

不同硬实程度乌拉尔甘草种子的活力差异

田娟, 孙群, 王建华, 孙宝启*

中国农业大学农学与生物技术学院种子科学系, 北京 100094

摘要: 根据乌拉尔甘草种子吸胀时间的长短将种子硬实程度分为 H_0 、 H_1 、 H_2 、 H_3 、 H_4 和 H_{max} 6 个等级, 测定其活力指标; 同时于盐胁迫和水分胁迫下测定硬实和非硬实种子的发芽率、发芽指数、胚根长度及幼苗的抗氧化酶活性。结果表明: 随着硬实程度的增大, 种子的发芽率、发芽指数、胚根长度、脱氢酶活性和 ATP 含量均呈上升趋势, 丙二醛(MDA) 含量则表现出下降趋势; 在逆境条件下, 硬实种子比非硬实种子的适应能力强。硬实种子的活力高于非硬实种子, 硬实程度与种子活力呈正相关。

关键词: 乌拉尔甘草; 硬实和非硬实种子; 种子活力

Differences of Seed Vigor among Different Levels of Hard Seeds of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

TIAN Juan, SUN Qun, WANG Jian-Hua, SUN Bao-Qi*

Department of Seed Science, College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract: According to the seed imbibing time, the seeds of *Glycyrrhiza uralensis* were grouped into 6 hardness levels (H_0 , H_1 , H_2 , H_3 , H_4 and H_{max}), of which seed vigor were compared. The germination percentage, germination index, length of radicle and activities of antioxidative enzymes under salt and water stresses were compared. The result showed that the germination percentage, germination index, length of radicle, dehydrogenase activities and adenosine triphosphate content increased, malondialdehyde content decreased with the increasing of hardness level. Hard seeds were more stress-tolerant. The vigor of hard seeds was greater than that of soft seeds, and there was significant positive correlation between seed vigor and hardness in *Glycyrrhiza uralensis*.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis*; hard and soft seeds; seed vigor

乌拉尔甘草为豆科多年生草本药用植物, 是最常用中药材之一。乌拉尔甘草种子的硬实率高达 93% (乔世英等 2004)。有人研究小冠花(徐本美等 1996)、白刺花(徐本美等 1997)和刺槐(曹帮华等 2005)种子硬实现象的结果表明, 硬实程度越高, 发芽势、发芽指数、活力指数就越高, 抗逆能力越强, 表现出较高活力和优良遗传特性。甘草硬实种子的研究一般多集中在破除硬实方法上, 至于甘草硬实种子活力的研究还未见报道。本文通过测定乌拉尔甘草不同硬实程度种子的活力, 探索乌拉尔甘草种子活力与硬实程度的相关性, 确立未来种子检验规程中硬实种子的地位, 以期能为生产应用及硬实种子的种质资源保存提供参考。

材料与方法

实验材料为乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis*

Fisch.)种子于 2004 年采自内蒙古杭锦旗县, 千粒重约为 12 g。选择籽粒完整无损、色泽相似和大小均一(直径为 2.5~3 mm)的种子, 用蒸馏水浸种(室温), 使其自然吸胀。第 1 天吸胀的种子为试验中硬实程度最低的种子, 称为非硬实种子 H_0 , 未吸胀的种子继续浸泡; 第 2 天吸胀的种子称为 H_1 , 以此类推, 直至第 n 天种子吸胀率低于 2% 时的未吸胀种子视为试验中硬实程度最高的种子 (H_{max}), H_0 、 H_1 直至 H_{n-1} 种子以之代表不同硬实程度的种子。统计每天的吸胀率, 作为不同硬实程度所占总种子批的比率。预试验过程中, 种子浸泡至第 5 天时其吸胀率已低于 2%, 在此基础上,

收稿 2006-11-06 修定 2007-03-14

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

随机取相同的6批种子, 分别于第1~6天用蒸馏水浸泡, 第1天浸泡但在5天后仍未吸胀的种子为硬实种子, 将其用浓硫酸浸种60 min后再用蒸馏水浸泡1 d。第2、3、4、5、6天浸泡的种子批分别浸泡5、4、3、2、1 d后吸胀的种子分别为 H_4 、 H_3 、 H_2 、 H_1 、 H_0 , 吸胀率分别为1.49%、2.93%、4.87%、6.51%和17.8%, 然后进行发芽试验和测定相关生理生化指标。

