 3 Changes of seedlings in ‘Y Liangyou 689’ seeds with different moisture contents and packing methods after storage

包装方式	贮藏温度/°C	种子含水量/%	苗高/cm	根长/cm	幼苗干重/g·(10株) ⁻¹
贮藏前			8.08 ^a	6.24 ^{ab}	0.100 ^a
纸袋	室温	11.0	6.56 ^d	5.43 ^c	0.086 ^{de}
		13.0	5.81 ^{ef}	4.32 ^{ef}	0.071 ^f
		14.5	5.41 ^f	3.98 ^f	0.068 ^f
	5	11.0	7.62 ^b	6.62 ^a	0.096 ^{ab}
		13.0	6.17 ^e	6.08 ^{bc}	0.091 ^{bcd}
		14.5	6.47 ^e	5.97 ^{bc}	0.082 ^e
密封袋	室温	11.0	6.95 ^c	4.63 ^{de}	0.089 ^{cd}
		13.0	6.32 ^e	4.87 ^{ef}	0.069 ^f
		14.5	0 ^g	0 ^g	0 ^g
	5	11.0	7.70 ^b	5.10 ^{cd}	0.097 ^{ab}
		13.0	6.95 ^c	5.48 ^c	0.094 ^b
		14.5	6.93 ^c	5.44 ^c	0.088 ^{cde}

越高,活力越低,幼苗生长情况越差。11.0%和13.0%含水量种子密封袋包装苗高显著高于纸袋,幼苗干重两包装无显著差异。

在5°C下贮藏,13.0%和14.5%含水量种子纸袋和密封袋包装贮藏后苗高、根长和幼苗干重显著低于贮藏前。两种包装11.0%含水量种子贮藏后苗高和幼苗干重显著高于14.5%,根长无显著差异。11.0%和13.0%含水量种子纸袋包装贮藏根长显著高于密封袋,而14.5%含水量密封袋包装根长

和幼苗干重均显著高于纸袋。

3 不同含水量和包装方式杂交水稻种子贮藏后 α -淀粉酶活性变化

种子贮藏12个月后 α -淀粉酶显著低于贮藏前(图1)。两个贮藏温度间,5°C贮藏的种子 α -淀粉酶活性显著高于室温。两种包装方式下13.0%和14.5%含水量种子贮藏后 α -淀粉酶活性无显著差异,但显著低于11.0%含水量。种子采用纸袋和密封袋贮藏后种子 α -淀粉酶活性无显著差异。

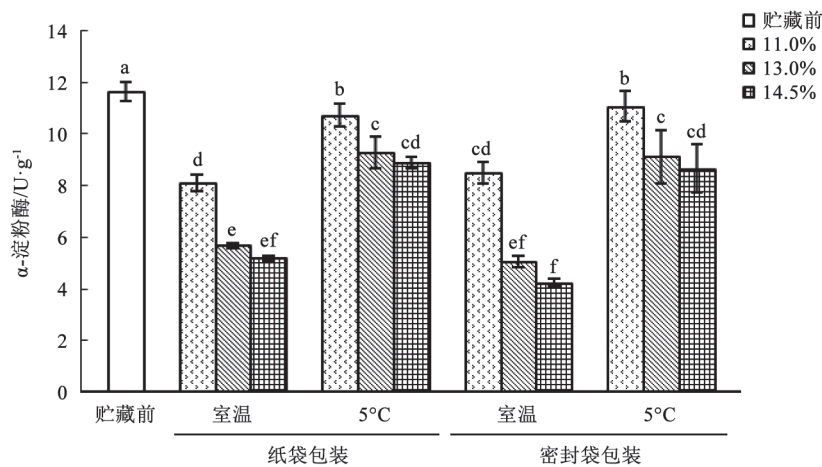


图1 不同含水量和包装方式‘Y两优689’种贮藏后 α -淀粉酶活性的变化

Fig.1 Changes of α -amylase activity in ‘Y Liangyou 689’ seeds with different moisture contents and packing methods after storage

4 不同含水量和包装方式杂交水稻种子贮藏后抗氧化酶活性变化

杂交水稻种子贮藏后过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和超氧化物歧化酶(SOD)活性与贮藏前相比均显著降低(图2)。三种含水量种子采用两种不同包装方式于5°C贮藏后POD、APX活性显著高于室温,而CAT和SOD活性,13.0%和14.5%含水量5°C贮藏显著高于室温。

