

人工老化对老芒麦种子活力和生理生化变化的影响

付艺峰¹, 李鸿雁², 黄帆², 王桂花¹

(¹内蒙古农业大学生命科学学院, 呼和浩特 010018; ²中国农业科学院草原研究所, 呼和浩特 010010)

摘要:以4份老芒麦种子为试验材料, 利用100% RH高温高湿老化法(AA)对老芒麦种子进行不同梯度的老化处理, 探讨老化后老芒麦种子活力和种子内部生理生化的变化。结果表明: 随着老化程度的加深, 4份老芒麦种子的各项活力指标均出现明显下降趋势; 生理生化指标中, 种子浸出液电导率出现先下降后缓慢上升、可溶性糖含量呈现先减少后增加的现象, 而丙二醛含量则出现整体一致的上升趋势, POD活性变化无规则, SOD活性出现先增加后减小的现象, CAT活性则发生整体下降的趋势。本研究结果将为老芒麦种质资源的保护和遗传完整性的研究提供基础理论依据。

关键词:老芒麦; 人工老化; 种子活力; 生理生化变化

Physiological and Seed Vigor Changes of *Elymus sibiricus* L. Seeds during Artificial Aging

FU Yi-feng¹, LI Hong-yan², HUANG Fan², WANG Gui-hua¹

(¹Inner Mongolia Agricultural University College of Sciences, Hohhot 010018; ²Institute of Grassland Research of CAAS, Hohhot 010010)

Abstract: In this study, we studied the effects of the aging condition of high temperature and humidity (40°C, 100% HR) on four kinds of *Elymus sibiricus* L. seeds vigor and physiological and biochemical characteristics. The results were as follows: The vigor index of *Elymus sibiricus* L. seeds had a degressive tendency with prolonging of the aging to deal with *Elymus sibiricus* L. seeds. The conductivity and soluble sugar content of *Elymus sibiricus* L. seeds had been increased after decreased in a short period of time as the aging gradient extension. The MDA increased with the longer aging. The study showed that with exacerbation of artificial aging, POD activity had been no rule changes, SOD activity had been increased and then reduced in the later stage, and CAT activity was weakened after aging. These conclusions would play a very important role to the future research of *Elymus sibiricus* L. germplasm and provide the theoretical basis.

Key words: *Elymus sibiricus* L.; artificial aging; seed vigor; physiological

老芒麦(*Elymus sibiricus* L.)别名西伯利亚披碱草, 是禾本科(Gramineae)小麦族(Triticeae)披碱草属(*Elymus*)多年生疏丛型中旱生植物, 原生于欧亚大陆北部, 种质资源分布广泛, 其自然分布横跨欧洲的瑞典到东亚的日本, 甚至到达北美的阿拉斯加和加拿大, 在我国的东北、内蒙古、河北、山西、陕西、甘肃、

宁夏、青海、新疆、四川和西藏等省区都有大量的野生分布, 染色体组构成为 StStHH(2n = 4x = 28)^[1-2]。

老芒麦种质资源丰富, 分布范围广, 生态类型多样, 具有抗寒性强, 耐旱、耐盐碱能力中等, 粗蛋白含量高, 适口性好, 易栽培等特点, 在建植人工草地、放牧草地和改良退化草地等方面起重要作用^[3-4], 而且在季节

收稿日期: 2014-01-06 修回日期: 2014-03-26 网络出版日期: 2014-10-16

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141016.1059.002.html>

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划课题(2013BAD01B0105); 农作物种质资源保护项目(NB2013-2130135-48); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(中国农科院草原研究所 1610332014020)

第一作者主要从事牧草种质资源保存研究工作。E-mail: 15047110754@163.com

通信作者: 王桂花, 主要从事牧草种质资源、遗传育种与生物技术研究工作。E-mail: wangguihuaz@sohu.com

李鸿雁, 主要从事牧草种质资源研究。E-mail: hongyili1964@126.com

畜牧业中起着不可替代的作用。但同时也加大了种质资源收集和保护的难度,时常会因为种子未能及时合理的保存而出现种子老化、退化等现象,造成种子生理生化变化和基因的漂移或漂变,遗传完整性下降等。因此,研究老化种子的活性和生理生化变化对老芒麦种质资源的保存和遗传完整性保护具有重要的意义^[5]。

通常研究种子耐贮性的方法是将种子置于常温下使其自然老化,此法需要较长的时间。如今常采用人工老化方法来评价种子耐贮性^[6-8]及种子老化过程中生理生化变化,为种子保存的适时更新提供理论依据^[9]。现在常用的人工加速老化法主要有3种:(1)40℃、100% RH 高温高湿老化法(AA)^[10]; (2)50% 甲醇溶液老化法(MS)^[11]; (3)55±1℃ 热水老化法(HW)^[12]。本试验采用40℃、100% HR 高温高湿老化法(AA)处理老芒麦种子,研究老化后老芒麦种子活力和种子内部生理生化变化。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料由中国农业科学院草原研究所国家牧草种质中期库提供(表1),2012年7月在田间收获,经过晾晒清选,保存于4℃备用。