作不同硬实程度的乌拉尔甘草种子的发芽试验时, 将不同硬实程度的种子用0.1%的次氯酸钠溶液消毒10 min, 蒸馏水冲洗数次后放在垫有2层滤纸的发芽盒(11.8 cm×11.8 cm)中, 加入7 mL蒸馏水或处理溶液, 每皿100粒, 每个处理重复3次, 置于温度为25 °C的光照培养箱(型号LRH-250-H)中进行发芽试验。从摆盘之日开始, 每天观察并记录发芽情况(以胚根突破种皮为发芽标准), 第7天测量已发芽种子的胚根长度, 计算发芽率、发芽指数。计算公式为: 发芽率=(7 d内发芽总数/试验种子数)×100%; 发芽指数= $\sum (G_t/D_t)$ (G_t : 第t天的发芽数; D_t : 相应发芽的天数)。

作抗逆试验时, 采用硬实种子(H_{max})及非硬实种子(H_0)进行盐胁迫及水分胁迫发芽试验。硬实种子发芽前处理方法同上。

盐胁迫用浓度分别为50、100、200和400 mmol·L⁻¹的NaCl溶液处理; 水分胁迫用聚乙二醇(PEG6000)溶液模拟, 浓度有10%和20% (W/V); 以蒸馏水作对照。为保证处理溶液的浓度恒定, 每2 d换1次发芽纸。其它步骤同上。在萌发7 d后, 幼苗的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase,

POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性分别用硝基四唑蓝还原法(Stewart和Bewley 1980)、愈创木酚氧化法(高文远等 1998)和紫外吸收法(邹琦 2000)测定。

TTC测定采用TTC定量法(颜启传和黄亚军 1992), ATP含量测定采用荧光素酶法(颜启传 2000), 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测定参照周琴等(2004)文中的方法

所测结果用SAS 8.2软件分析结果差异显著性。

实验结果

1 乌拉尔甘草不同硬实程度种子的比例和活力差异

表1显示:(1)第1天种子吸胀率最高, 为17.80%, 此批吸胀种子为非硬实种子(H_0), 随着天数的增加, 吸胀率逐渐降低, 第5天吸胀率仅有1.49%, 将第5天仍未吸胀的种子记为硬实程度最深的种子(H_{max})。 H_0 种子的发芽率最低, 为66.7%; 随着种子硬实程度的加深, 发芽率逐渐增加, H_{max} 种子经处理后, 发芽率最高, 达到99.3%。而且随着硬实程度的加深, 发芽指数和胚根长也呈上升趋势, H_{max} 的发芽指数分别比 H_0 ~ H_4 提高了106.2%、16.32%、12.30%、7.52%和3.64%, 表明种子的萌发速度和幼苗的健壮程度逐渐提高。

(2)种子的脱氢酶活性和ATP含量均随硬实程度加深呈显著($P>0.05$)增高的趋势, H_{max} 的脱氢酶活性和ATP含量最高; 在某种程度上间接反映了硬实种子种胚呼吸代谢的强度和能量代谢能力处于较高的水平, 是种子高活力的表现。

表1 不同硬实程度乌拉尔甘草种子的活力指标

Table 1 Vigor indexes of *G. uralensis* seeds in different hard levels

不同硬实程度的种子	占总种子批比率/%	发芽率/%	发芽指数	胚根长/cm	TTC 活性/ μg·mL ⁻¹	ATP 含量/ 10 ⁻⁹ mol·L ⁻¹	MDA 含量/ μmol·g ⁻¹
H_0	17.80	66.7 ^c	46.50 ^d	1.88 ^d	0.0018 ^d	4.3961 ^c	9.5639 ^a
H_1	6.51	91.3 ^b	81.58 ^c	2.58 ^c	—	—	—
H_2	4.87	93.3 ^b	85.39 ^{cb}	2.69 ^{cb}	0.0021 ^c	5.3101 ^b	4.6732 ^b
H_3	2.93	95.3 ^{ab}	88.25 ^b	2.90 ^b	—	—	—
H_4	1.49	96.3 ^{ab}	91.56 ^{ab}	3.28 ^a	0.0023 ^b	5.3733 ^b	3.5408 ^c
H_{max}	64.88	99.3 ^a	94.89 ^a	3.20 ^a	0.0025 ^a	6.1272 ^a	2.9820 ^c

