

不同硬实程度的刺槐种子活力差异性研究*

曹帮华¹ 翟明普² 郭俊杰¹

(1. 山东农业大学林学院 泰安 271018; 2. 北京林业大学资源与环境学院 北京 100083)

摘要: 以始温 80 ℃水浸种 1~4 d 吸胀的刺槐种子视为不同硬实程度的种子 T_1 、 T_2 、 T_3 及 T_4 , 与第 4 天仍未吸胀的刺槐硬实种子(记作 T_r) 为试材对其种子活力差异性进行研究。结果表明:随着硬实程度的提高,即 $T_r > T_4 > T_3 > T_2 > T_1$, 种子的发芽势、发芽指数、活力指数、呼吸速率呈上升趋势;而电导率呈下降趋势。通过测定人工逆境(盐胁迫、低温、人工老化)处理种子的 SOD 酶活性和 MDA 含量,发现硬实种子具有较高的抗逆性,且其抗逆性随硬实程度的增高而增强,进一步证实了硬实种子具有较高的活力水平。指出硬实种子在生产上具有潜在的应用价值。

关键词: 刺槐; 硬实种子; 活力差异性

中图分类号: S722.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-7488(2005)02-0042-06

Study on Vigor Difference of Seeds with Different Hard Degree in *Robinia pseudoacacia*

Cao Banghua¹ Zhai Mingpu² Guo Junjie¹

(1. College of Forestry, Shandong Agricultural University Tai'an 271018; 2. College of Resources and Environment, Beijing Forestry University Beijing 100083)

Abstract: The vigor differences of black locust seeds with different hard degree were studied in this paper. The imbibition seeds soaked into 80 ℃ water and gradually cooled down for different days(1~4 d) were respectively called T_1 , T_2 , T_3 and T_4 . The unimbibed seeds of the forth day were called hard seeds(T_r) which would be soaked with concentrated sulphuric acid for 23 minutes in order to imbibe and germinate. The results showed that as the imbibing time getting long, hard degree of control seeds increasing gradually($T_4 > T_3 > T_2 > T_1$), the germinating, potential the germination index, the vigor index and the respirations rate of black locust seeds increased and the conductivity desceased. Research found that the resistance of hard seeds of black locust was higher than that of nor hard seeds under different stress conditions(salt stress, low temperature, artificial aging), indicating that the hard seeds had potential application value in production.

Key words: *Robinia pseudoacacia*; hard seed; vigor difference

刺槐(*Robinia pseudoacacia*)种子的硬实现象普遍存在。湿润条件下成熟的种子硬实数量相对较少,干燥气候成熟的种子硬实数量可达 100%(彭幼芬,1998)。硬实现象是对逆境胁迫的保护性适应,种皮结构的不同,是由遗传基因所控制、生态条件所影响的,具有重要的遗传和生态学意义。前人对蓝花棘豆(*Oxytropis coerulea*)(徐本美等,1995)、小冠花(*Coronilla varia*)(徐本美等,1996a)、白刺花(*Sophora viciifolia*)(徐本美等,1997)、中华垂花胡枝子(*Lespedeza thunbergii*)(徐本美等,1996b)、银合欢(*Leucaena leucocephala*)(伏香香等,2001)、大豆(*Glycine max*)(Wang,1999)等硬实种子研究表明,硬实程度越高的种子,其发芽势、发芽指数、活力指数越高,抗老化。硬实种子表现出了较高的活力和优良的遗传特性。

硬实种子若处理不当,出苗率低,不整齐,会给生产带来诸多不便,生产中对硬实种子重视不够,往往将不易催芽的硬实种子弃之不用。由于硬实程度与种子质量紧密相关,因此开展硬实种子与非硬实种子活力的研究具有重要意义。以往关于树木种子硬实的研究多集中在破除方法方面,文献中尚未见到对乔木树种硬实活力研究的报道。本文对不同硬实程度的刺槐种子活力差异性进行了研究,以为生产应用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

