

## 缺苞箭竹种子人工老化及不同大小种子的生理研究\*

汪海<sup>1</sup>, 张素兰<sup>2</sup>, 苏智先<sup>2\*\*</sup>, 肖开煌<sup>1</sup>, 权秋梅<sup>1</sup>

(1 西华师范大学环境科学与生物多样性保护省级重点实验室, 四川南充 637002;

2 绵阳师范学院, 四川绵阳 621000)

**摘要:** 为了解缺苞箭竹 (*Fargesia denudata* Yi) 种子的老化机理和不同大小种子间的差异, 对其进行了人工老化处理和大、中、小三组种子的区分, 并分别对种子活力, 总抗氧化能力, 酶活性, 丙二醛含量和电导率进行测定。发现经人工老化后种子活力显著降低, 电导率和丙二醛含量随老化程度加深而上升, 总抗氧化能力和过氧化氢酶活力随老化程度加深而下降, 超氧化物歧化酶的活力则出现上升的趋势, 但超氧化物歧化酶与丙二醛的比值呈现先升后降的趋势。总抗氧化能力、超氧化物歧化酶与丙二醛的比值能够很好的反映种子老化的程度和抗氧化能力的变化; 总抗氧化能力、电导率和种子活力有很好的相关性。中等大小种子活力最高, 总抗氧化能力和几种酶活性均随种子增大而提高, 丙二醛含量和电导率则随种子增大而减小, 种子大小是与各指标相关的因素。

**关键词:** 缺苞箭竹; 人工老化; 种子活力

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2007) 06-677-05

## The Effects of Accelerated Aging on *Fargesia denudata* (Gramineae) Seeds and the Physiological Differences among Seeds of Different Sizes

WANG Hai<sup>1</sup>, ZHANG Su-Lan<sup>2</sup>, SU Zhi-Xian<sup>2\*\*</sup>, XIAO Kai-Huang<sup>1</sup>, QUAN Qiu-Mei<sup>1</sup>

(1 Sichuan Provincial Key Laboratory of Environmental Science and Biodiversity Conservation, China West Normal University,

Nanchong 637002, China; 2 Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China)

**Abstract:** Seeds of *Fargesia denudata* were treated to accelerated aging and the following indices were measured: seed vigor, T-AOC, activities of anti-oxidative enzymes, contents of MDA, and conductivity, and these indices were also measured on the seeds that differ in size. The results indicated that after different degrees of accelerated aging, the contents of MDA and conductivity gradually increased, while the value of T-AOC and activities of CAT were reduced significantly. The activities of SOD went up, but the ratio of SOD/MDA went down after an initial obvious rise. T-AOC and SOD/MDA could reflect the level of seed aging well, and T-AOC and conductivity had significant correlations with seed vigor. The vigor of middle-sized seeds was higher than that of bigger and smaller seeds. The value of conductivity and contents of MDA went up as the bigger seeds were under determination, and the activities of anti-oxidative enzymes and T-AOC went down during the same process. This indicates that the size of *Fargesia denudata* seeds correlates with the indices tested in this study.

**Key words:** *Fargesia denudata*; Accelerated aging; Seed vigor

缺苞箭竹 (*Fargesia denudata* Yi) 系禾本科箭竹属植物, 是川西亚高山针叶林下层最重要的

优势种群 (齐泽民等, 2004), 属于大熊猫的主食竹种之一 (刘兴良和向性明, 1994; 吴福忠等,

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30670209); 四川省科技厅项目 (05JY029-107)

\*\* 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: zxsu@mnu.edu.cn

收稿日期: 2007-02-01, 2007-08-17 接受发表

作者简介: 汪海, 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物生理。E-mail: giganic@gmail.com