同列不同字母表示0.05水平显著差异。—表示未测定。

(3)种子MDA含量随着其硬实程度的加深而逐渐降低, H_{max} 的MDA含量最低,一定程度上可以说明其膜脂过氧化水平低,膜受损伤程度较小。

2 盐胁迫对乌拉尔甘草硬实与非硬实种子萌发及其幼苗中SOD、POD和CAT活性的影响

表2和图1~3显示:(1)盐胁迫条件下,在NaCl浓度为0~200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, H_{max} 发芽率均维持在较高的水平;NaCl浓度为400 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,发芽率显著下降($P>0.05$),与未作NaCl处理的相

比降低26.4%。与 H_{max} 相比, H_0 的发芽率则处于较低水平,NaCl浓度为50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,发芽率最高(74.0%);之后,发芽率随着盐浓度的增高而依次降低;NaCl浓度为400 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,发芽率降至13.3%,与未作NaCl处理的相比下降73.9%。发芽指数的变化趋势与发芽率基本上一致,NaCl浓度为400 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, H_{max} 和 H_0 分别比未作NaCl处理的降低85.1%和94.6%。二者的胚根长度均随着盐浓度的增加而降低(表2)。

表2 NaCl胁迫对乌拉尔甘草种子萌发的影响

Table 2 Effect of NaCl stress on germination of *G. uralensis* seeds

NaCl 浓度 / $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	发芽率 /%		发芽指数		胚根长 /cm	
	H_0	H_{max}	H_0	H_{max}	H_0	H_{max}
0	67.0 ^a	98.7 ^a	41.23 ^b	97.06 ^a	2.16 ^a	2.86 ^a
50	74.0 ^a	99.3 ^a	51.23 ^a	97.42 ^a	2.26 ^a	2.82 ^a
100	53.3 ^b	99.3 ^a	33.87 ^c	94.94 ^a	1.81 ^b	2.51 ^a
200	51.0 ^b	99.0 ^a	24.43 ^d	74.98 ^b	1.32 ^c	1.66 ^b
400	13.3 ^c	72.7 ^b	2.21 ^e	14.46 ^c	—	—

同列不同字母表示0.05水平显著差异。—表示未测定。

(2)在相同盐胁迫条件下, H_{max} 萌发7d后幼苗的SOD、POD和CAT活性基本高于 H_0 幼苗。NaCl浓度为50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, H_{max} 和 H_0 幼苗的SOD活性最低且两者基本接近;NaCl浓度为50~200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随NaCl浓度的增高, H_{max} 和 H_0 幼苗的SOD活性均呈上升趋势,两者差异不显著

($P>0.05$);NaCl浓度达400 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, H_{max} 幼苗的SOD活性继续升高,而 H_0 的SOD活性明显降低,且 H_{max} 幼苗的SOD活性显著高于 H_0 ($P>0.05$),说明高盐胁迫对 H_0 萌发幼苗的SOD产生抑制作用,加剧膜脂过氧化(图1)。 H_{max} 幼苗POD活性在NaCl浓度为50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著提高,之后维持在较高的活力水平; H_0 幼苗POD活性随着

