

不同处理对刺槐种子超弱发光的影响

赵慧娜, 翟明普, 高荣孚, 张祥雪 (北京林业大学, 北京 100083)

摘要 对萌发过程中刺槐种子的超弱发光值进行测定, 研究不同试剂对刺槐种子超弱发光的影响。结果表明, 加入试剂后不同活力种子的超弱发光值变化很大; 脂质过氧化是种子超弱发光的重要原因。

关键词 刺槐; 超弱发光; 种子活力; 脂质过氧化

中图分类号 S718.43 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)25-12267-03

Effects of Different Treatments on Superweak Luminescence of *Robinia pseudoacacia* Seeds

ZHAO Hui-na et al (Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract Determined the superweak luminescence value of *Robinia pseudoacacia* seeds in their germination process and studied the effects of different reagents on superweak luminescence of *R. pseudoacacia* seeds. The results showed that the superweak luminescence value of different vigor seeds changed greatly after reagent was added. Lipid peroxidation was an important reason of seed superweak luminescence.

Key words *Robinia pseudoacacia*; Superweak luminescence; Seed vigor; Lipid peroxidation

种子是农林生产中最基本的生产资料之一, 种子活力被认为是种子质量的重要指标之一^[1], 目前, 种子活力测定日益引起国内外学者的广泛重视。但由于种子活力的复杂性, 目前还没有建立快速、准确、标准化的测定方法^[2]。近年来, 超弱发光为种子活力的准确检测提供了可能。

生物超弱发光 (Bio-photon Emission or Ultra-weak Bioluminescence, BPE or UWL) 是生物体进行新陈代谢过程中细胞自发辐射的极其微弱的光子流, 以及细胞受到外界激发在激发光消失后仍保持的极其微弱的延迟发光, 其强度仅为 $1 \sim 10^4$ 光子/($\text{cm}^2 \cdot \text{S}$)^[3], 波长为 200 ~ 800 nm^[4]。种子超弱发光主要通过自由基和有丝分裂发光, 自由基是种子代谢过程中产生的, 它与种子新陈代谢及解毒保护等密切相关; 而有丝分裂过程发光不仅与 DNA、RNA 的含量有关, 也与其在分裂过程中的状态有关, 即与细胞生长分裂相关联^[5-9]。种子超弱发光可反映种子的生命活动信息, 作为一个灵敏的生物物理指标来表征种子的状态^[10], 所以从理论上讲, 种子活力与种子超弱发光关系密切, 测量超弱发光是检测种子活力的便捷而有效的途径, 因此开展种子超弱发光研究具有十分重要的理论意义和实用价值。笔者对刺槐种子进行了不同处理, 并全面分析了萌发期及不同处理种子超弱发光的变化规律, 探讨分析了种子活力与超弱发光的关系, 以期对相关研究提供参考。

1 材料与方

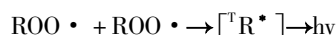
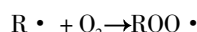
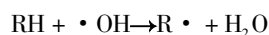
1.1 材料与仪器 当年采收的刺槐 (*Robinia pseudoacacia*) 种子, 记作刺槐 N, 产地北京市; 布袋干藏的 1963 年采收的刺槐种子, 记作刺槐 O, 产地山东。生物超弱发光检测器为自制的同步单光子计数器, 经测试, 该仪器测量数据准确有效。

1.2 方法

1.2.1 发芽率与发芽势测定。 分别称取刺槐 N 和刺槐 O 净种 200 粒, 浸泡于 100 ml、80 °C 的水中。24 h 后取出分成 4 组, 每组 50 粒, 用 0.2% 的福尔马林液浸种消毒, 置于 23 °C 恒温发芽箱中发芽。3 次重复。第 5 天测定种子发芽势, 第 10 d 统计种子发芽率。

1.2.2 刺槐新老种子萌发期的超弱发光测定。 将刺槐干种子置于比色皿中, 使干种子高度为 3.5 cm, 放入光子计数器的测量室测其发光值作为干种子的超弱发光, 与萌发期超弱发光值进行比较。刺槐新老种子放入发芽箱后, 每隔一定时间分别放入光子计数器中测量其超弱发光值。为了消除光照诱导样品产生的激发光对测量结果的干扰, 将所有样品放入测量室暗适应 4 min 后再测量 240 s (有效测量时间 100 s) 的斩光计数值。