2005)。其生长周期为 50~60 年, 一次性开花结实后枯死 (秦自生等, 1996), 这种生理特性会造成竹子在大面积开花时分布面积减小, 并对大熊猫的生存产生威胁 (吴福忠等, 2005)。在这种情况下, 种子是竹子继续繁殖的重要途径, 因而对种子的活力及其老化的生理学研究也就成了人们关注的问题。人工老化通过提高种子所处环境的温度和湿度来加快种子老化的进程 (Parrish and Leopold, 1978; 田向荣等, 2003), 使人们能在较短的时间内完成对种子老化的研究 (陈晓玲等, 2001)。对不同大小种子的研究则可以帮助我们认识它们在活力等指标上的差异。已经证明多种植物种子在人工老化后种子活力、酶活性、丙二醛 (MDA) 含量和电导率等指标会随之发生变化, 并且各指标间具有一定相关性 (胡家恕等, 1999; 唐祖君和宋明, 1999; 陆美莲等, 2004), 而不同大小种子在上述指标上也存在明显差异 (Chiu 等, 2006)。通过对这些指标的分析, 有助于探明种子的老化机理以及衡量种子活力。缺苞箭竹的种子十分难得, 尚未见到有对其进行人工老化研究的报道。本文通过研究人工老化与种子大小对种子活力和各个生理指标的影响, 探讨种子老化、大小和各指标之间的关系, 为认识缺苞箭竹种子老化机理, 判断种子活力, 并利用种子进行竹子繁育提供一定的理论基础。

## 1 材料与方 法

试验于 2006 年 7 月~12 月在西华师范大学环境科学与生物多样性保护实验室中进行, 试验材料采自四川片口自然保护区, 采回后保存于 0~5 ℃ 环境中, 平均发芽率为 36%。

### 1.1 人工老化处理

将随机选取的种子分别放置在 45 ℃、50 ℃, RH100% 条件下进行人工老化, 具体做法参照文献中加速老化试验的设计 (Parrish and Leopold, 1978; 颜启传, 2001), 以恒温水浴箱为人工老化外箱, 1 000 ml 烧杯为内箱, 杯底部加水, 种子放置在杯内架子上与杯底水面保持 5~6 cm 的距离保证种子不直接与水接触, 烧杯与水浴箱分别加盖, 调整好温度后分别处理 2、4、6 d。处理完后取出, 在 25 ℃ 条件下干燥 48 h, 干燥前后分别称取种子的重量, 计算种子的干湿重量比。对照种子在未经处理的种子中随机选取。

### 1.2 不同大小种子的分组

取 400 粒种子称其质量, 最轻的 30% 为小种子, 最重的 30% 为大种子, 其余为中等大小种子, 再次挑选大小种子时按同样的标准进行。百粒种子平均重量分别为: 大种子  $1.42 \pm 0.018$  g, 中等种子  $1.16 \pm 0.014$  g, 小种子  $0.77 \pm 0.034$  g。平均水平的种子在未分大小的种子中随机选取, 百粒重  $1.10 \pm 0.013$  g。经方差分析大、中、小种子重量差异显著。

### 1.3 不同指标的测定

种子发芽试验在人工气候箱 25 ℃ 环境中进行, 以培养皿为发芽容器, 滤纸为发芽床, 加蒸馏水保持湿度, 每个样 25 粒种子, 连续观察 60 天统计发芽数量并测量幼苗长度 (mm)。

种子发芽指数  $GI = (G_t/D_t)$ , 活力指数 =  $GI \times S$ ,  $G_t$  为  $t$  日内的发芽粒数,  $D_t$  为相应的发芽日数,  $S$  为观察结束时的幼苗长度 (mm) (颜启传, 2001)。

电导率测定: 取 50 粒种子称重后用蒸馏水清洗干净, 置于 250 ml 烧杯中加 125 ml 蒸馏水, 加盖, 然后于 40 ℃ 恒温水浴箱中连续浸泡 3 天, 使用 DDS-11A 型电导率仪测定种子浸提液电导率。

电导率 ( $\mu\text{Scm}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) = 浸提液电导率 ( $\mu\text{Scm}^{-1}$ ) 种子质量 (g)

超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活力、总抗氧化能力 (T-AOC), MDA 和蛋白含量均用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定, 测定方法依次分别为羟胺法、钼酸铵法、比色法、TBA 法和考马斯亮兰法, 采用 752 分光光度计测定吸光度, 不同测定种子均取 1 g。

