

乌拉尔甘草硬实和非硬实种子无损分离的液体比重法

孙群^{1,*}, 王建华¹, 丁自勉², 孙宝启¹

¹中国农业大学农学与生物技术学院植物遗传育种学系, 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; ²中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100193

Non-destructive Liquid Density Method for Rapid Separating Hard Seeds and Soft Seeds of Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)

SUN Qun^{1,*}, WANG Jian-Hua¹, DING Zi-Mian², SUN Bao-Qi¹

¹Department of Plant Genetics and Breeding, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Key Laboratory of Crop Genomics and Genetic Improvement of Ministry of Agriculture, Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Beijing 100193, China; ²Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

提要: 用不同比重的硫酸溶液分离3份乌拉尔甘草种子的结果表明: 硬实率与比重之间存在极显著的正相关关系, 相关系数为0.979。比重大于1.36的种子硬实率高达99.7%; 比重大于1.28的种子为硬实的概率为91.7%; 比重低于1.28的种子为非硬实的概率在86%以上。液体比重法可以有效地将乌拉尔甘草的硬实种子和非硬实种子分开, 种子比重越大, 其质量和活力越高。

关键词: 乌拉尔甘草; 硬实; 液体比重

乌拉尔甘草属于豆科蝶形花亚科, 是我国的一种传统中药材, 其种子具有硬实特性。硬实现象广泛存在于豆科植物种子中, 有报道表明硬实种子的活力和耐贮藏能力均要显著高于非硬实种子(徐本美等 2005; 曹帮华等 2005; 田娟等 2007)。用处理后的硬实种子播种可提高植株的田间表现。在贮藏过程中, 硬实种子的种皮一方面限制水分和氧气的进入, 一方面又能防止微生物的侵染(杨力钢等 2006), 因而有效地保护种子的活力。迄今为止已发现的长寿命种子均为硬实种子, 如古莲硬实种子寿命可长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)。因此从一批种子中将硬实种子与非硬实种子区分开, 将硬实种子作种质贮藏或对硬实种子单独处理后播种, 则可以节省大量的人力和物力, 促进其在生产和种质贮藏方面的应用。但由于硬实种子和非硬实种子在外部形态(如色泽、大小)上没有差异, 迄今尚无有效的判定方法。目前判断种子是否为硬实时只能采用浸种法(杨期和等 2006), 即浸泡 24 h 后根据种子是否吸胀来判断种子的硬实性, 这种方法耗时较长, 另外浸泡后非硬实种子的种皮结构和化学成分会发生不同程度的改变, 研究硬实机制时常受到一定的限制, 一般研究

都采用硬实率不同的品种种子进行品种间的比较(Ma 等 2004; Serrato 等 1989), 这有一定的局限性。

本文拟利用液体比重探索一种快速、无损分离乌拉尔甘草的硬实种子和非硬实种子的方法, 为硬实种子在农业生产和种质保存中的应用提供参考, 进而推动乌拉尔甘草种子硬实机制的研究。

材料与amp;方法

实验材料为乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)种子, 材料 A (2006 年收获)、B (2007 年收获)来源于宁夏, 材料 C (2007 年收获)来源于内蒙古。每种材料均选取大小一致(2.5~3.0 mm)、颜色一致(棕绿色)、完整无破损的种子。A、B、C 各取部分种子用蒸馏水浸泡 5 d 后, 选取未吸胀种子作为硬实种子, 分别记为 AH、BH、CH, 擦干种子表面水分后于室内晾干。根据颜启传(2000)的方法测定乌拉尔甘草种子的硬实率、千粒重和比重。根据预实验的结果, 分别取 50、65、70 mL 的浓硫酸, 用蒸馏水定容到 200 mL, 可

收稿 2008-09-04 修定 2008-12-02

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

* E-mail: sqcau@126.com; Tel: 010-62732775

得到比重约为 1.28、1.32 和 1.36 的硫酸溶液。A、B、C 各称取 20 g 种子, 倒入比重为 1.36 的液体中, 搅拌并静置 1 min, 将上层种子捞出, 倒入到比重为 1.32 的液体中, 搅拌并静置 1 min, 再将上层种子捞出, 倒入到比重为 1.28 的液体中, 搅拌并静置 1 min, 再将上层种子捞出。各组液体中下沉的种子随时捞出, 即得到比重大于 1.36、1.32~1.36、1.28~1.32、小于 1.28 的 4 组不同比重的种子, 种子捞出后用水冲净, 迅速擦干, 晾干后称重, 计算不同比重种子所占的比例, 并进一步测定不同比重组种子的千粒重、硬实率、虫蚀率、发芽率、活力指数和脱氢酶活性(颜启传和黄亚军 1992)等。实验数据用 DPS 软件进行方差分析和多重比较。