表1 试验材料及来源

Table 1 Materials and sources

编号 Code	种质名称 Germplasm	收种年份 Year	种质类型 Germplasm type
E1	农牧老芒麦	2012	登记品种
E2	川草1号老芒麦	2012	登记品种
E3	3658	2012	野生材料
E4	1090	2012	野生材料

1.2 试验方法

1.2.1 种子老化方法和梯度的确定 采用 J. C. Delouche 等^[10]的40℃、100% RH 高温高湿法(AA)对老芒麦进行人工老化处理;种子老化梯度以发芽率为准,设定90%~95%、80%~85%、60%~70%、50%和<30%共5个梯度。

1.2.2 种子活力指标的测定 参照《国家种子检验规程》^[13]中 GB/T3543.4-1995 技术规定的发芽方法进行发芽试验,每个处理3次重复,每重复100粒种子,以未处理种子为对照,测定发芽势、发芽指数、活力指数,并计算相对发芽势、相对发芽指数、相对活力指数^[14]。

1.2.3 生理生化指标的测定 SOD 活性用氮蓝四唑法^[15]测定,POD 活性测定用愈创木酚法^[16],CAT

活性测定用 H₂O₂ 反应比色法^[17],丙二醛含量测定用巴比妥酸显色法^[18-19]。采用蒽酮比色法测定种子浸出液中可溶性糖的含量^[20]。浸出液电导率测定参照陈建勋等^[21]方法。

1.2.4 数据处理 试验数据采用 SPSS 13.0 软件进行差异显著性分析,利用 Excel 2010 对所有数据进行基本统计分析。

2 结果与分析

2.1 人工老化处理对老芒麦种子活力的影响

人工老化处理对老芒麦种子活力影响见表2。从表2可以看出,4份老芒麦种子达到不同老化梯度所需老化时间不同,野生种较栽培品种所需老化时间稍长,表明野生种较栽培种种子有较强的抗老化能力。随老化梯度的增加,4份老芒麦种子的相对发芽势、相对发芽指数和相对活力指数均呈现下降的趋势。其中在老化梯度由90%~95%到80%~85%范围内,E1、E2、E4种子的相对发芽势、相对发芽指数和相对活力指数下降趋势明显并差异极显著,E3种子的相对发芽指数差异不显著;老化梯度由80%~85%到60%~70%时,E1、E2的相对发芽势和E3、E4的相对活力指数差异不显著;老化梯度由60%~70%下降到50%时,E3相对发芽指数、E4相对发芽势和相对活力指数均差异不显著;老化梯度达到30%以下时,4份老芒麦种子除E3相对活力指数外,其他均差异极显著。

2.2 人工老化对老芒麦种子生理生化指标的影响

人工老化对老芒麦种子生理生化指标的影响见表3。随老化梯度的增加,4份老芒麦种子间的不同生理生化指标变化基本一致。当老化梯度为90%~95%时,浸出液电导率与对照相比明显下降,且差异极显著,但是随着老化梯度的增加,种子的浸出液电导率呈现平缓的上升趋势,但各处理间均差异不显著;随老化梯度的增加,种子的可溶性糖含量呈现下降趋势,E1、E2在老化梯度达60%~70%时出现拐点,并有小幅回升,其中E1与对照间差异极显著,但之后没有明确的变化规律,E1、E2、E3、E4各处理与对照间差异极显著,E2老化梯度小于30%与其他处理间差异极显著;在丙二醛含量变化中,随老化梯度的增加,种子的丙二醛含量增加,且在老化梯度为90%~95%时与对照间差异不显著,E1在老化梯度达50%时,差异极显著,当老化梯度达30%时,E2差异极显著,E3、E4老化梯度达60%~70%时差异极显著。随老化梯度的增加,种子的POD活性总体在下降,其中E3各处理与对照均差异极显著,但各处理