所有测定重复 2~3 次。指标测定后利用 SPSS11.5 软件对数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和相关性分析 (Pearson Correlation)。

## 2 结果

### 2.1 人工老化对各指标的影响

老化处理后种子的干湿重量比分别为: 45 ℃ 2 d: 86%, 4 d: 78%, 6 d: 71%, 50 ℃ 2 d: 78%, 4 d: 77%, 6 d: 73%, 可见随老化处理时间的加长种子吸收的水分增加。其它指标的测定结果见表 1, 表中以字母表示差异程度, 相同字母表示数据间无差异, 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.01$ , 下同)。从表中可知随着处理时间的延长和温度的升高种子老化程度不断加深。活力指数随老化程度的加深而下降, 处理 1、6 d 和处理 2、4、6 d 的种子已完全失去了萌发能力。

电导率值除 45 ℃, 6 d 外均随老化程度的加深而上升, 50 ℃ 不同处理时间的电导率值差异显

表 1 人工老化处理后各指标测定值

Table 1 Levels of different indices of *Fargesia denudatae* seeds before and after accelerated aging

处理 Treatments	种子活力指数 Seed vigor index	电导率 Conductivity ( $\times 10^2 \mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$ )	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/mgprot)	SOD/MDA	T-AOC (U/mgprot)	CAT (U/mgprot)
处理 1 (45 )							
时间 Time							
0 d	4.43 C	0.32 AC	487.13 A	7.28 B	66.91 AB	58.83 B	8.79 B
2 d	1.63 B	0.63 BC	629.90 B	3.34 A	188.53 BB	53.53 B	17.84 D
4 d	0.81 A	0.74 CC	740.43 C	5.88 B	125.92 AB	29.41 A	14.14 C
6 d	0 A	0.68 BC	749.51 C	12.72 C	58.92 AB	25.37 A	3.36 A
处理 2 (50 )							
时间 Time							
0 d	4.43 C	0.32 A	487.13 B	7.28 BB	66.91 AB	58.83 D	8.79 A
2 d	0.95 B	0.58 B	417.06 A	5.39 AB	104.75 BB	39.63 C	23.12 D
4 d	0 A	0.68 C	408.70 A	7.48 AB	71.64 AB	25.13 B	10.64 B
6 d	0 A	0.79 D	457.69 B	9.65 BB	56.82 AB	14.75 A	5.32 C

著；SOD 在 45 条件下 2 d 时开始显著上升，在 50 时有所下降，但 6 d 时又有小幅度上升；两种温度条件下的 MDA 含量 2 d 时最低，6 d 时达到最大，总体呈现先下降后上升的趋势；SOD/MDA 的变化趋势与 MDA 正好相反；T-AOC 在 40 条件下 4 d 时开始显著下降，之后变化不显著，而在 50 条件下不同处理时间之间的 T-AOC 值差异均显著，随老化程度的加深下降明显；试验测定出的 CAT 活力较低，在两种温度的老化处理下均在 2 d 时有所上升随后下降，且各处理间差异显著。以上结果显示人工老化处理导致种子活力指数显著下降，脂膜过氧化反应的产物 MDA 增加，抗氧化体系活力下降，老化程度越深对种子的破坏越大。

## 2.2 相关性分析

对人工老化后所得结果进行相关性分析后发现（表 2）电导率、MDA 同老化时间显著正相关，T-AOC、CAT、SOD/MDA 和老化时间显著负相关，SOD 变化和老化时间的相关性不显著。其中 T-AOC 和 MDA 与老化时间的相关性分别达到 0.83 和 -0.87。种子活力和电导率、T-AOC 呈极显著相关，与其它指标相关性不显著。各个指标之间，SOD/MDA 和 MDA 间相关性达到显著水平，T-AOC 和 SOD/MDA，T-AOC 与电导率的相关性都达到了极显著水平。