实验结果

1 乌拉尔甘草混和种子和硬实种子的比较

从表1可看出, 硬实种子与非硬实种子在千粒重上差异不显著, 但硬实种子的比重均要显著或极显著高于混和种子。3 份混和种子的硬实率均在 70% 左右, 即存在 30% 左右的非硬实种子, 由此可推断出硬实种子的比重显著高于非硬实种子, 通过比重法有可能将硬实种子与非硬实种子分离开。

表1 乌拉尔甘草混和种子与硬实种子的质量差异

材料代号	来源与收获年份	硬实率/%	千粒重/g	比重
A	宁夏, 2006	71.5	1.086	1.350
AH	源于 A 的硬实种子	—	1.111	1.382**
B	宁夏, 2007	72.5	1.087	1.311
BH	源于 B 的硬实种子	—	1.152**	1.370**
C	内蒙, 2007	68.5	1.212	1.348
CH	源于 C 的硬实种子	—	1.202	1.366*

*0.05 水平的差异显著, **0.01 水平的差异显著。

2 不同比重组乌拉尔甘草种子的硬实率与质量分析

从图 1、图 2 可看出, 对于任一批种子, 比重大于 1.36 的种子所占的比例都最大, A 组 51%, B 组 71%, C 组 61%, 其硬实率也最高, A 组 100%, B 组 100%, C 组 98%。随着比重的降低, 种子所占的比例与硬实率都开始下降。比重低于 1.28 的种子所占的比例在 10% 左右, 硬实率最低, 只有 14%。相关分析结果表明硬实率与比重之间的相关系数为 0.979, 达到极显著相关水平。因此, 利

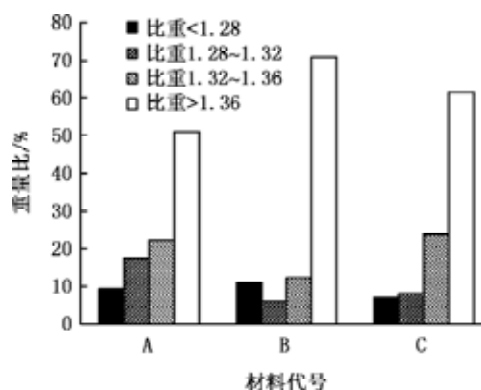


图1 不同比重组乌拉尔甘草种子所占的重量比

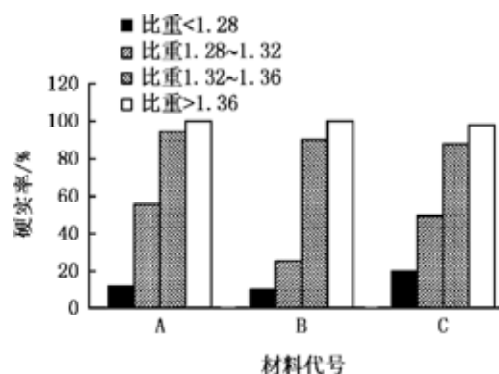


图2 不同比重组乌拉尔甘草种子的硬实率

用不同比重的液体可有效地区分硬实种子和非硬实种子。比重大于 1.36 时, 种子的硬实率高达 99.7% 以上; 比重大于 1.32 时, 种子为硬实的概率在 97.4% 以上; 比重大于 1.28 时, 种子为硬实的概率为 91.7%; 比重低于 1.28, 种子为非硬实率在 86% 以上。这样, 可根据试验和生产需要确定不同浓度的溶液进行分离。

通过对不同比重组之间种子的比较研究发现, 随着比重的增加, 种子的千粒重、发芽率、活力指数、脱氢酶活性也随之增加; 不同比重组之间这 4 个指标均存在显著差异。比重最轻的组, 种子虫蚀率最为严重, A-1 为 30%, B-1 约 40%, C-1 为 60%。随着比重的增加, 虫蚀率逐渐降低, 比重大于 1.36 时, 虫蚀率基本为 0。由此可以看出, 比重轻的种子或是说非硬实种子的形成与虫害的发生存在一定的相关性。