室温贮藏,种子POD、CAT、APX和SOD酶活性均表现为11.0%含水量显著高于13.0%,13.0%含水量显著高于14.5%。包装方式对4种抗氧化酶活性带来的影响与种子含水量相关,11.0%含水量纸袋和密封袋包装无显著差异,13.0%和14.5%含水量纸袋包装显著高于密封袋。

在5°C贮藏,纸袋包装种子的POD和SOD活性,11.0%含水量显著高于13.0%,13.0%含水量显著高

于14.5%(图2-A和D),11.0%和13.0%含水量种子的CAT活性无显著差异,但显著高于14.5%(图2-B),而APX活性在13.0%和14.5%含水量种子间无显著差异,但显著低于11.0%(图2-C)。密封袋包装含水量为11.0%和13.0%的种子POD和SOD活性无显著差异,但显著高于14.5%;而APX活性11.0%显著高于13.0%和14.5%;CAT活性3种含水量间无显著差异。11.0%含水量密封袋包装贮藏种子APX活性显著高于纸袋,SOD活性纸袋高于密封袋,POD和CAT活性两种包装无显著差异;13.0%含水量密封袋包装贮藏种子POD活性显著高于纸袋,SOD活性纸袋显著高于密封袋,CAT和APX活性两种包装无显著差异;14.5%含水量纸袋POD和SOD活性显著高于密封袋,而CAT和SOD活性两包装间无显著差异。

5 不同含水量和包装方式杂交水稻种子贮藏后赤霉素、脱落酸含量及其比值变化

纸袋和密封袋包装11.0%含水量的种子在5°C

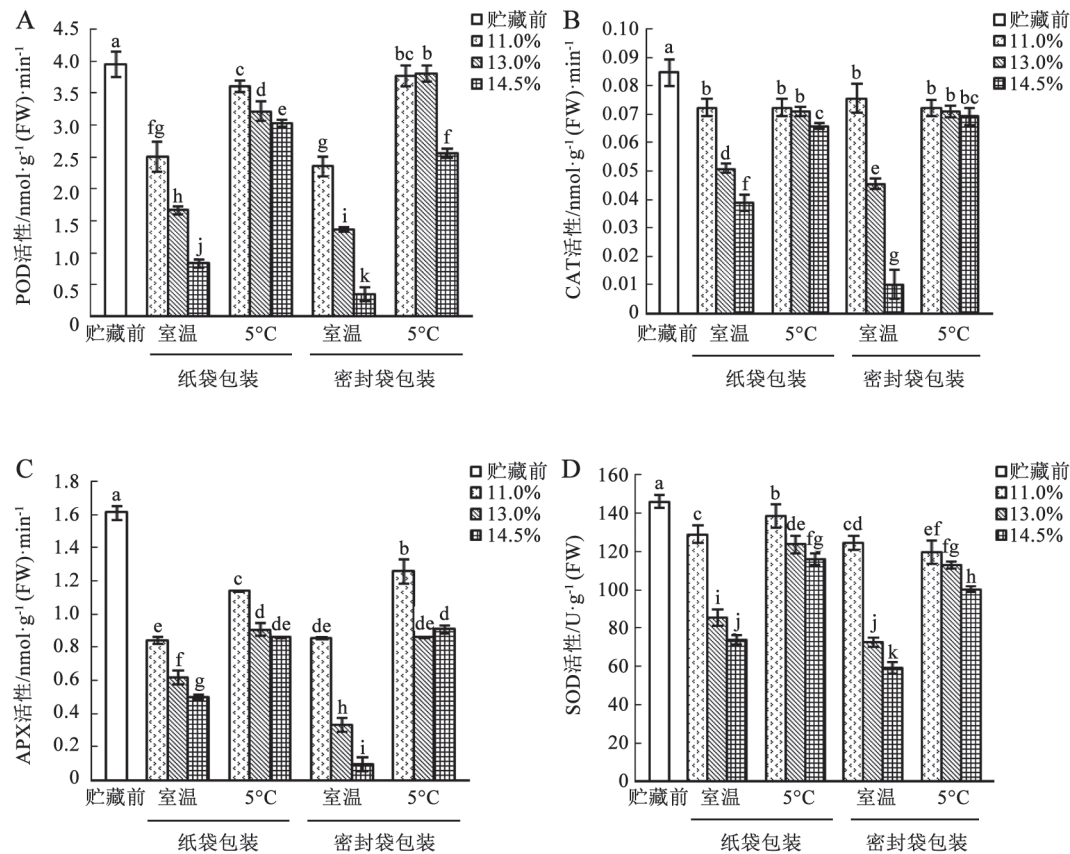


图2 不同含水量和包装方式‘Y两优689’种子贮藏后POD、CAT、APX、SOD活性变化

Fig.2 Changes of POD, CAT, APX, SOD activity in ‘Y Liangyou 689’ seeds with different moisture contents and packing methods after storage