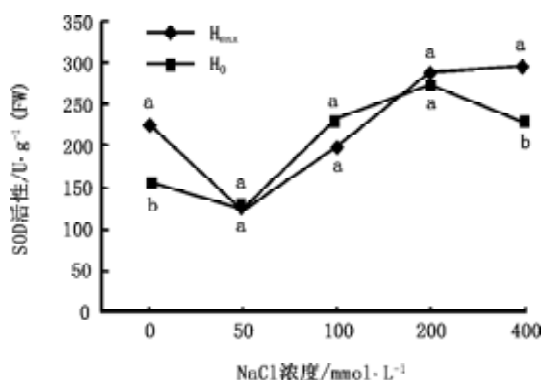


图1 NaCl胁迫对乌拉尔甘草种子幼苗SOD活性的影响

Fig.1 Effect of NaCl stress on SOD activity of *G. uralensis* seedlings

不同字母代表0.05水平显著差异。下图同此。

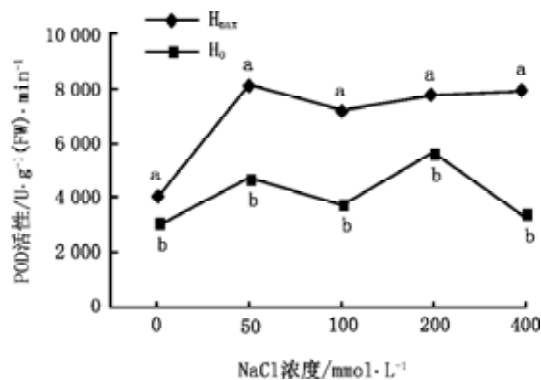


图2 NaCl胁迫对乌拉尔甘草种子幼苗POD活性的影响

Fig.2 Effect of NaCl stress on POD activity of *G. uralensis* seedlings

NaCl 浓度的增高呈双峰曲线变化(图2)。在 NaCl 浓度为 0~200 mmol·L⁻¹ 时, H_{max} 和 H₀ 幼苗 CAT 活性变化趋势基本上一致, 都是随着 NaCl 浓度的增高而上升, H_{max} 幼苗 CAT 活性略高于 H₀, 但差异不显著($P>0.05$); NaCl 浓度为 400 mmol·L⁻¹ 时, H_{max} 的 CAT 活性明显升高, H₀ 则变化不明显(图3)。这些表明: H_{max} 与 H₀ 的耐盐性存在着差异, H_{max} 的耐盐能力比 H₀ 强。

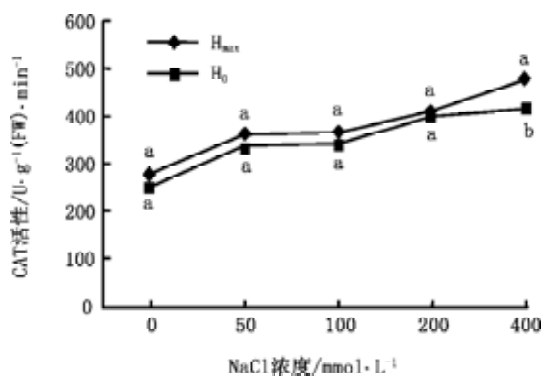


图3 NaCl胁迫对乌拉尔甘草种子幼苗CAT活性的影响
Fig.3 Effect of NaCl stress on CAT activity of *G. uralensis* seedlings

3 水分胁迫对乌拉尔甘草硬实和非硬实种子萌发及其幼苗中SOD、POD和CAT活性的影响

由表3和图4~6显示:(1)水分胁迫条件下, PEG浓度为10%时, H_{max}和H₀的发芽率与未作PEG处理的相比均无显著变化;二者的发芽指数比未作PEG处理的均显著下降;胚根长度显著增加,表明轻度水分胁迫对乌拉尔甘草种子胚根伸长有促进作用。PEG浓度为20%时, H_{max}和H₀的发芽率、发芽指数、胚根长均显著降低,发芽率分别下降15.88%和44.76%,发芽指数分别下降

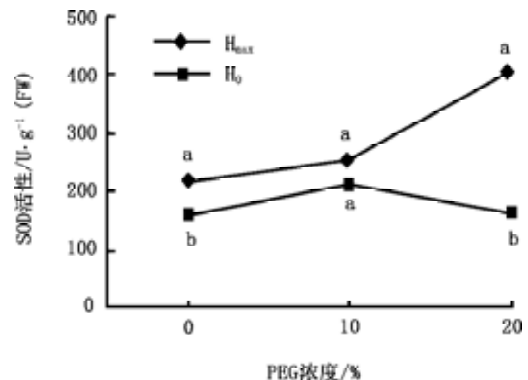


图4 水分胁迫对乌拉尔甘草种子幼苗SOD活性的影响
Fig.4 Effect of water stress on SOD activity of *G. uralensis* seedlings