试验用刺槐种子 2003 年秋采自山东省费县刺槐种子园,种子千粒重为(19.7 ± 0.48)g。采后种子自然干

收稿日期:2004-07-29。

基金项目:科技部项目(02EFN216700794)和北京市重大项目(H020720110190)共同资助。

*曹帮华现为北京林业大学在读博士。本研究得到了中国科学院北京植物园徐本美研究员的指教和帮助,特致谢忱。

藏, 试验于 2004 年 5 月在北京林业大学森林培育及森林保护教育部重点实验室进行。常温下浸种种子硬实率 79 %。

1.2 试验方法

1.2.1 硬实种子划分 用起始温度为 80 ℃ 的热水(GB 2772 - 1999《林木种子检验规程》)浸种, 自然冷却。第 1 天自然吸胀的种子称 T_1 , 未吸胀的种子, 继续用始温 80 ℃ 的水浸种, 其中第 2 至第 4 天吸胀的种子视为不同硬实程度的种子, 记作 T_2 、 T_3 、 T_4 , 此时继续浸种, 吸胀种子已低于 1 %。据此把第 4 天仍未吸胀的种子作为本实验硬实程度最高的硬实种子(T_r), 硬实种子经浓硫酸(相对密度 1.84)处理 23 min(曹帮华等, 2002)后与 T_1 种子同步发芽。

1.2.2 抗逆试验 取第 1 天吸胀的种子(T_1)与硬实种子(T_r)作抗逆对比测定。盐分胁迫下种子发芽试验使用质量分数为 0.5 % NaCl 溶液; 种子低温预处理的温度为 4 ℃, 处理时间 48 h; 人工老化温度为 42 ℃, 湿度 100 %, 老化时间为 48 h。处理后摆盘发芽。

以上抗逆试验, 分别于第 1 天、第 7 天和第 14 天测种子的超氧化物歧化酶(SOD 酶)活性及丙二醛(MDA)含量。

1.2.3 发芽测定 用 HPG-1600H 人工气候箱发芽, 滤纸发芽床。每个处理 3 次重复, 每个重复 50 粒种子。变温发芽, 每天高温 30 ℃、8 h, 低温 20 ℃、16 h。

从摆盘之日起每天观察记录种子的发芽情况并测定各相应的指标, 按 GB 2772 - 1999《林木种子检验规程》规定, 第 14 天种子统计发芽率(%)。并计算发芽指数 $G_t = \sum \frac{G_t}{D_t}$ 活力指数 $V_t = G_t \cdot S$ 。式中: G_t 为在时间 t 日的发芽数; D_t 为相应的发芽日数; S 为幼苗平均鲜重。

1.2.4 生理生化指标测定 电导测定参照徐本美等(1983)方法。将种子洗净剥皮, 选取 40 粒中等水平的种子, 定容于 20 mL 重蒸馏水中, 置于 25 ℃ 中浸泡 2 h 后以 Hi-933300 型电导仪测定。

呼吸强度的测定用红外线气体分析仪法, 取不同硬实程度的吸胀种子各 250 粒(约 10 g), 用 LI-6400 光合作用测定系统呼吸强度, 开放式气路, 按公式计算呼吸强度。具体方法参照文献张志良等(2004)。

粗蛋白的测定是将吸胀的种子剥皮, 研细烘干。称取 0.2 g 样品, 经消化、蒸馏、滴定按时微量凯氏定氮法测粗蛋白的含量(张志良, 2004)。用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定可溶性蛋白含量。样品为吸胀的鲜种子 0.3 g, 标准曲线为 $y = 0.028x + 0.0001$, $R^2 = 0.9924$ 。具体方法参照文献李合生(2003)。

用氮蓝四唑(NBT)法测定超氧化物歧化酶(SOD 酶)活性, 具体方法参照文献李合生(2003)。

丙二醛(MDA)含量的测定。称取 0.5 g 去皮种子样品, 加 5 % 三氯乙酸(TCA)5 mL, 研磨后所得匀浆在 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 上清液为样品提取液。取提取液 2 mL, 加 0.67 % 硫代巴比妥酸(TBA)2 mL 混合后在 100 ℃ 水浴上煮沸 30 min, 迅速冰水冷却(目的终止反应)后再离心 1 次。分别测定上清液在 450、532 和 600 nm 处的吸光值(A_{532} , A_{600} , A_{450}), 按公式 $\text{MDA}(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = 6.45(A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450}$ 计算丙二醛(MDA)含量。