和室温贮藏后脱落酸ABA含量和ABA/GA₃比值无显著差异, 13.0%和14.5%含水量种子室温贮藏显著高于5°C (图3-A和C), 而赤霉素(GA₃)含量两种包装13.0%和14.5%含水量室温显著低于5°C (图3-B)。

室温下贮藏, 13.0%和14.5%含水量种子ABA含量和ABA/GA₃比值显著高于11.0%, 而GA₃含量却显著低于11.0% (图3)。11.0%含水量纸袋和密封袋包装种子ABA含量和ABA/GA₃比值无显著差异, 而GA₃含量密封袋显著高于纸袋; 13.0%和14.5%含水量密封袋包装贮藏种子ABA/GA₃比值显著高于纸袋, 包装方式对种子贮藏后ABA和GA₃含量变化无显著影响。

在5°C下贮藏, 不同包装方式和种子含水量贮藏后的种子ABA、GA₃含量和ABA/GA₃比值无显著差异。

6 不同含水量和包装方式杂交水稻种子贮藏后ABA和GA₃相关代谢基因的变化

两种包装11.0%含水量5°C和室温贮藏种子

ABA分解基因*OsABA8ox2*和合成基因*OsNCED2*相对表达量无显著差异, 而13.0%和14.5%含水量的种子上述基因的表达量室温显著高于5°C (图4-A和B)。

室温贮藏后13.0%和14.5%含水量种子*OsABA8ox2*和*OsNCED2*相对表达量显著高于11.0%。14.5%含水量密封袋包装贮藏种子*OsABA8ox2*和*OsNCED2*基因表达量分别是11.0%含水量的6倍和10倍左右, 而合成基因*OsNCED2*表达量是分解基因*OsABA8ox2*的3倍左右。两种包装方式11.0%含水量种子贮藏后*OsABA8ox2*和*OsNCED2*相对表达量无显著差异, 而13.0%和14.5%含水量种子密封袋贮藏后上述基因的相对表达量显著高于纸袋(图4-A和B)。