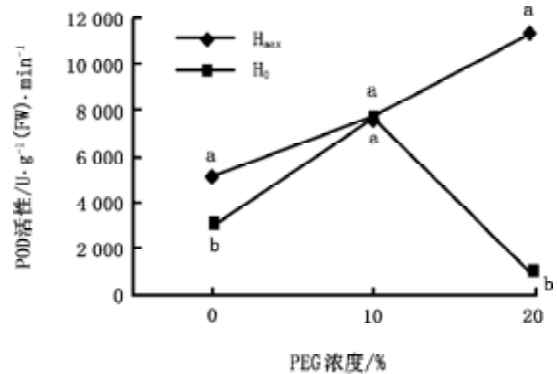


图5 水分胁迫对乌拉尔甘草种子幼苗POD活性的影响
Fig.5 Effect of water stress on POD activity of *G. uralensis* seedlings

57.31%和69.89%,胚根的长度分别下降22.61%和15.28%。从上述可见:在种子萌发过程中,水分胁迫对非硬实种子的影响更显著;硬实种子的耐旱能力比非硬实种子强(表3)。

(2)在相同水分胁迫条件下, H_{max} 萌发7 d后幼苗的SOD、POD和CAT活性同样也高于H₀幼

表3 水分胁迫对乌拉尔甘草种子萌发的影响

Table 3 Effect of water stress on seed germination of *G. uralensis* seeds

PEG 浓度 / %	发芽率 / %		发芽指数		胚根长 / cm	
	H ₀	H _{max}	H ₀	H _{max}	H ₀	H _{max}
0	70.0 ^a	98.7 ^a	48.56 ^a	97.11 ^a	2.16 ^b	3.14 ^b
10	64.0 ^a	98.3 ^a	39.25 ^b	87.72 ^b	3.06 ^a	3.70 ^a
20	38.7 ^b	83.0 ^b	14.62 ^c	41.46 ^c	1.83 ^c	2.43 ^c

同列不同字母表示0.05水平显著差异。

苗。PEG浓度为10%时, H_{max} 和 H_0 幼苗的SOD和POD活性略有增高; PEG浓度为20%时, H_{max} 萌发的幼苗的SOD和POD活性继续增高, 而 H_0 萌发幼苗的SOD和POD活性则呈下降趋势(图4和5)。 H_{max} 和 H_0 幼苗的CAT活性随PEG浓度的升高均呈下降趋势, PEG浓度为10%时, H_{max} 的CAT活性与 H_0 相比维持在较高的水平(图6)。这些表明: 在种子萌发过程中, 水分胁迫对非硬实种子的影响更显著; 硬实种子的耐旱能力比非硬实种子强。

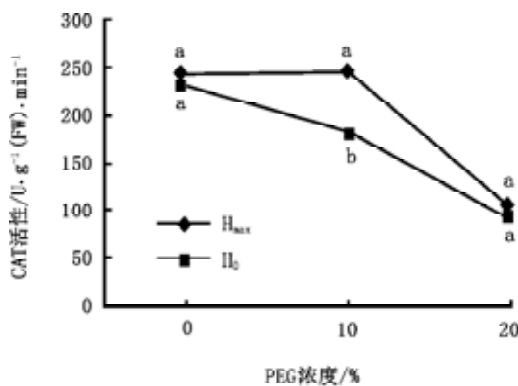


图6 水分胁迫对乌拉尔甘草种子幼苗CAT活性的影响
Fig.6 Effect of water stress on CAT activity of *G. uralensis* seedlings

讨 论

本文从种子萌发能力、幼苗生长潜力、呼吸速率、能量代谢、细胞膜受损伤程度等相关的生理生化指标变化分析, 说明不同硬实程度乌拉尔甘草种子的活力存在着差异; 硬实种子的活力高于非硬实种子, 其活力随着硬实程度的加深而不断提高的; 甘草种子的硬实程度越高, 在萌发过程中脱氢酶活性越高, ATP水平越高, 膜受损的程度越低, 发芽率和活力指数也相应的提高。这与徐本美等(1996, 1997)、曹帮华等(2005)研究的蓝花棘豆、小冠花、刺槐等植物的硬实种子得到的结果一致。

