

种皮蜡质与乌拉尔甘草种子抗菌及抗老化能力的关系

张文静, 孙群*, 王建华, 孙宝启

中国农业大学农学与生物技术学院植物遗传育种系, 农业部基因组学与遗传改良重点实验室, 北京市作物遗传改良重点实验室, 北京 100193

摘要: 本文研究了乌拉尔甘草种子种皮蜡质的厚度与蜡质抑菌效果、蜡质与种子抗老化能力和种子吸水能力的关系。结果表明: 用浓硫酸浸泡2~3 min可完全除去蜡质, 蜡质的厚度约为30 μm ; 接种菌液后, 脱蜡种子在PDA培养基上形成的青霉和曲霉菌斑的直径显著大于不脱蜡的种子形成的菌斑直径, 但蜡质的体外抗菌能力不明显; 随着老化时间的延长, 脱蜡种子的含水量增加速度和发芽率下降速度明显快于未脱蜡种子, 且在湿度较高的环境下, 脱蜡种子的平衡水分比未脱蜡种子显著升高, 说明蜡质在一定程度上可以保护种子不易受外界湿度的影响。

关键词: 乌拉尔甘草; 种子; 蜡质; 抗菌; 抗老化

Relation between Surface Wax and the Ability of Antisepsis and Anti-Aging of Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) Seeds

ZHANG Wen-Jing, SUN Qun*, WANG Jian-Hua, SUN Bao-Qi

Department of Plant Genetics and Breeding, College of Agronomy and Biotechnology, Key Laboratory of Crop Genomics and Genetic Improvement of Ministry of Agriculture, Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: The relation between surface wax and its ability of antisepsis, anti-aging and water-content in licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) seeds was analyzed. The result showed that the wax thickness of seed surface was about 30 μm , and it could be completely removed by soaked with concentrated sulfuric acid for 2–3 min. After inoculated with mildew, the dewaxed seeds formed bigger blaques on PDA medium than the control seeds, but the antiseptic effect of wax *in vitro* was not obvious. With aging, the water content of dewaxed seeds rose more quickly than control, with much more quickly declining in germination rate. Under high humidity environment, the equilibrium water content of the dewaxed seeds was significantly higher than the original seeds, indicated that the wax could protect the seeds from intrusion of external humidity.

Key words: licorice (*Glycyrrhiza uralensis*); seed; wax; antiseptic; anti-aging

硬实是豆科植物种子的一种普遍现象, 其活力和耐贮藏能力均显著高于非硬实种子(曹帮华等 2005; 徐本美等 2005; 田娟等 2007)。一般长寿命种子均为硬实种子, 如古莲、羽扇豆硬实种子寿命可达几百年甚至上千年, 而一般作物种子在同样的条件下贮藏不出数年便已不能发芽(Shen-Miller 等 1995)。室温下保存 4 年的大豆硬实种子发芽率可保持在 90% 以上, 而非硬实种子保存 2 年左右即失去生活力(王金龙 1999)。硬实种子的这种抗衰老特性是否与种皮的蜡质有关, 尚有待研究。植物叶片或茎秆蜡质的抗逆性研究表明, 蜡质具有防止水分丧失、防御病菌侵入和抵抗紫外线辐射的作用(Mariani 和 Wolters-Arts 2000; Sieber 等 2000)。梁炫强等(2003)报道, 花生的种皮蜡质含量与其抗黄曲霉感染有关。本实验前期的研究(杨力钢等

2006)也表明, 甘草硬实种子的带菌量极少, 这是否与蜡质有关仍待研究。为此, 本文比较乌拉尔甘草种子脱蜡与否对抵御霉菌侵染、抗老化能力以及种子含水量的影响, 探讨蜡质在种子抗老化和抗逆中的作用。

材料与方 法

乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)种子于 2007 年采自甘肃省张掖地区, 从中选择完整无破损、色泽相似(棕绿色)和大小均一(直径为 2.5~3.0 mm)的种子进行实验, 种子千粒重约 12.0 g。

收稿 2009-08-31 修定 2009-11-18

资助 国家科技攻关课题(2001BA701A59)和国家科技支撑计划(2006BA106A15)。

* 通讯作者(E-mail: sqcau@126.com; Tel: 010-62732775)。

用扫描电镜观察种皮结构时,取20粒乌拉尔甘草种子,用导电胶粘在样品台上,用IB-5型离子镀膜仪喷涂厚约2.3 nm的金膜后,置于S-570型扫描电子显微镜下观察种子表皮结构,并记录和拍照。