在5°C贮藏后纸袋包装11.0%含水量种子*OsABA8ox2*和*OsNCED2*相对表达量显著低于14.5%, 密封袋包装3种含水量贮藏种子2个基因相对表达

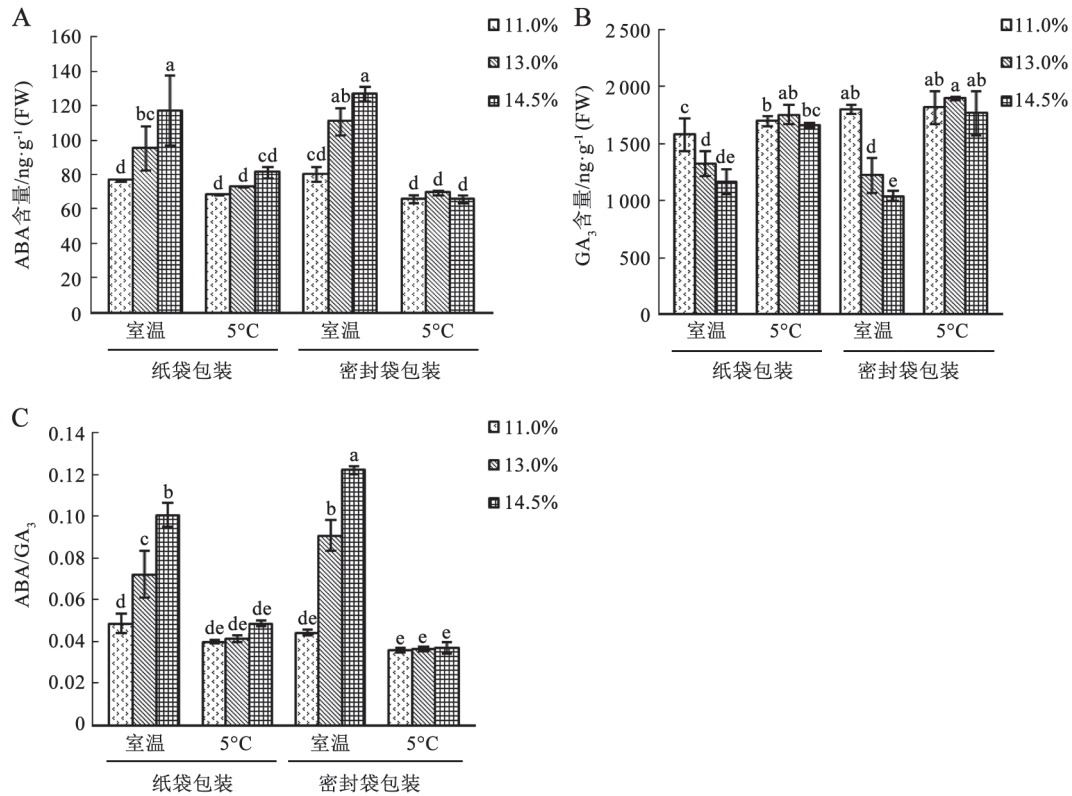


图3 不同含水量和包装方式‘Y两优689’种子贮藏后ABA、GA₃含量和ABA/GA₃比值变化

Fig.3 Changes of ABA, GA₃ contents and ABA/GA₃ in ‘Y Liangyou 689’ seeds with different moisture contents and packing methods after storage

量无差异。11.0%含水量两种包装贮藏种子*OsABA8ox2*和*OsNCED2*相对表达量无显著差异；13.0%含水量两种包装*OsABA8ox2*表达量无显著差异，而*OsNCED2*相对表达量密封袋显著高于纸袋；14.5%含水量上述基因表达量纸袋显著高于密封袋(图4-A和B)。

纸袋包装3种含水量和密封袋11.0%含水量室温下贮藏的种子GA₃分解基因*OsGA2ox5*相对表达量显著高于5°C(图4-C)，合成基因*OsGA2ox1*表达量低于5°C(图4-D)，密封袋包装13.0%和14.5%含水量种子室温和5°C贮藏后*OsGA2ox5*相对表达量无显著差异，而*OsGA2ox1*表达量5°C显著高于室温。

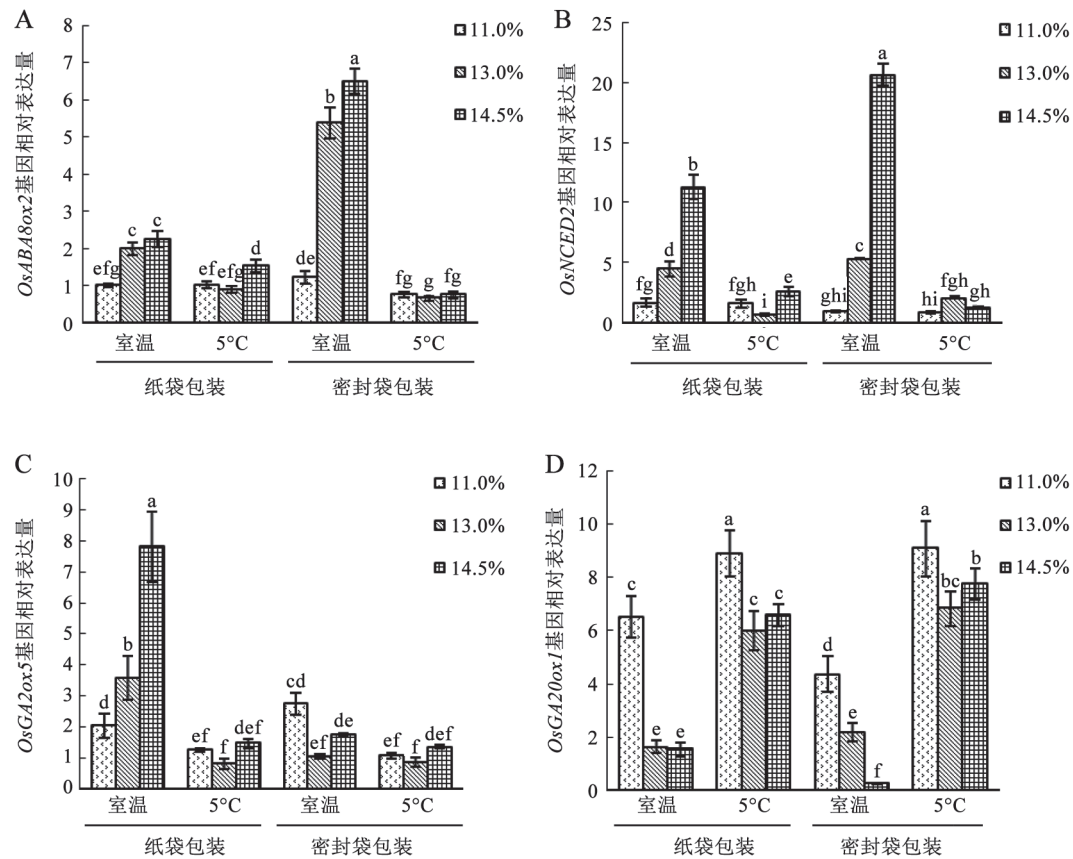
室温下13.0%和14.5%含水量纸袋包装贮藏后*OsGA2ox5*相对表达量显著高于11.0%，而*OsGA2ox1*正好相反，显著低于11.0%。密封袋包装13.0%和14.5%含水量*OsGA2ox5*和*OsGA2ox1*相对表达量均显著低于11.0%，且密封袋包装14.5%含水量贮藏种子*OsGA2ox1*相对表达量几乎为零。13.0%和14.5%含水量纸袋包装贮藏种子*OsGA2ox5*