SOD、CAT和POD是防御系统中重要的保护酶, 保护生物膜系统免受活性氧自由基损伤, 一定程度上能够反映植物抵抗逆境伤害的能力(杜朝昆等2005)。一般认为, SOD、POD和CAT

的活性越高, 植物的抗逆能力越强。张木青等(1996)、蒋明义等(1992)和唐连顺等(1991)研究蔗叶和玉米的结果表明, 水分胁迫时间较短和强度较弱时, SOD活性明显上升, 当胁迫超过一定的阈值后则开始下降, 并认为植物的抗逆性越强, 阈值范围越大, 反之越小。在本文中, 硬实种子幼苗的SOD活性随着NaCl和PEG胁迫程度的加深呈上升趋势, 非硬实种子幼苗SOD活性随着NaCl和PEG胁迫程度的加深呈先上升后下降的趋势, 说明硬实种子耐盐和耐水分阈值的范围大于非硬实种子, 其在逆境条件下有较强的适应能力。硬实种子和非硬实种子萌发7d后幼苗的抗氧化酶(SOD、POD和CAT)随着盐和水分胁迫程度的加深表现出不同的变化趋势, 但在相同处理条件下, 硬实种子的POD活性显著高于非硬实种子, 在一定的胁迫强度下硬实种子的SOD和CAT活性也显著高于非硬实种子, 说明硬实种子存在着较强的保护酶调节系统。

在NaCl浓度为50 mmol·L⁻¹时, 硬实种子和非硬实种子的发芽率、发芽指数和胚根长都略高于未作NaCl处理的, PEG浓度为10%时, 硬实种子和非硬实种子的胚根长度显著增加, 这可能是较低的渗透势对种子有引发的作用。同时, NaCl浓度为50 mmol·L⁻¹时, 硬实种子和非硬实种子萌发7d后幼苗SOD活性达到最低且两者基本上接近, 高于或低于这个浓度, SOD活性均上升, 说明植物细胞活性氧处于低水平。总之, 乌拉尔甘草硬实种子和非硬实种子的抗逆性存在着差异, 前者适应逆境的能力强于后者。硬实种子内部是否存在与其抗逆性有关的物质, 还待进一步探究。

参考文献

- 曹帮华, 翟明普, 郭俊(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): 44~47
- 杜朝昆, 李忠光, 龚明(2005). 水杨酸诱导的玉米幼苗适应高温和低温胁迫的能力与抗氧化酶系统的关系. 植物生理学通讯, 41 (1): 19~22
- 高文远, 李志亮, 肖培根(1998). 甘草种子萌发初期过氧化物酶的研究. 中国中药杂志, 23 (4): 212~213
- 蒋明义, 荆家海, 王韶堂(1991). 渗透胁迫对水稻幼苗膜脂过氧化及体内保护系统的影响. 植物生理学报, 17 (1): 30~84
- 乔世英, 成树春, 王志本(2004). 中国甘草. 北京: 中国农业科技

- 术出版社, 54~56
- 唐连顺, 李广敏, 商振清, 池书敏(1992). 水分胁迫对玉米幼苗膜脂过氧化及保护酶的影响. 河北农业大学学报, 15 (2): 34~40
- 徐本美, 冯桂强, 白原生, 孙浩, 梁飞凤, 刘宝莲, 杨惠清(1996). 小冠花种子休眠与萌发的研究. 草地学报, 4 (2): 134~140
- 徐本美, 冯桂强, 张金政, 龙雅宜, 史晓华(1997). 白刺花硬实种子特性的研究. 植物学通报, 14 (2): 45~48
- 颜启传(2000). 种子学. 北京: 中国农业出版社, 116~117
- 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, 81~83
- 张木清, 陈如凯, 余松烈(1996). 水分胁迫下蔗叶活性氧代谢的数学分析. 作物学报, 22 (6): 729~735
- 周琴, 姜东, 戴廷波, 荆奇, 曹卫星(2004). 不同浓度糖氮对离体穗培养小麦粒重和叶片膜脂过氧化作用的影响. 植物生理学通讯, 40 (4): 443~446
- 邹琦(2000). 植物生理生化实验指导. 北京: 中国农业出版社, 168~169
- Stewart RRC, Bewley JD (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol*, 65: 245~248