2 结果与分析

2.1 刺槐种子吸胀过程中吸胀率与发芽率的变化

用起始温度为 80 ℃ 的水浸泡种子, 每天都有一定比例的种子吸胀, 同时余下尚未吸胀的种子。分别对 1—4 d 后吸胀的种子(T_1 至 T_4)做发芽试验, 逐日地吸胀和发芽结果见图 1。由图看出, 若最先吸胀的 T_1 视为这批种子中硬实程度最低的种子, 则可用吸胀天数描述种子的硬实程度。每天吸胀种子的硬实程度是随吸胀时间的延长而加深的, 即硬实程度 $T_4 > T_3 > T_2 > T_1$ 。4 d 后种子吸胀率不足 1 %, 可视作不再吸胀, 故以第 4 天吸胀所余种子作为本试验的硬实种子(T_r), 其硬实程度最深。图 1 表明, 第 1 天吸胀的种子比例最高, 随着时间延长吸胀率不断下降, 吸胀种子的发芽率却呈一定上升趋势, 第 4 天种子发芽率已高达 99 %。由此说明发芽率是随硬实程度的加深而不断增加的。此外, 种子发芽势的测定结果也表现出与发芽率相似的规律性, 说明硬实种子不仅具有较高的萌发能力, 同时具有较高的幼苗生长潜力。

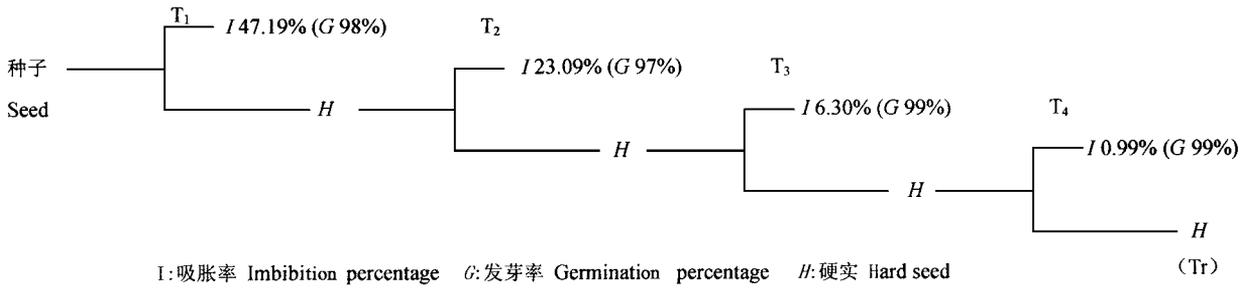


图1 刺槐种子的吸胀与萌发

Fig. 1 Seed imbibition and germination of *R. pseudoacacia*

2.2 不同硬实程度的刺槐种子活力

表1 不同硬实程度的刺槐种子发芽情况

Tab. 1 The germination situation of *R. pseudoacacia* seeds with different hard degrees

指标 Index	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T _r
发芽率 Germination percentage/ %	98	97	99	99	100
发芽指数 Germinating index	8.29	28.52	31.12	32.44	34.50
活力指数 Vigor index	1.39	1.53	1.54	1.95	2.10

从表1可以看出,不同天数吸胀的种子和经酸蚀处理的种子发芽指数和活力指数表现出了差异性。随硬实程度增加,发芽率、发芽势略有提高,发芽指数随硬实程度的增加而增大,幼苗生长速度随之加快,活力指数不断增加。分别对各测定数据作方差分析得知,不同硬实种子发芽率间的差异不显著($F = 0.917 < F_{0.05} = 3.478$),而发芽指数($F = 7.751 > F_{0.05} = 3.478$)、活力指数($F = 125.79 > F_{0.01} = 5.994$)差异达到了极显著水平。说明了种子活力水平受硬实程度的影响并随着硬实程度增加而增加,硬实种子的活力指数最高。与对照相比,硬实种子的活力指数是对照的1.5倍。

2.3 不同硬实程度刺槐种子的呼吸强度

从图2可以看出,随着硬实程度的增高,吸胀后种子的呼吸强度随硬实强度增加而增加。硬实种子的呼吸强度比对照种子的高出33.9%。保持旺盛代谢强度,是保证迅速萌发和出苗整齐的首要条件,呼吸强度是呼吸代谢强弱的重要指标(张少英等,1999)。高的呼吸强度是种子高活力的体现。