相对表达量显著高于密封袋；两种包装贮藏种子*OsGA2ox1*相对表达量11.0%和14.5%纸袋显著高于密封袋(图4-C和D)。

在5°C下3种不同含水量种子贮藏后*OsGA2ox5*相对表达量均无显著差异，而*OsGA2ox1*相对表达量11.0%含水量显著高于13.0%和14.5%。两种包装贮藏种子*OsGA2ox5*相对表达量无显著差异，而11.0%和13.0%含水量两种包装*OsGA2ox1*相对表达量无显著差异，14.5%含水量密封袋包装显著高于纸袋(图4-C和D)。

讨 论

种子贮藏过程是一个自然老化过程，这一过程与种子自身及贮藏环境密不可分，其中，影响种子贮藏寿命的一个关键因素是种子含水量。研究发现，种子的变质程度与种子含水量呈正相关，种子含水量越高，随着贮藏时间的延长和贮藏条件的改变，种子活力下降越快(王齐天2014)。在本研究中发现，不同含水量‘Y两优689’杂交水稻种子采

图4 不同含水量和包装方式‘Y两优689’种子贮藏后ABA、GA₃合成和分解基因变化Fig. 4 Changes of the expression of ABA and GA₃ biosynthesis, catabolism genes in ‘Y Liangyou 689’ seeds with different moisture contents and packing methods after storage

用不同包装材料在室温下贮藏12个月, 种子活力和生活力与贮藏前相比显著降低, 3种含水量间, 11.0%含水量的种子活力和生活力要显著高于13.0%和14.5%, 如11.0%含水量贮藏种子发芽率在80.0%以上, 而13.0%和14.5%的发芽率降低至60.0%以下, 其中密封袋包装14.5%含水量种子几乎没有发芽能力(表2)。因此种子入库前要干燥至安全含水量才能贮藏, 本文所研究的‘Y两优689’种子室温贮藏12个月安全贮藏含水量应控制在11.0%。

贮藏温度是影响种子贮藏寿命的另一关键因素, 贮藏温度在一定范围内, 温度每上升5°C, 种子寿命就将减少一半(胡晋2014)。陈淑清和赵秋霞(1987)研究发现, 在20°C条件下稻谷贮藏10个月后, 种子发芽率从90.0%降到80.0%; 而在低温条件下, 稻谷贮藏13个月, 种子发芽率从90.0%降至80.0%。本研究发现, 室温下‘Y两优689’种子贮藏

12个月后, 种子发芽率显著低于5°C下贮藏, 如纸袋包装13.0%含水量种子室温贮藏12个月后发芽率为58.7%时, 而5°C贮藏的发芽率为82.0%(表2)。