1.2.3 加入化学试剂后刺槐种子超弱发光值的测量。 活性氧中的羟自由基可引发脂质过氧化^[11], 产生的过氧化自由基可形成 1 种三重激发态的过氧化物, 其退激时会产生超弱发光^[9], 即:



其中, RH 为不饱和脂肪酸; R· 为去氢自由基; ROO· 为脂肪酸过氧自由基; $^1\text{R}^*$ 为三重激发态的过氧化物。

H_2O_2 与 Fe^{2+} 可生成 Fenton 试剂, 通过金属离子偶联反应产生羟自由基 ($\cdot\text{OH}$)。生物体中产生的超氧化物自由基在 Fe^{3+} -螯合物存在时通过 Fenton 型 Haber-Weiss 反应也可产生羟自由基^[12]。同时, H_2O_2 与 KMnO_4 作为氧化剂可加速脂质过氧化反应, 而维生素 C (Vc) 作为一种抗氧化剂, 可清除活性氧自由基。在有遮光的环境中, 将萌发过程中剥皮后的种子或种子匀浆放入边长 1 cm 的比色皿中, 分别加入 H_2O_2 、 KMnO_4 、 FeSO_4 、Fe-EDTA 及 Vc, 再将比色皿放入测量室, 检测种子或种子匀浆的超弱发光值, 并与相应对照组种子超弱发光值进行比较。

试验结果取 3 次重复的平均值。

2 结果与分析

2.1 刺槐新老种子发芽率测定结果 为了使试验结果具有鲜明的对比性, 该试验采用的老种子为干藏了几十年的种子。由表 1 可知, 刺槐老种子的发芽率、发芽势明显低于新种子, 新老种子的种子活力具有明显差异。这与不同储藏时间沙罗双树 (*Shorea robusta*) 和烟草、黄瓜、辣椒的种子发芽率的差异相一致^[2]。

2.2 刺槐新老种子萌发期的超弱发光差异 不同年代采收

作者简介 赵慧娜 (1985 -), 女, 河南商丘人, 硕士研究生, 研究方向: 生物电子。

收稿日期 2009-05-04

种子的超弱发光值存在差异(图1)。

表1 新老刺槐种子的发芽率

Table 1 The germination rate of *R. pseudoacacia* seeds with different ages

种子 Seed	发芽天数 Germinating days//d	发芽势 Germination energy//%	发芽天数 Germinating days//d	发芽率 Germination percentage//%	离差 Devi- ation
刺槐 N <i>R. pseudo-</i> <i>acacia</i> N	5	68	10	86	8
刺槐 O <i>R. pseudo-</i> <i>acacia</i> O	5	2	10	5	6

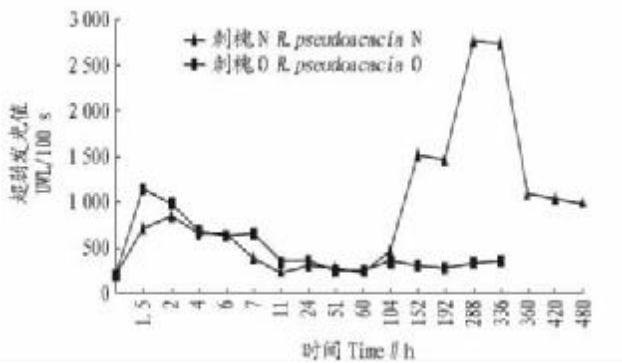


图1 刺槐新老种子萌发期的超弱发光比较

Fig. 1 The comparison of ultra-weak luminescence (UWL) of *R. pseudoacacia* seeds with different ages in germination period

从萌发期刺槐种子的发光曲线可知,高活力新种子的超弱发光曲线为明显的双峰曲线。这与小麦种子^[13]、苜蓿种子^[14]、花生种子^[15]、豌豆种子^[16]、火柴头种子^[17]、加拿大一枝黄花种子^[18]等萌发时的发光曲线一致。低活力老种子不出现第2发光峰。种子萌发初期以营养物质的分解为主要特征,其中不饱和脂肪酸氧化产生的自由基间的复合为主要发光源。随着种子生长,细胞分裂活动加强,所以第2发光峰的出现与超弱发光的另一辐射源——有丝分裂有关^[19]。1963年采收的刺槐种子活力较低,只发生有机物分解而不出现与萌发有关的有丝分裂,因此该批种子不会产生第2发光峰。