脱蜡时,用过量浓硫酸浸泡种子,浸泡时间分别为1、2、3、4、5和10 min,然后用清水冲净种子,并迅速擦干和晾干种子表面水分。然后将种子用导电胶粘在样品台上,用IB-5型离子镀膜仪喷涂金膜,用扫描电镜检测种皮蜡质的残留。取浓硫酸处理1、2、3和5 min的种子进行吸胀实验,各取100粒按照上述方法脱蜡的种子用过量蒸馏水浸泡,每天记录吸胀种子的数目,绘制吸胀率曲线。以未脱蜡种子为对照,重复3次。

检测蜡质厚度时,准确称取10 g甘草种子,用浓硫酸处理2 min,脱去蜡质后,将种子擦干和晾干后,室内放置2周备用。徒手切片,切取种皮平面部分,用游标卡尺测量30粒种子的种皮厚度。以未脱蜡种子作为对照,计算蜡质部分的厚度,重复3次。

作抑菌实验时,将未脱蜡种子和脱蜡种子用1%次氯酸钠消毒10 min,用无菌水清洗后,分别在浓度相同[10^7 个(孢子) \cdot mL $^{-1}$]的青霉菌液和曲霉菌液中浸泡4 h,取出晾干,接种在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上,放在25℃黑暗条件下培养4 d观察真菌生长情况,并测量菌斑直径。每组50粒种子,重复3次。

测定蜡质体外抑菌能力时,参考梁炫强等(2003)的方法,先将种子放在氯仿中浸泡1 d,捞出种子,待氯仿挥发完全后,再用3 mL氯仿溶解蜡质,加入到PDA培养基中,调整蜡质浓度为1 mg \cdot mL $^{-1}$,将培养基倒入培养皿,敞口放置2 h,待氯仿挥发完全后在培养基上滴加10滴青霉菌液[每滴10 μ L,浓度为 10^7 个(孢子) \cdot mL $^{-1}$],放置于25℃黑暗条件下培养4 d后观察霉菌生长情况,并测量菌斑直径。以不添加蜡质的培养基为对照,重复3次。

作老化实验时,将未脱蜡种子和脱蜡种子于温度为42℃和相对湿度为100%的条件下分别老化1、2、3和4 d后,计算种子含水量变化,人工切破种皮后测定种子的发芽率(尹燕桦和董学会2008)。

测定脱蜡和未脱蜡种子在不同相对湿度条件下的平衡水分时,首先根据国际种子检验协会(International seed testing association, ISTA)种子检验规程(2003)的方法,将种子放在105℃的烘箱中烘干17 h,测定种子原始含水量。再取5只广口瓶,分别加入相对湿度为10%、30%、50%、70%和90%的硫酸溶液各100 mL。分别称取3 g(准确到0.001 g)脱蜡和未脱蜡的种子,放入尼龙网袋中。然后将尼龙网袋吊在不同相对湿度的广口瓶内,瓶口盖严,置于20℃的恒温箱内。第12天称重,计算种子的含水量,重复3次。

实验数据用DPS(data processing system)数据处理系统进行方差分析和多重比较。

结果与讨论

1 种皮蜡质的电镜观察与种皮厚度

扫描电镜观察表明甘草种子表面覆盖有大量的鱼鳞状蜡质(图1),并散布有不定形的蜡质(呈水晶状、片状、点状等多种形态)。经二甲苯、三氯甲烷、丙酮、乙醚、石油醚等溶剂以及超声处理后,可除去部分蜡质,但均未除净。浓硫酸处理2 min和3 min均能除去种子表皮蜡质,种皮的角质层均明显可见,在实验所用的10粒种子表面均未发现破坏孔(图2),说明这样处理的时间不会损伤角质层,角质层内镶嵌的一些内蜡质也同时被除去。处理时间达到4 min及以上时,角质层出现轻微浅裂孔;处理时间过短,种子上还存在较多的残存蜡质,且大部分种子只是除去了外蜡质,内蜡质