不同包装方式会影响种子贮藏寿命的长短, 本研究发现, 在室温下贮藏12个月‘Y两优689’种子, 11.0%含水量采用密封袋包装贮藏种子的发芽率显著高于纸袋, 而13.0%和14.5%含水量纸袋显著高于密封袋, 原因在于种子处在密闭条件下, 对外界气温、湿度的影响起着一定的隔绝作用, 含水量波动较小, 高含水量种子呼吸作用旺盛, 消耗氧气和贮藏物质, 进入缺氧呼吸, 产生二氧化碳和有毒物质, 降低了种子活力。包装方式的选择在一定程度上取决于种子含水量、贮藏温度和湿度, 如在贮藏温度较低的情况下, 当种子含水量低于整个贮藏环境的湿度时, 用不透气的密封包装进行贮藏的效果较好, 反之, 则选择透气的包装方式更有利于贮藏, 这是因为透气的包装可使种子含

水量下降到与贮藏环境相同的湿度(胡晋2000)。

淀粉是种子的重要贮藏物质,当种子萌发时在淀粉酶的作用下被水解,并运送到胚中,作为幼胚生长的营养物质来源(胡晋2014)。因此,淀粉水解酶活性的高低与种子萌发、种子活力密切相关。有研究表明 α -淀粉酶活性与种子活力呈正相关关系(何俊瑜等2008;张桂莲等2012)。在本研究中发现(图1),室温下贮藏时,‘Y两优689’种子在贮藏12个月后 α -淀粉酶活性与贮藏前相比显著降低,种子含水量越高, α -淀粉酶活性下降越快;但在包装方式上 α -淀粉酶活性变化与种子活力的变化不完全相符,如贮藏12个月后,室温下贮藏14.5%含水量纸袋包装的活力显著高于密封袋,但 α -淀粉酶活性两种包装无显著差异。试验中发现室温贮藏12个月后丧失活力的密封袋包装14.5%含水量‘Y两优689’种子,其 α -淀粉酶活性与未贮藏相比下降了一半,仍具有一定的活性,表明完全丧失种子活力的种子并不意味着其 α -淀粉酶活性也完全丧失。

种子在贮藏老化过程中,种子活力的降低与细胞内抗氧化酶活性变化相关,抗氧化酶活性在种子活力降低的同时也呈现显著降低趋势,与种子活力的相关性达到极显著水平(陈信波和罗泽民1986)。在本研究中发现(图2),‘Y两优689’室温贮藏12个月,种子POD、CAT、APX和SOD活性与贮藏前相比显著降低,且种子含水量越高,贮藏后活力越低,酶活性越低。此外,密封袋包装14.5%含水量的‘Y两优689’种子贮藏12个月后种子活力几乎丧失,其POD、CAT、APX活性也几乎丧失,因此POD、CAT、APX活性的高低在一定程度上与种子活力高低变化相一致,而其SOD活性与未贮藏相比下降了一半,仍具有一定的活性,表明完全丧失种子生活力的种子并不意味着其SOD活性也完全丧失。

ABA和GA₃是调控种子萌发的主要激素,在对ABA的研究中发现,ABA起到抑制提前萌发和诱导种子初生休眠的作用,而GA₃能促进种子萌发(Liu等2014)。在萌发过程中ABA含量不断降低,而GA₃含量会有所增加,而且ABA会抑制种子萌发过程中GA₃的生物合成(Seo等2006)。在本试验的研究中发现(图3),5°C下贮藏种子ABA含量显著低于室温,室温下贮藏种子ABA含量随着种子含水

量提高而增加,包装方式间ABA含量无显著差异,整体上种子活力越低的ABA含量会较高。种子含水量在一定程度上影响种子内GA₃含量,且表现为含水量越高,种子活力越低,GA₃含量越低,但贮藏温度、包装方式对贮藏后种子GA₃含量无显著影响。‘Y两优689’已完全丧失生活力种子的ABA含量显著高于有生活力的种子,但仍具有一定GA₃含量,再结合ABA/GA₃比值的结果,可以看出ABA与GA₃含量的比率与种子发芽能力有关,比率越高,种子发芽能力越低。