2.3 加入化学试剂后新老种子超弱发光的变化

2.3.1 H₂O₂ 处理对刺槐新种子超弱发光的影响。浸水后8、24、48 h取10粒剥去种皮的种子测量其超弱发光值,浸水后120 h选取5粒已发芽的种子(使其重量与浸水后24 h的10粒种子重量相似)测量其超弱发光值。由表2可知,种子萌发初期加入H₂O₂对种子发光的增强效果较强。种子萌发初期氧化底物较多,说明此时的发光源主要是活性氧及其产物,而种子萌发后期,种子超弱发光为细胞有丝分裂过程等导致的发光^[19]。

2.3.2 Vc 处理对刺槐新老种子超弱发光的影响。由表3可知,刺槐老种子浸入Vc后的超弱发光值比未浸入Vc的老种子衰减4.7倍,而新种子浸入Vc后超弱发光值的衰减倍数相对较小。Vc为抗氧化剂,具有清除自由基的作用。因而使种子超弱发光有不同程度的降低,且随着种龄的延长,Vc对刺槐种子超弱发光的抑制作用增强。

表2 H₂O₂ 对不同萌发期种子超弱发光的影响

Table 2 Effects of H₂O₂ on UWL of new *R. pseudoacacia* seeds in different germination periods

浸水后 时间//h The time after immersing in water	超弱发光值 光子/100 S UWL	加0.5% H ₂ O ₂ 后的发光值 光子/100 S UWL after adding 0.5% H ₂ O ₂	发光增加 倍数//倍 The increase in multiples of UML
8	350	70 120	200.3
24	291	37 132	128.3
48	300	28 192	94.0
120	1 097	38 143	34.8

表3 Vc 对浸水后刺槐新老种子超弱发光的影响

Table 3 Effects of Vc on UWL of *R. pseudoacacia* seeds with different ages

处理 Processing	加2.5 ml 1% H ₂ O ₂ 后的发光值 光子/100 s UWL after adding 2.5 ml 1% H ₂ O ₂	浸入Vc后发 光衰减倍数//倍 The attenuation multiples of UWL after immersing in Vc
刺槐 O 浸水 5 h 后浸 1% Vc 6 h <i>R. pseudoacacia</i> O seeds were immersed in water for 5 h, then in 1% Vc for 6 h	6 597	4.7
刺槐 O 浸水 11 h <i>R. pseudoacacia</i> O seeds were immersed in water for 11 h	31 147	
刺槐 N 浸水 5 h, 浸 1% Vc 6 h <i>R. pseudoacacia</i> N seeds were immersed in water for 5 h, then in 1% Vc for 6 h	12 532	3.3
刺槐 N 浸水 11 h <i>R. pseudoacacia</i> N seeds were immersed in water for 11 h	40 835	

2.3.3 H₂O₂ 和 Fe-EDTA 处理对刺槐干种粉末超弱发光的影响。在刺槐干种粉末中加入4 ml 2%的H₂O₂和0.4 ml 0.5%的Fe-EDTA,检测其发光值的变化。由表4可知,加入试剂后新老种子的发光强度增加较明显,但新种子加入试剂后发光值的变化远大于老种子的变化值。活力差的老种子的干种子发光较强,可能是因为其清除自由基的能力较差,如SOD、CAT的酶活性较低等,产生自由基积累,所以发光较强^[20-21]。

表4 H₂O₂ 和 Fe-EDTA 对刺槐干种粉末发光强度的影响

Table 4 Effects of H₂O₂ and Fe-EDTA on UWL of the powder of *R. pseudoacacia* dry seeds

种子 Seeds	干种粉末发光 值//光子/100 s The powder of dry seeds	加入试剂发光 值//光子/100 s Adding reagents	发光增加倍 数//倍 The increase multiples of UML
刺槐 O <i>R. pseudoacacia</i> O	2 042	11 838	5.8
刺槐 N <i>R. pseudoacacia</i> N	741	84 396	113.8

2.3.4 Fe-EDTA 处理对刺槐新老种子超弱发光的影响。Fe-EDTA可产生更多的羟自由基,促进脂质过氧化反应。由表5可知,浸水后加入Fe-EDTA,刺槐新种子的发光强度明显大于老种子。但其发光增加倍数小于老种子。

2.3.5 KMnO₄ 与 H₂O₂ 处理对刺槐新种子超弱发光的影响。刺槐新种子浸水8 h后分别加入2 ml 1%的KMnO₄和2 ml 0.5%的H₂O₂,测量其超弱发光值。

由表6可知,在刺槐新种子中只加入H₂O₂对发光的增强效果较好。这是因为H₂O₂不仅提供了脂类过氧化所需的O₂,而且植物体内的Fe-复合物与H₂O₂反应可生成引发脂类