## 2.3 种子大小对种子活力和各指标的影响

不同大小种子各指标测定结果见表 3。

从结果可以看出中等大小种子的活力最大，

表 2 各指标与老化时间 种子活力 T-AOC 和 SOD/MDA 间的相关系数

Table 2 Pearson Correlation between all indices and accelerated aging time (AT) seeds vigor (SV) T-AOC and SOD/MDA

项目 Items	活力指数 Vigor index	电导率 Conductivity	SOD	MDA	SOD/MDA	T-AOC	CAT
老化时间 (AT)	-0.86**	0.72**	0.22	0.83**	-0.64**	-0.87**	-0.72**
种子活力 (SV)	-	-0.93**	-0.12	-0.18	0.07	0.84**	-0.07
T-AOC	-	-0.70**	0.13	-0.56*	0.67**	-	0.49*
SOD/MDA	-	-0.56*	0.18	-0.69*	-	0.67**	0.42

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level. \* Correlation is significant at the 0.05 level

表 3 不同大小种子各指标测定值

Table 3 Levels of different indices of *Fargesia denudata* seeds in different size

种子大小 Seeds size	种子活力指数 Seed vigor index	电导率 Conductivity ( $\times 10^2 \mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$ )	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/mgprot)	SOD/MDA	T-AOC (U/mgprot)	CAT (U/mgprot)
平均 Random sample	4.43 B	0.32 A	487.13 B	7.28 AB	66.91 B	58.83 B	8.79 AB
大 Big size	2.24 A	0.35 A	642.48 D	8.90 AB	47.75 B	66.11 D	11.42 BC
中 Middle size	7.37 C	0.38 A	597.99 C	10.14 BB	58.99 B	65.02 C	12.33 CB
小 Small size	5.05 B	0.55 B	458.60 A	14.66 CB	31.27 A	51.67 A	9.86 AB

小种子次之，大种子最小，大中小种子活力差异显著。平均和大、中种子在电导率、SOD/MDA两个指标上差异不显著，小种子在这两个指标上则分别显著大于和小于前三者。MDA 含量随种子大小的减小而增大，T-AOC 和各酶活性在不同大小种子间也具有一定差异。可见种子大小对于缺苞箭竹种子来说是与其活力等指标相关的因素。

### 3 讨论

人工老化处理后缺苞箭竹种子的活力下降明显，有 3 个处理的种子完全失去萌发能力，说明高温高湿对其有很大危害，因此在保存中应避免这样的环境，以免种子过早老化。

关于种子的老化机理，一般认为脂膜过氧化是一个重要原因（谷建田等，1998；胡家恕等，1999；李鑫和王倩，2005）。当种子在老化过程中产生自由基和过氧化物等有害物质的速率超过了抗氧化系统对它们的清除速度时，就会对膜脂，蛋白质和核酸产生破坏，导致抗氧化能力和种子活力降低（唐祖君和宋明，1999；Chiu 等，2006），同时膜透性增大电导率上升（Parrish and Leopold, 1978）。自由基还会自身氧化形成 MDA 并不断积累（陈鹏等，2005），MDA 含量上升是脂质过氧化反应增加的标志（Jiang 等，2001）。本实验得出电导率和 MDA 含量随老化程度的加深而上升并与老化程度正相关。根据以上理论这正说明了缺苞箭竹种子在老化过程中由于脂膜过氧化作用加剧而遭到破坏，膜透性增大。

T-AOC 代表了机体防御体系抗氧化能力的强弱。对紫锥菊（*Echinacea purpurea*）的研究发现 T-AOC 随老化程度的加深而下降，并与种子的活力有很好的相关性（Chiu 等，2006）。与上述研究结果相似，缺苞箭竹种子在遭受老化侵害后 T-AOC 明显下降，50%，6 d 时的 T-AOC 值仅为未老化时的 25.1%，充分说明种子抗氧化能力的减弱。T-AOC 与 MDA 和电导率负相关，并分别达到了显著和极显著水平，反映了种子在老化过程中抗氧化能力下降和种子所受到的侵害不断加强之间的关系。由于 T-AOC 和种子活力、老化时间以及各个指标间良好的相关性，因此可作为反映种子老化程度的指标。