在对GA₃和ABA合成和代谢基因的研究中发现(图4),室温下,不同含水量、包装和温度下贮藏12个月‘Y两优689’种子ABA分解基因*OsABAox2*、合成基因*OsNCED2*和GA₃分解基因*OsGA20ox1*相对表达量表现为种子含水量越高,贮藏后种子活力越低,表达量越高,而GA₃合成基因*OsGA20ox5*则表现为种子含水量越高,贮藏种子活力越低,表达量越低,如密封袋包装14.5%的几乎丧失发芽能力的种子ABA合成基因*OsNCED2*表达较高,分解基因*OsABAox2*表达也随之增高,而GA₃分解基因*OsGA20ox5*相对表达量低,但高于合成基因*OsGA20ox1*相对表达量,因此导致ABA含量增多,GA₃含量减少,不利于种子萌发。5°C贮藏的‘Y两优689’活力较高的种子ABA合成基因*OsABAox2*和分解基因*OsNCED2*相对表达量都较低,相应的其ABA含量较低,而GA₃合成基因*OsGA20ox5*相对表达量较高,分解基因*OsGA20ox1*表达量相对较低,相应的GA₃含量较高,因此高活力种子在萌发过程中有较多的GA₃积累,ABA含量较少,促进种子萌发。本文只对4个ABA和GA₃代谢基因进行了研究,而在水稻中,有5个NCED家族基因、3个CYP707A家族基因、4个GA20ox家族基因和5个GA2ox家族基因(Liu等2011),种子贮藏后这些基因的表达情况有待进一步研究。

参考文献

- Chen SQ, Zhao QX (1987). A study on safety storage technology of brown and polished rice. *Grain Storage*, 16 (3): 3-8 (in Chinese with English abstract) [陈淑清, 赵秋霞(1987). 糙米、白米安全储藏技术研究. *粮食储藏*, 16 (3): 3-8]
- Chen XB, Luo ZM (1986). Study on vigor and physiological and biochemical changes of hybrid rice seeds during storage. *Hybrid Rice*, (3): 32-37 (in Chinese) [陈信波, 罗泽民(1986). 杂交水

- 稻种子在贮藏过程中活力及生理生化变化的研究. 杂交水稻, (3): 32–37]
- Guan YJ, Hu J, Wang JC, Shao CX (2009). Seed priming with chitosan improve maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *J Zhejiang Univ Sci B*, 10 (6): 427–433
- He JY, Ren YF, Zhu C, Jiang DA (2008). Effects of cadmium stress on seed germination, seedling growth and amylase activities in rice. *Chin J Rice Sci*, 22 (4): 399–404 (in Chinese with English abstract) [何俊瑜, 任艳芳, 朱诚, 蒋德安(2008). 镉胁迫对不同水稻品种种子萌发、幼苗生长和淀粉酶活性的影响. *中国水稻科学*, 22 (4): 399–404]
- Hu J (2000). *Seed Storage and Processing*. Beijing: China Agriculture University Press, 100–101 (in Chinese) [胡晋(2000). 种子贮藏加工. 北京: 中国农业大学出版社, 100–101]
- Hu J (2001). *Principle and Technique of Seed Storage*. Beijing: China Agriculture University Press, Introduction (in Chinese) [胡晋(2001). 种子贮藏原理与技术. 北京: 中国农业大学出版社, 前言]
- Hu J (2014). *Seed Science*. Beijing: China Agriculture Press, 250–251 (in Chinese) [胡晋(2014). 种子学. 北京: 中国农业出版社, 250–251]
- Li HS (2000). *Principle and Technology of Plant Physiological and Biochemical Experiments*. Beijing: Higher Education Press, 134–160 (in Chinese) [李合生(2000). 植物生理生化试验原理与技术. 北京: 高等教育出版社, 134–160]
- Liu F, Zhang H, Wu G, Sun J, Hao L, Ge X, Yu J, Wang W (2011). Sequence variation and expression analysis of seed dormancy- and germination-associated ABA- and GA-related genes in rice cultivars. *Front Plant Sci*, 2: 17
- Liu Y, Fang J, Xu F, Chu J, Yan C, Schlappi MR, Wang Y, Chu C (2014). Expression patterns of ABA and GA metabolism genes and hormone levels during rice seed development and imbibition: a comparison of dormant and non-dormant rice cultivars. *J Genet Genomics*, 41 (6): 327–338
- Qin GC (2013). Changes of endogens hormone ABA content, antioxidant activities and seed quality during seed development in sponge gourd [Master's thesis]. Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese with English abstract) [秦国臣(2013). 内源激素 ABA 含量、抗氧化物酶活性和种子质量在丝瓜种子发育过程中的变化(硕士论文). 杭州: 浙江大学]
- Qiu J, Wang R, Yan J, Hu J (2005). Seed film coating with uniconazole improves rape seedling growth in relation to physiological changes under water logging stress. *Plant Growth Regul*, 47 (1): 75–81
- Rao MV, Paliyath C, Ormrod DP (1996). Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 110 (1): 125–136
- Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M (2006). Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscise acid metabolism and abscise acid regulation of gibberellins metabolism. *Plant J*, 48: 354–366
- Wang QT (2014). Studies on storability prediction, vigor changes after storage and invigoration in hybrid rice seeds [Master's thesis]. Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese with English abstract) [王齐天(2014). 杂交水稻种子耐藏性预测和贮藏后活力变化及恢复的研究(硕士论文). 杭州: 浙江大学]
- Wang Y, Wen T, Hu J, Han R (2013). Relationship between endogenous salicylic acid and antioxidant enzyme activities in maize seedlings under chilling stress. *Exp Agr*, 49 (2): 295–308
- Yuan LP (2016). Research and development of hybrid rice seed in China. *Sci Technol Rev*, 34 (20): 64–65 (in Chinese) [袁隆平(2016). 中国杂交水稻的研究与发展. *科技导报*, 34 (20): 64–65]
- Zhang GL, Yang DZ, Zhang ST, Chen LY (2012). Effects of different maturity on germination and physiological characteristics of rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *Plant Physiol J*, 48 (3): 272–276 (in Chinese with English abstract) [张桂莲, 杨定照, 张顺堂, 陈立云(2012). 不同成熟度对水稻种子萌发及其生理特性的影响. *植物生理学报*, 48 (3): 272–276]