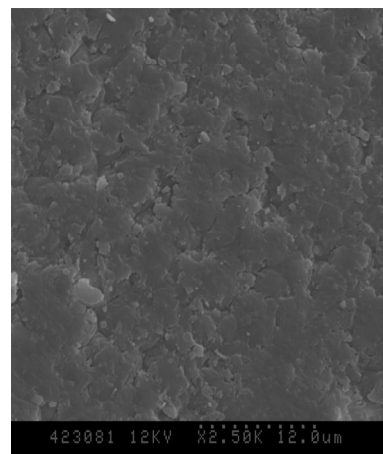


图1 甘草种子表面上的蜡质
Fig.1 The surface wax on licorice seed

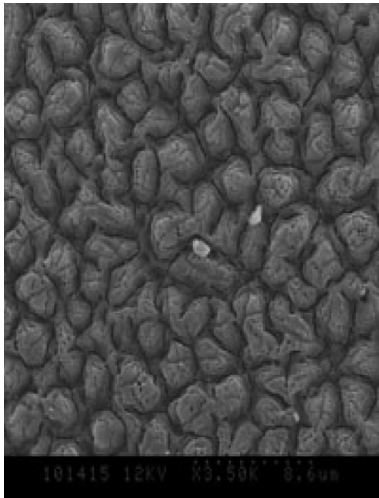


图2 浓硫酸处理2 min后的甘草种子表皮

Fig.2 The licorice seed surface after treatment with concentrated sulfuric acid for 2 min

依然保持完整。本文结果表明甘草种皮蜡质厚度约为 30 μm 。

2 蜡质与种子抗菌能力的关系

脱蜡种子与对照(未脱蜡种子)接种青霉和曲霉并在PDA培养基上培养4 d后,脱蜡种子形成的青霉菌斑和曲霉菌斑(其直径分别为 1.59 cm 和 1.24 cm)均显著大于未脱蜡种子形成的青霉菌斑和曲霉菌斑(其直径分别为 1.47 cm 和 1.21 cm) ($P>0.05$),说明种子表皮蜡质具有一定的抗菌能力。为了排除种子内含物外泌对于实验结果的影响,仅测量实验过程中未吸胀种子周围形成的菌斑大小。此外,就蜡质的体外抑菌能力来说,添加蜡质与未添加蜡质的培养基上菌斑的平均直径分别为 1.37 cm 和 1.38 cm,没有显著差异,说明种皮蜡质并不含有抗菌的化学物质,而对照种子表现出的抗菌性可能是蜡质起到了机械阻碍霉菌侵染的作用。

3 蜡质与种子耐老化的关系

随着老化时间的增加,种子发芽率逐渐降低,与对照种子相比,脱蜡种子发芽率降低的幅度更大(表1),说明蜡质的存在能够提高种子的抗老化能力。

表1 种子老化过程中的含水量和发芽率变化

Table 1 Changes of water content and germination during aging of licorice seeds

老化时间/d	发芽率 / %		含水量 / %	
	对照	脱蜡种子	对照	脱蜡种子
0	92 \pm 1.9	92 \pm 1.9	7.87 \pm 0.17	9.30 \pm 0.07**
1	94 \pm 4.3	74 \pm 10.0*	7.87 \pm 0.00	9.81 \pm 0.29**
2	82 \pm 10.0	66 \pm 10.0*	7.87 \pm 0.00	10.78 \pm 0.42**
3	78 \pm 5.5	56 \pm 7.3*	8.25 \pm 0.20	11.68 \pm 0.84**
4	66 \pm 7.6	56 \pm 3.0	8.49 \pm 0.67	14.38 \pm 1.20**

表中*表示与对照存在0.05水平上的显著差异,**表示与对照存在0.01水平上的显著差异。

对老化过程中种子含水量的测定发现,脱蜡种子的含水量增加更快,而对照种子含水量的增加比较缓慢,变化幅度很小(表1)。

4 蜡质与种子吸湿性的关系

从图3和图4可以看到:(1)用浓硫酸处理1 min,即蜡质尚未除净的种子,吸胀速率与对照没有差异,但是处理2 min即除去蜡质的种子的吸胀速率显著快于未除蜡质的种子(图3),说明蜡质起到了延缓水分进入种子的作用。处理5 min的种子吸胀速率快于处理2 min的种子(图3),这可能与处理时间长,种子表皮形成破坏孔有关系。(2)脱蜡种子