SOD 和 CAT 分别是机体中清除氧自由基和

过氧化氢的保护酶（Bailly 等，2001；蔡传杰等，2003）。在一些研究中 SOD 和 CAT 活性随老化程度的加深而下降（谷建田等，1998；唐祖君和宋明，1999），但在对高羊茅（*Festuca arundinacea*）种子和早熟禾（*Poa pratensis* L.）的研究中发现，人工老化初期的轻微处理可以刺激 SOD 的上升，这是防止遭受自由基侵害的一种反应（浦心春等，1998；Jiang 等，2001）。在本研究中，老化种子的抗氧化能力不断下降但 SOD 和 CAT 酶的活性都出现过上升的趋势，这可能也是上述原因所导致。另外 SOD 和 CAT 只是种子抗氧化体系中的一个组成部分，其活性大小与种子活力并没有直接的关系。SOD 是本研究中唯一与老化时间不相关的指标，其活力在更多不同老化处理条件下的变化还有待进一步研究。基于以上原因本文尝试使用 SOD/MDA 来表示 SOD 活力变化对种子抗氧化能力的影响，所得结果与多个指标具有显著相关性，其比值先上升后下降的变化趋势正好与 MDA 含量的变化相对应，一方面可以作为 MDA 在 2 d 时较低的原因，另一方面也说明种子的抗氧化能力最终是呈下降的趋势。

种子大小是其质量的一个重要指标（Chiu 等，2006）。在对红菜苔（*Brassica campestris* L.）（李锡香和胡淼，1995），玉米（*Zea mays* L.）（石海春等，2005），紫锥菊（Chiu 等，2006）种子的研究中发现种子的大小与活力相关，紫锥菊种子 MDA 含量随种子的增大而减小，而总抗氧化能力以及酶的活性则呈现相反的变化趋势。在本研究中，MDA 含量、总抗氧化能力和酶活力的变化与上述研究相同。但在上述研究中种子活力均是大种子大于小种子，这是因为小种子的饱满度低，营养提供不充分（Chiu 等，2006）。产生这种差异的原因除品种间可能具有差异外主要是对活力计算方法的不同。在上述对玉米和红菜苔的研究中种子的活力用发芽率和幼苗长度或重量的乘积表示，而在本研究中则用发芽指数和幼苗长度的乘积表示。缺苞箭竹大种子的发芽率与中小种子相比并无明显差异，是由于其发芽所需的时间较长而造成得出的活力值较低。同时大种子的酶活性高而活力较低也说明了种子活性是与酶活性和营养物质等提供程度等众多因素相关的复杂过程。

从以上的结论可以看出，高温高湿条件会对缺苞箭竹种子的活力产生严重影响，加速了种子的老化。脂质过氧化是其老化的重要原因，它导致种子电导率和 MDA 含量上升，抗氧化能力下降。T-AOC 和 SOD/MDA 能够很好的反映出缺苞箭竹种子的活力、老化的程度和抗氧化能力的变化。缺苞箭竹种子的大小是与活力和酶活性等指标相关的重要因素，中等种子的活力大于大、小种子。不同大小种子抗老化能力的差异还有待进一步研究。