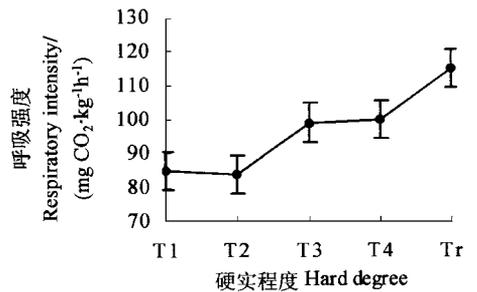


图2 不同硬实程度的刺槐种子呼吸强度曲线

Fig. 2 Respiratory intensity curve of *R. pseudoacacia* seeds with different hard degrees

2.4 不同硬实程度的刺槐种子蛋白质含量

许多研究证实,种子活力与萌发中种子胚合成蛋白质的能力及其蛋白质含量密切相关。由表2看出,不同硬实程度种子粗蛋白含量可分为2组,T₁、T₂为第1组和T₃、T₄、T_r为第2组,后者明显高于前者。即随硬实程度增加,粗蛋白含量明显增加,与活力变化趋势吻合。对各测定数据作方差分析得知,不同硬实种子间无论粗蛋白含量($F = 2.475 < F_{0.05} = 5.192$)还是可溶性蛋白含量($F = 3.123 < F_{0.05} = 5.192$)差异均未达到显著水平。

表2 不同硬实程度刺槐种子的蛋白质含量

Tab. 2 Protein content of *R. pseudoacacia* seeds with different hard degrees

蛋白质 Protein	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T _r
粗蛋白含量 Crude protein percentage/ %	49.861 2	49.831 9	56.840 6	55.473 4	54.973 1
可溶性蛋白含量 Soluble protein percentage/ %	6.545	9.456 5	9.685 9	10.621 7	12.287 2

可溶性蛋白是幼苗生长所必需的,其含量的高低,直接影响到种子萌发情况(Li et al.,1994)。从表2可

以看出,随着硬实程度的增加,可溶性蛋白含量随之增高。硬实种子的蛋白质含量是 T_1 含量的 187.73%,表明硬实种子活力水平高,有较强的蛋白质合成能力。

2.5 逆境条件下硬实种子与对照种子萌发幼苗的 SOD 酶活性

SOD 酶是一种重要的保护性酶,能够清除植物体内因为逆境胁迫而产生的 O_2^- 自由基,在逆境条件下,SOD 酶会急剧增加。SOD 酶可减轻膜脂的过氧化,从而减轻逆境对植物体的伤害。

表 3 逆境条件下刺槐硬实种子萌发幼苗 SOD 酶活性

Tab. 3 SOD activities of young seedlings germinated from hard *R. pseudoacacia* seeds under different stress conditions $\mu \cdot g^{-1} \cdot FW$

发芽天数 Germinating days			1	7	14
0.5 % 的盐逆境 0.5 % salt stress	T_1		49.99	280.76	262.62
	T_r		50.00	428.61	366.62
4 °C 低温 48 h Low temperature	T_1		49.99	288.24	270.04
	T_r		53.33	251.13	128.28
人工老化 48 h Artificial aging for 48 h	T_1		49.99	301.24	280.26
	T_r		53.33	268.28	154.18

表 3 分别列出了盐胁迫、低温、人工老化条件下的 SOD 酶随发芽天数的变化。由表可知,硬实种子(T_r)和 T_1 的关系因逆境不同而不同。0.5% 的盐逆境中发芽,硬实种子 SOD 酶活性高于 T_1 ;经低温和人工老化处理的种子,发芽过程中 SOD 酶活性低于 T_1 。

硬实种子表现出对胁迫的适应性。硬实种子在盐逆境中发芽,酶活性迅速升高,逐渐适应后,SOD 酶活性又下降,对盐胁迫反应十分灵敏。方差分析显示,硬实种子(T_r)和 T_1 种子 SOD 酶活性间($F = 3.667 < F_{0.05} = 18.513$)差异均未达到显著水平;但不同天数间 SOD 酶活性($F = 19.017 > F_{0.05} = 19.000$)差异达到显著水平;而经低温和人工老化处理硬实种子则不同,在发芽过程中由于没有逆境条件,硬实种子(T_r)和 T_1 的 SOD 酶活性都维持较低水平,无论硬实种子(T_r)和 T_1 种子间还是不同天数间差异均不显著。