过氧化的羟自由基。这说明脂类过氧化是种子超弱发光的重要原因。

表 5 H₂O₂ 和 Fe-EDTA 对刺槐浸水种子超弱发光的影响

Table 5 Effects of H₂O₂ and Fe-EDTA on UWL of *R. pseudoacacia* seeds

种子 Seed	浸水 7 h 后加 2.5 ml 1% H ₂ O ₂ 的发光值 光子/100 s Adding 2.5 ml, 1% H ₂ O ₂ after seeds were immersed in water for 7 h	浸水 6 h, 加 0.5% Fe-EDTA 1 h 后, 加 2.5 ml 1% H ₂ O ₂ 的发光值 光子/100 s Adding 2.5 ml, 1% H ₂ O ₂ after seeds were immersed in water for 6h and in 0.5% Fe-EDTA for 1 h	发光 增加 倍数 The increase multiples of UML
刺槐 O (7 粒) <i>R. pseudoacacia</i> O (7 seeds)	30 173	86 365	2.9
刺槐 N (7 粒) <i>R. pseudoacacia</i> N (7 seeds)	66 145	108 653	1.6

表 6 H₂O₂ 与 KMnO₄ 对刺槐新种子超弱发光的影响

Table 6 Effects of H₂O₂ and KMnO₄ on UWL of new *R. pseudoacacia* seeds

处理 Processing	每隔 1 s 测 21.6 s 计数//光子 The count of 21.6 s every other second				
10 粒加 2 ml 1% KMnO ₄ 10 seeds added with 2 ml 1% KMnO ₄	1 670	842	642	421	321
10 粒加 2 ml 0.5% H ₂ O ₂ 10 seeds added with 2 ml 0.5% H ₂ O ₂	8 172	6 613	5 301	5 136	4 958

2.3.6 FeSO₄ 与 Fe-EDTA 处理对刺槐新种子超弱发光的影响。由表 7 可知, Fe-EDTA 对刺槐新种子超弱发光的增强效果较 FeSO₄ 好, 这是因为 FeSO₄-H₂O₂ 混合液产生羟自由基的效率较低, Fe-EDTA 和 H₂O₂ 混合液产生的羟自由基较多, 可增强脂类过氧化反应。

表 7 FeSO₄ 与 Fe-EDTA 对刺槐新种子超弱发光的影响

Table 7 Effects of FeSO₄ and Fe-EDTA on UWL of new *R. pseudoacacia* seeds

处理 (刺槐 N 7 粒) Processing (<i>R. pseudoacacia</i> N 7 seeds)	加 2.5 ml 1% H ₂ O ₂ 后的发光值//光子/100 s Adding 2.5 ml 1% H ₂ O ₂
浸水 7 h Immersed in water for 7 h	66 145
浸水 6 h 后浸 0.5% FeSO ₄ 1 h Immersed in water for 6 h and in 0.5% FeSO ₄ for 1 h	48 658
浸水 6 h 后浸 0.5% Fe-EDTA 1 h Immersed in water for 6 h and in 0.5% Fe-EDTA for 1 h	108 653

3 结论

种子从生理成熟开始即进入劣变过程, 贮藏时间越长, 种子活力越差。所以, 老种子的活力较新种子差, 其发芽率

与发芽势较低。从萌发期刺槐种子的发光曲线可知, 高活力新种子的发光曲线为明显的双峰曲线, 低活力老种子不出现第 2 发光峰。

综上所述, 不同种龄种子的超弱发光值和加入试剂后的发光增强倍数不同。抗氧化剂 Vc 可抑制种子发光, 而 H₂O₂、KMnO₄、FeSO₄、Fe-EDTA 可极大的促进种子发光, 这说明脂类过氧化是种子超弱发光的重要原因。

超弱发光不稳定, 且发光强度较小^[22]。在测量时加入合适的、定量的试剂增强发光, 稳定发光值, 可降低对测量仪器的要求, 减少种子自身发光的不确定性和复杂性对其超弱发光值的影响, 使测量更加容易, 同时可定性了解种子活力的相对大小。