致谢 绵阳师范学院生命科学与工程系的付之屏老师，生命科学学院的王琼老师及外国语学院的 Todd Hanson 对本研究及本文的写作提供了很大帮助。

### 〔参 考 文 献〕

- 颜启传, 2001. 种子学 [M]. 北京: 中国农业出版社
- Bailly Christophe, Audigier Catherine, Ladonne Fabienne *et al.* 2001. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality [J]. *J Exp Bot*, **52** (357): 701—708
- Cai CJ (蔡传杰), Chen SN (陈善娜), Yin M (尹梅) *et al.* 2003. Effects of salicylic acid on some enzyme activities related to stress resistance and content of MDA in *Vanilla planifolia* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **25** (6): 700—704
- Chen XL (陈晓玲), Lu XX (卢心雄), Chen SP (陈叔平), 2001. Comparative study on three artificial aging methods in evaluating the storability of common Cowpea seeds [J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), **34** (2): 219—222
- Chen P (陈鹏), Li YH (李玉红), Wang Q (王绮), 2005. Studies on aging-resistance of sweet corn seeds with different moisture contents and its mechanism [J]. *J Northwest Sci-Tech Univ Agric Forest* (西北农林科技大学学报), **33** (4): 79—82
- Chiu KY, Chuang SJ, Sung JM, 2006. Both anti-oxidation and lipid-carbohydrate conversion enhancements are involved in priming-improved emergence of *Echinacea purpurea* seeds that differ in size [J]. *Sci Hort*, **108**: 220—226
- Gu JT (谷建田), Fan SX (范双喜), Song XF (宋学锋) *et al.* 1998. Studies on catalase activity in aging of tomato seeds [J]. *Acta Agric Boreali-Sin* (华北农学报), **13** (2): 112—116
- Hu JS (胡家恕), Zhu C (朱诚), Zeng GW (曾广文) *et al.* 1999. Effect of aging-resistance of ultradried Safflower seeds and its mechanism [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **25** (2): 171—177
- Jiang YW, Huang BR, 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season Turfgrasses in relation [J]. *Crop Sci*, **41**: 436—442
- Liu XL (刘兴良), Xiang XM (向性明), 1994. A preliminary study of biological and phenological features of *Fargesia denudata* [J]. *Sichuan Forestry Sci Technol* (四川林业科技), **15** (4): 24—32
- Lu ML (陆美莲), Liang GS (梁关生), Qiao AM (乔爱民) *et al.* 2004. Analysis of the correlation among the vigor indices and field emergence of Chinese Kale aging seeds [J]. *Seed* (种子), **23** (4): 45—47
- Li X (李鑫), Wang Q (王倩), 2005. The effect of different water content on vigor of Welsh onion seeds [J]. *Seed* (种子), **24** (4): 12—15
- Li XX (李锡香), Hu M (胡淼), 1995. Effects of seed size and seed coat colour on seed quality and yield of flower stalks from plants in *Brassica campestris* L. var. *purpurea* Bailey [J]. *Seed* (种子), **1**: 16—20
- Parrish David J, Leopold A Carl, 1978. On the mechanism of aging in Soybean seeds [J]. *Plant Physiol*, **61**: 365—368
- Pu XC (浦心春), Han JG (韩建国), Mao PS (毛培胜) *et al.* 1998. Effects of accelerated aging on the physiological and biochemical characters of Tall Fescue seed [J]. *Acta Agrest Sin* (草地学报), **6** (3): 191—196
- Qi ZM (齐泽民), Wang KY (王开运), Yang WQ (杨万勤) *et al.* 2004. Ecological studies on Bamboo (*Fargesia*) Communities [J]. *Globe Sci* (世界科技研究与发展), **26** (1): 73—78
- Qin ZS (秦自生), Taylor AH (艾伦·泰勒), Liu J (刘捷), 1996. Regeneration of Bamboo and trees in the canopy gap in the habitat of the giant panda [J]. *J Sichuan Teach Coll* (四川师范学院学报), **17** (4): 45—48
- Shi HC (石海春), Ke YP (柯永培), Liu F (刘帆) *et al.* 2005. The comparative research on the seed vigor of different sizes seeds of Maize [J]. *Seed* (种子), **24** (4): 37—39
- Tang ZJ (唐祖君), Song M (宋明), 1999. Physiological and biochemical analysis of artificially aged chinese Cabbage [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), **26** (5): 319—322
- Tian XR (田向荣), Ouyang XZ (欧阳学智), Song SQ (宋松泉), 2003. Programmed cell death during seed development and germination [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **25** (5): 579—588
- Wu FZ (吴福忠), Wang KY (王开运), Yang WQ (杨万勤) *et al.* 2005. Effects of *Fargesia denudata* density on its biomass distribution pattern [J]. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **16** (6): 991—995