SOD 酶是一种诱导酶(沈同等,2003)。刺槐种子在逆境条件下,会产生并积累超氧阴离子。从而诱导 SOD 酶活性增高。本试验硬实种子的 SOD 酶活性在盐逆境中发芽迅速增加及非逆境条件下低于对照种子的结果,都说明硬实种子有强的抗逆能力和对超氧阴离子敏感的反应,是种子受伤害程度低的表现。

2.6 逆境条件下硬实种子和对照种子 MDA 含量

植物受到逆境伤害时,会产生一些活性氧,活性氧的积累会造成膜脂的过氧化(李晓玲等,1999)。MDA 是植物细胞膜不饱和脂肪酸发生过氧化作用的最终产物,含量高低可以反映出细胞膜受损伤的程度,其积累是活性氧毒害作用的表现(蒋明义等,1996)。

表 4 逆境条件下硬实种子与对照种子的萌发幼苗 MDA 酶活性

Tab. 4 Comparisons of MDA activities between young seedlings germinated from hard seeds and non-hard seeds $\mu \text{mol} \cdot g^{-1}$

发芽天数 Germinating days			1	7	14
0.5 % 的盐逆境 0.5 % salt stress	T_1		0.079	1.05	0.59
	T_r		0.095	0.69	0.44
4 °C 48 h Low temperature	T_1		0.097	0.71	0.51
	T_r		0.095	0.65	0.38
人工老化 48 h Artificial aging for 48 h	T_1		0.097	0.75	0.56
	T_r		0.095	0.73	0.42

表 4 分别说明盐胁迫、低温条件、人工老化条件下的 MDA 含量随发芽天数的变化趋势。由表可知,3 种逆境条件下发芽过程中 MDA 含量先升高后下降,说明种子萌发过程中,种子和幼苗有一个适应调节过程,是刺槐种子内部的抗逆调节系统调节的结果(张少英等,1999)。与对照种子相比,硬实程度高的种子的 MDA 含量低,说明其抗逆性强。

2.7 不同硬实程度刺槐种子的电导率

植物的膜系统具有选择通透性,膜透性的增加一定程度上反映了种子的老化程度。从图 3 可以看出,随

着硬实程度的增加($T_1 \rightarrow T_4$),硬实种子电导率逐渐下降。由于逐日吸胀的种子 T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 包括 T_r 从表皮坚硬到完全吸胀时间均为 24 h,电导率值具有可比性,电导率逐步降低,说明细胞膜的老化程度逐渐降低,种子的抗老化能力逐渐增强。

图中硬实种子的电导率略有增高可能与种子用浓 H_2SO_4 处理时种子受到轻微伤害有关。由于硬实种子的不透气和不透水性,本实验采用了酸蚀处理的方法处理种子。酸蚀处理作为一项硬实种子预处理措施,在国内外早有报道,其技术关键是处理时间。处理时间过长,会伤及胚乳甚至种胚,但时间不足,又达不到破除硬实的目的。美国林木种子手册(1974年)指出,大部分树种的处理时间是 15~60 min。曹帮华等(2002)曾对刺槐种子酸蚀时间进行过研究,认为 23 min 是理想的处理时间,其作用是使种皮变薄,并清除珠孔处的堵塞物,以加强胚与外界的透气性,便于种子萌发。由于 23 min 的处理时间没有伤害种胚及胚乳,发芽测定的结果不会受到影响。电导等指标的测定是使用的去皮种子,理论上酸蚀处理影响很小,但不排除个别种子受到轻微伤害的可能性,从而对实验结果产生细小的影响。