更易受到环境湿度的影响。在相对湿度为10%的环境下,脱蜡种子的平衡水分分为3.75%,未脱蜡种子的平衡水分分为4.11%,方差结果表明二者没有显著差异;相对湿度超过50%以后,脱蜡种子的平衡水分呈直线上升;相对湿度为90%时,脱蜡种子的平衡水分达到15.18%(图4),而一般作物种子的安全贮藏水分标准仅为12%~13%。相比脱蜡种子,未脱蜡质的种子的平衡水分变化范围较小,在相对湿度超过50%以后,其平衡水分变化很小,一直保持在8.50%以下。这些显示,有蜡质的甘草种子不易受外界湿度的影响,因而其耐老化能力高。

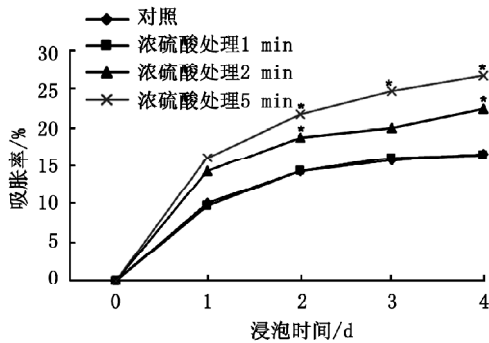


图3 蜡质对乌拉尔甘草种子吸水性的影响

Fig.3 Effect of wax on water uptake of licorice seeds

图中 * 表示与对照存在 0.05 水平上的显著差异。

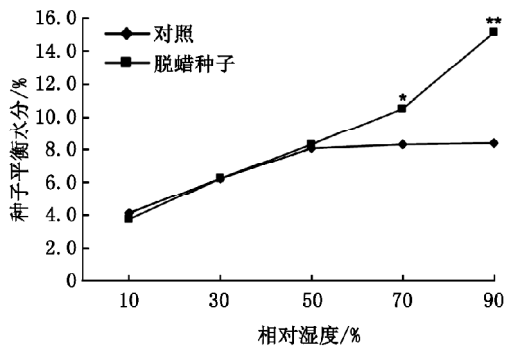


图4 脱蜡种子与对照种子在不同相对湿度中含水量的变化

Fig.4 Changes in water contents of dewaxed and control seeds at different relative humidity

图中 * 表示与对照存在 0.05 水平上的显著差异, ** 表示与对照存在 0.01 水平上的显著差异。

参考文献

- 曹帮华, 翟明普, 郭俊杰(2005). 不同硬实程度的刺槐种子活力差异性研究. 林业科学, 41 (2): 42~47
- 梁炫强, 周桂元, 潘瑞焜(2003). 花生种皮蜡质和角质层与黄曲霉侵染和产毒的关系. 热带亚热带植物学报, 11 (1): 11~14
- 田娟, 孙群, 王建华, 孙宝启(2007). 不同硬实程度乌拉尔甘草种子的活力差异. 植物生理学通讯, 43 (2): 235~240
- 王金龙(1999). 利用大豆硬实种子保存大豆种质的研究. 大豆科学, 18 (4): 351~354
- 徐本美, 孙运涛, 孙超, 李锐丽, 郭琛(2005). 硬实种子高活力性状的研究. 种子, 24 (8): 44~48
- 杨力钢, 黄中乔, 刘鹏飞, 王建华, 董学会, 孙宝启, 孙群(2006). 甘草种子带菌检测及药剂消毒处理效果. 植物保护, 32 (5): 84~86
- 尹燕枰, 董学会(2008). 种子学实验技术. 北京: 中国农业出版社
- Mariani C, Wolters-Arts M (2000). Complex waxes. Plant Cell, 12: 1795~1798
- Russin JS, Guo BZ, Tubajika KM, Brown RL, Cleveland TE, Widstrom NW (1997). Comparison of kernel wax from corn genotypes resistant or susceptible to *Aspergillus flavus*. Phytopathology, 87 (5): 529~533
- Shen-Miller J, Mudgett MB, Schopf JW, Clarke S, Berger R (1995). Exceptional seed longevity and robust growth: ancient sacred lotus from China. Am J Bot, 82 (11): 1367~1380
- Sieber P, Schorderet M, Ryser U, Buchala A, Kolattukudy P, Métraux J-P, Nawrath C (2000). Transgenic *Arabidopsis* plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. Plant Cell, 12 (5): 721~737