讨论

液体比重分离种子是一种传统的种子分选方法, 常用来清除病虫粒和瘦瘪粒, 但能否用于分离

表2 不同比重组乌拉尔甘草种子质量分析

种子分组	比重	千粒重/g	发芽率/%	活力指数	虫蚀率/%	脱氢酶活性/mg·g ⁻¹
A-1	>1.28	10.30 ^{Cc}	36.0 ^{Cc}	40.89 ^{Bc}	30.00 ^{Aa}	0.1996 ^{Cb}
A-2	1.28~1.32	10.90 ^{Bb}	80.7 ^{Bb}	145.09 ^{Ab}	13.33 ^{Abb}	0.2426 ^{BCb}
A-3	1.32~1.36	10.93 ^{Bb}	84.7 ^{Bb}	162.52 ^{Aab}	4.33 ^{BCc}	0.3042 ^{ABa}
A-4	<1.36	11.70 ^{Aa}	99.3 ^{Aa}	205.47 ^{Aa}	0.67 ^{Cc}	0.3356 ^{Aa}
B-1	>1.28	10.14 ^{Bc}	50.7 ^{Bc}	86.76 ^{Cb}	41.13 ^{Aa}	0.1395 ^{Bb}
B-2	1.28~1.32	10.79 ^{ABb}	71.1 ^{Bbc}	117.74 ^{BCb}	23.40 ^{Bb}	0.1631 ^{ABb}
B-3	1.32~1.36	10.93 ^{ABb}	80.7 ^{ABb}	185.51 ^{ABa}	6.77 ^{Cc}	0.1588 ^{ABb}
B-4	<1.36	11.51 ^{Aa}	99.0 ^{Aa}	208.49 ^{Aa}	0.03 ^{Dd}	0.2098 ^{Aa}
C-1	>1.28	10.64 ^{Bb}	17.8 ^{Bd}	17.88 ^{Cd}	65.55 ^{Aa}	0.1344 ^{Bb}
C-2	1.28~1.32	11.06 ^{Bb}	53.3 ^{Bc}	61.34 ^{Bc}	18.78 ^{Bb}	0.1413 ^{ABb}
C-3	1.32~1.36	12.17 ^{Aa}	84.7 ^{Ab}	149.43 ^{Ab}	3.33 ^{BCc}	0.1676 ^{ABab}
C-4	<1.36	12.51 ^{Aa}	96.7 ^{Aa}	185.31 ^{Aa}	0 ^{Cc}	0.1973 ^{Aa}

小写字母表示 0.05 水平的差异显著, 大写字母表示 0.01 水平的差异显著。

硬实种子和非硬实种子未见到相关报道。有研究表明硬实的形成与种子的成熟度有关(Gurusamy和Arya 2003), 而比重也与成熟度有关。我们的研究结果表明, 乌拉尔甘草硬实种子的比重重要显著高于非硬实种子, 通过液体比重法可以有效地将硬实种子与非硬实种子区分开。比重大于 1.36 的种子, 其硬实率高达 99.7% 以上; 而比重低于 1.28, 种子为非硬实种子的概率在 86.0% 以上。硬实率与比重之间存在极显著的正相关关系。液体比重分离法近年来相类似的研究很少, 只有 Kamille 等(2003)采用了冷冻胶体二氧化硅法, 用比重的差异可以将 89% 的种子从沉积物中分离出来计数, 以估计种子库中种子的数量变化, 大大提高了工作效率。采用液体比重法进行种子分选后, 需要立即将种子晾干, 工作过程相对麻烦; 因此, 近年来发展了比重清选机来进行种子分选。我们也曾尝试利用种子比重清选机进行分离, 但是效果不理想。在破除甘草硬实时, 常采用过量浓硫酸处理 40 min 或是 80% 的硫酸以 1:10 的比例处理种子 4~6 h, 可以达到很好的效果。我们所配制的分离溶液, 其最高浓度也只有 35%, 而且与种子的接触时间很短, 只有几分钟, 基本保证种子不受到损伤。不过, 该方法能否适用于其它豆类作物的硬实种子分离, 还有待于进一步研究。对于大部分种子而言, 种子的质量与比重存在显著的正相关性(颜启传 2000)。本文的结果也是如此, 随着比重的增加, 种子的千粒重、发芽率、活力等指标均显著增加。

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
- 田娟, 孙群, 王建华, 孙宝启(2007). 不同硬实程度乌拉尔甘草种子活力差异的研究. 植物生理学通讯, 43 (2): 235~240
- 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
- 颜启传(2000). 种子学. 北京: 中国农业出版社
- 颜启传, 黄亚军(1992). 种子四唑测定手册. 上海: 上海科学技术出版社
- 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
- 杨期和, 尹小娟, 叶万辉(2006). 硬实种子休眠的机制和解除方法. 植物学通报, 23 (1): 108~118
- Gurusamy C, Arya KB (2003). The pattern of seed development and maturation in beach pea (*Lathyrus maritimus*). Can J Bot, 81 (6): 531~540
- Kamille K, Hammerstrom W, Judson K (2003). A new method for estimation of *Halophila decipiens* Ostenfeld seed banks using density separation. Aquat Bot, 76: 79~86
- Ma FS, Cholewa EWA, Mohamed T, Peterson CA, Gijzen M (2004). Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. Ann Bot, 94: 213~228
- Serrato VGL, Melone MF, Bozzini A (1989). Comparative studies on testa structure of hard-seeded and soft-seeded varieties of *Lupinus angustifolius* L. (Leguminosae) and on mechanisms of water entry. Seed Sci Technol, 17: 563~581
- 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: 1367~1380