参考文献

- [1] 颜启传. 种子检验原理和技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2001: 96.
- [2] 周爱清, 罗顺. 种子活力 [M]. 北京: 农业出版社, 1990: 70 - 102.
- [3] 吕可诚, 张春平, 张光寅, 等. 生物光子学进展 [J]. 光子学报, 1997, 26 (12): 1123 - 1129.
- [4] 聂继生, 彭运生. 生物超弱发光及其应用研究概述 [J]. 激光生物学报, 1998, 7 (2): 124 - 130.
- [5] RUTH B. Experimental investigations on ultraweak photon emission [M]// POPP F A, WARNKE U, KÖNIG H L, et al. Electromagnetic bio-information. München, Urban und Schwarzenberg, 1979: 128 - 143.
- [6] POPP F A. Coherent photon storage of biological systems [M]// POPP F A, WARNKE U, KÖNIG H L, et al. Electromagnetic bio-information. München, Urban und Schwarzenberg, 1979: 144 - 167.
- [7] LI K. Coherent radiation from DNA molecules [M]// POPP F A, LI K H, GU Q. Recent advances in biophoton research and its applications. Singapore-London: World Scientific Publishing Co., 1992: 157 - 195.
- [8] POPP F A, LI K H, GU Q. Recent advance in biophoton research and its applications [M]. Singapore: World Scientific Publishing Company, 1992: 1 - 46.
- [9] 习岗. 植物超弱发光及其在农业上的应用 [J]. 物理, 1994, 23 (9): 548 - 552.
- [10] 李韶山, 王艳. 萌发花生种子超弱发光的研究 [J]. 光子学报, 2000 (11): 966 - 969.
- [11] 王继江, 韩俊英. 生物超弱发光机制及其检测方法研究进展 [J]. 广东工业大学学报, 2000, 17 (1): 50.
- [12] 蒋明义. 水分胁迫下植物体内·OH 的产生与细胞的氧化损伤 [J]. 植物学报, 1999, 41 (3): 229 - 230.
- [13] 周禾, 杨起简. 成熟小麦抗穗发芽能力与超弱发光关系的研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22 (3): 241 - 244.
- [14] 周禾, 杨起简. 盐胁迫下苜蓿种子超弱发光特征研究 [J]. 北京农学院学报, 1996, 11 (7): 102 - 105.
- [15] 李韶山, 王艳, 郭周义, 等. 萌发花生种子超弱发光的研究 [J]. 光子学报, 2000, 29 (11): 966 - 969.
- [16] 杨起简, 周禾, ПОГОСЯН СИ. 不同钠盐胁迫对豌豆幼苗超弱发光的影响 [J]. 核农学报, 2003, 17 (2): 111 - 114.
- [17] 金银根, 耿志明, 何井瑞, 等. 火柴头 4 种种子萌发过程中的超弱发光特性研究 [J]. 杂草科学, 2006 (4): 13 - 15.
- [18] 沈云霞, 何井瑞, 魏传芬, 等. 加拿大一枝黄花种子萌发过程中的超弱发光特性研究 [J]. 杂草科学, 2007, 21 (1): 26 - 29.
- [19] 周禾, 杨起简. 不同类型植物种子在萌发期的超弱发光研究 [J]. 生物物理学报, 1996, 12 (1): 157.
- [20] 陈少裕. 膜脂过氧化对植物细胞的伤害 [J]. 植物生理学通讯, 1991, 27 (2): 84.
- [21] 马国英. 种子老化过程中膜变化及原因 [J]. 植物生理学通讯, 1991, 27 (3): 233.
- [22] ABELES F B. Plant chemiluminescence [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1986, 37: 49 - 72.

(上接第 12266 页)

清除的动态平衡遭到了破坏。

参考文献

- [1] SREENIVASULU N, GRIMM B, WOBUS U, et al. Differential response of antioxidants to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*) [J]. Physiol Plant, 2000, 109: 435 - 442.

- [2] SHALATA A, TAL M. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* [J]. Physiol Plant, 1998, 104: 169 - 174.
- [3] 赫再彬, 苍晶, 徐仲. 植物生理学实验 [M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004: 106 - 116.
- [4] 孙国荣, 阎秀峰, 肖玮, 等. 星星草抗盐碱生理机制的初步研究 [J]. 武汉植物学研究, 1997, 15 (2): 59 - 61.
- [5] 张志良. 植物生理实验指导 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1990.