已有研究表明,种子吸胀过程中细胞膜活性会得到一定恢复(Li *et al.*, 2002),本试验发现,硬实程度越高的种子,其恢复程度也越好。

3 结论与讨论

刺槐硬实种子的活力高于非硬实种子,活力随着硬实程度的增加而升高。硬实程度越高的种子,种子萌发过程中种子呼吸强度、可溶性蛋白含量越高,电导率越低,具有越高的活力指数,刺槐种子抗逆能力越高。刺槐种子萌发过程中可溶性蛋白含量、呼吸强度升高与硬实程度的关联,是硬实种子活力高的原因,进一步印证了刺槐硬实种子的活力高于非硬实种子的结论;电导率与硬实程度呈负相关,随硬实程度增高,物质外渗量减少,电导率逐步降低。硬实种子具有较高的抗逆性,种皮的保护机制的提高使得刺槐种子抗逆能力随硬实程度增加而增强。

任何植物都有一套对外界环境的变化适应及调节系统,硬实种子是刺槐在生殖季节对外界环境变化反应的结果,与外界环境条件密切相关。硬实程度的不同,反映了母树调节系统的强弱。从这种意义上说,硬实的产生是一种保护性适应,硬实种子应该具有较高的活力。本研究结果支持了这一观点。

研究表明,将刺槐硬实种子看作没有活力或劣质种子是何等冤枉,有关硬实种子是高活力种子的结论仍有待于更多树种的进一步研究,对硬实的进一步认识将对生产应用有积极的引导作用,也有助于在未来种子检验规程中确立硬实种子的地位。

参 考 文 献

- 曹帮华,耿蕴书,牟洪香. 2002. 刺槐种子硬实破除方法探讨. 种子, (4): 22 - 24
- 洪香香,李淑娴,隋爱敏. 2001. 不同处理对几种硬实性种子活力的影响. 种子, (2): 27 - 32
- 蒋明义,郭少川. 1996. 水分亏缺诱导的氧化胁迫和植物的抗氧化作用. 植物生理学通讯, 32(2): 144 - 150
- 李合生. 2003. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社
- 李晓玲,杨进,骆炳山. 1999. 活性氧化酶与植物的抗逆性. 荆门职业技术学院学报, 6(3): 30 - 35
- 彭幼芬. 1998. 世界林木种子生理研究的概况和趋势. 世界林业研究, (2): 8 - 12
- 沈同,王镜岩. 2003. 生物化学. 北京: 高等教育出版社
- 徐本美,白原生,冯桂强,等. 1996a. 小冠花种子休眠与萌发的研究. 草地学报, (2): 134 - 140
- 徐本美,白原生,梁飞凤,等. 1995. 蓝花棘豆硬实种子特性的研究. 草地学报, (4): 305 - 310
- 徐本美,冯桂强,史晓华,等. 1996b. 7种硬实种子特性的研究. 种子, (6): 4 - 8
- 徐本美,冯桂强,张金政,等. 1997. 白刺花硬实种子特性的研究. 植物学通报, 14(2): 45 - 48
- 徐本美,顾增辉,任祝三. 1983. 测定种子活力方法探讨: 电导法. 种子, (1): 18 - 22

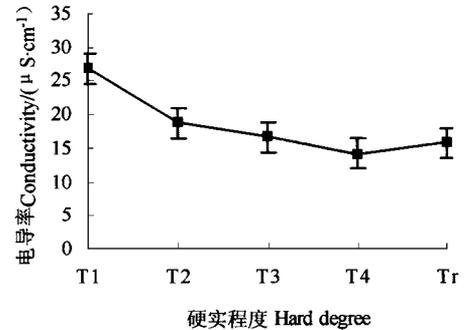


图3 不同硬实程度的刺槐种子电导率变化

Fig. 3 The electric conductivity variation of black locust seeds with different hard degree

张少英,邵世勤,王瑞刚,等.1999.甜菜种子活力与呼吸代谢的关系.中国糖料,(4):4-7

张志良.2004.植物生理学实验指导.北京:高等教育出版社

国家质量技术监督局.1999.林木种子检验规程.中华人民共和国国家标准 GB 2772 - 1999

Li Chenwen, Da Xing, Hong Heyong.2002. Rapid determination of rice seed vigor by ultraweak chemiluminescence' s during early imibition. Journal of Plant Physiology and Moecular Biology ,28(5) :357 - 362

Li Zhujie, Xia Wei, Fu Jiarui.1994. Changes in proteins in germination peanut seeds of different vigour. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni ,(3) : 81 - 85

Wang Jinlong.1999. Study on prservation of soybean germplasm using soybean hard seed. Soybean Science ,(4) :52 - 56