Changes of physiological, biochemistry and gene expression related to ABA and GA₃ in hybrid rice seeds stored at different moisture contents and packing methods

LIN Cheng, SHEN Hang-Qi, GUAN Ya-Jing, AN Jian-Yu, HU Wei-Min, HU Jin*

Seed Science Center, Institute of Crops Science, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

Abstract: The present study was designed to study the effects of storage conditions on hybrid rice seeds ‘Y Liang-you 689’. The seeds with 11.0%, 13.0% and 14.5% moisture content (MC) were packed by both paper and plastic bags, then stored at room temperature and 5°C, respectively. The changes of seed vigor, viability, enzyme activity, contents of abscisic acid (ABA), gibberellins (GA₃) and their related genes expression were measured after storage 12 months. The seeds stored at 5°C had higher seed vigor and viability than those stored at room temperature under different MCs and packing methods. When storage at room temperature, seeds with 11.0% MC significantly higher than those of 13.0% MC in seed vigor and viability, then 13.0% MC seeds significantly higher than those of 14.5% MC, however, was significantly lower than those of non-storage control. Seeds stored in paper bags recorded higher seed vigor and viability when seed moisture content keep at 13.0% and 14.5% levels than those in plastic bags. On the other hand, seeds stored in plastic bags recorded higher seed vigor and viability when seed moisture content keep at 11.0% level. The seeds kept high seed vigor and viability when storage at 5°C, the germination of the seeds with different seed moisture contents packed by different packing methods kept above 80.0%, the highest germination was about 94.0%. The activities of α -amylase, peroxidase (POD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD) were consistent with vigor index after storage. The lower of seed vigor, the lower of the activities of α -amylase, POD, CAT, APX and SOD. These parameters could reflect the degree of the seed quality. The higher of the seed moisture content, the lower of seed vigor, the higher of the ABA content, while the content of GA₃ was in lower level. In addition, the seeds with higher rate of ABA/GA₃ had lower ability of germination. Further studies showed that the expression of *OsABAox2* related ABA synthesis and *OsNCED2* related ABA resolving was lower in higher vigor seeds after storage in two packing methods and three kinds of MCs, so the content of ABA was in lower level, the expression of related GA₃ *OsGA20ox1* synthesis was higher, the expression of *OsGA2ox5* related GA₃ resolving was lower, so the content of GA₃ was in higher level, therefore there was more GA₃ and less ABA accumulation that promoted the seed germination.

Key words: hybrid rice; seed vigor; storage; physiology and biochemistry; gene expression

Received 2017-02-13 Accepted 2017-04-13

This work was supported by the China Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (Grant No. 201203052), the Project of Science and Technology Department of Zhejiang Province (Grant Nos. 2013C02005 and 2013C32023), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant Nos. LZ14C130002 and LY15C130002), and Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production (JCIC-MCP) Program.

*Corresponding author (E-mail: jhu@zju.edu.cn).