表2 人工老化处理对老芒麦种子活力影响

Table 2 Effect on seeds vigor of *Elymus sibiricus* L. by artificial aging

种子编号 Code	老化梯度(%) Germination ratio	老化时间(min) Aging time	相对发芽势(%) Relative germination energy	相对发芽指数(%) Relative germination index	相对活力指数(%) Relative vigor index
E1-0	CK	0	100A	100A	100A
E1-1	90~95	2	98.88A	88.59A	83.32A
E1-2	80~85	11	37.23B	66.67B	46.28B
E1-3	60~70	16	22.46B	42.39C	22.95C
E1-4	50	19	17.17C	35.52D	16.82CD
E1-5	<30	26	4.90D	18.24E	7.93E
E2-0	CK	0	100A	100A	100A
E2-1	90~95	2	98.17A	90.87A	77.95B
E2-2	80~85	11	35.08B	71.52B	49.96C
E2-3	60~70	16	23.96B	63.41C	28.48D
E2-4	50	21	18.54C	35.89D	14.37DE
E2-5	<30	28	5.72D	16.68E	9.05E
E3-0	CK	0	100A	100A	100A
E3-1	90~95	4	98.82A	83.19B	74.69B
E3-2	80~85	13	34.57B	72.43B	42.47C
E3-3	60~70	18	17.17C	26.77C	34.71C
E3-4	50	23	12.12CD	17.73C	19.98D
E3-5	<30	30	3.75E	14.28D	17.16D
E4-0	CK	0	100A	100A	100A
E4-1	90~95	4	97.89A	83.61B	80.95A
E4-2	80~85	15	30.38B	63.43C	47.32B
E4-3	60~70	20	14.71C	26.01D	30.72B
E4-4	50	25	10.41C	19.84D	19.28BC
E4-5	<30	32	3.24D	10.56E	9.21C

大写字母表示 0.01 水平上差异极显著,下同 The capital letters mean extremely significant difference at 0.01 level, the same as below

表3 人工老化处理对老芒麦种子生理生化指标变化的影响

Table 3 Effect on physiological and biochemical of *Elymus sibiricus* L. by artificial aging

种子编号 Code	老化梯度(%) Germination ratio	浸出液电导率 ($\mu\text{s}/\text{cm} \cdot \text{g}$) Conductivity	可溶性糖含量 (mg/g) Soluble sugar content	丙二醛含量 (nmol/g) MDA content	POD 活性 (U/mg protein) POD activity	SOD 活性 (U/mg protein) SOD activity	CAT 活性 (U/mg protein) CAT activity
E1-0	CK	190.4751A	1.4925A	29.7318BC	5.69B	5.64AB	28.46A
E1-1	90~95	72.8315BC	1.4762B	29.7419BC	5.21D	5.89A	24.47B
E1-2	80~85	75.3728BC	1.4321C	30.9318AB	6.02B	5.96A	20.88C
E1-3	60~70	87.3758B	1.4013D	33.2186AB	7.16A	5.32C	19.23C
E1-4	50	92.3486B	1.4286C	36.2135A	5.62BC	5.16C	16.71CD
E1-5	<30	85.3917B	1.5011B	43.5816A	5.22D	4.84D	14.75D
E2-0	CK	200.9341A	1.5712A	29.6123BC	3.62E	4.77B	30.53A
E2-1	90~95	69.2735C	1.4472C	29.7321BC	4.52B	5.17A	24.28B
E2-2	80~85	73.5381BC	1.4286C	33.3615B	5.09C	4.63B	16.28C
E2-3	60~70	76.7349BC	1.4317C	35.7613B	6.01A	4.61B	15.13C
E2-4	50	80.7228B	1.4426C	39.8619B	5.41C	4.13C	12.08CD
E2-5	<30	82.5689B	1.5013B	50.0128A	1.88D	4.06C	5.65E
E3-0	CK	203.2031A	1.5328A	25.3186B	4.22D	4.98B	23.72A
E3-1	90~95	73.7325BC	1.4471B	26.9315B	4.87C	5.27A	16.95B
E3-2	80~85	74.6859B	1.4498B	27.5986B	4.07DE	5.58A	15.24B
E3-3	60~70	78.4335B	1.4561B	32.7769A	6.54A	4.21C	12.81C
E3-4	50	90.0427B	1.4491B	35.4879A	5.39B	4.19CD	10.85CD
E3-5	<30	91.1467B	1.4478B	37.2813A	4.41D	4.12CD	7.63D
E4-0	CK	189.5327A	1.524A	27.3181C	6.15BC	5.57B	29.92A
E4-1	90~95	69.2735B	1.4516B	29.3392BC	6.64B	6.09A	25.73B
E4-2	80~85	71.2586C	1.4387B	29.0165BC	6.28B	6.14A	20.58C
E4-3	60~70	76.7349BC	1.4124BC	33.5836B	7.61A	5.73B	20.43C
E4-4	50	80.8864BC	1.42024CD	38.2687B	5.23D	5.48B	16.94D
E4-5	<30	82.5689BC	1.4247B	40.3681A	3.71E	5.12C	12.15E

间没有统一的变化趋势。随老化梯度的增加,种子的 SOD 活性呈现先增加后降低现象,E1、E4 在老化梯度为 60% ~ 70% 时,与对照间差异极显著,其中 E1 各处理间均差异不显著。CAT 随老化梯度增加活性下降,各梯度与对照均差异极显著。

3 讨论

种子生理成熟后出现不可逆转的质量下降变化总称为种子老化^[22]。种子在长期低温贮存过程中,发芽势、发芽指数、活力指数、发芽率在经历一段平稳后,会出现一个明显的拐点,拐点之后种子的活力指标和生理生化指标下降明显。因此,低温种质库需要增加对种子活力指标的监测,并且种质更新的标准不可过低^[23-24],本试验证明,老芒麦更新范围应在发芽梯度为 90% ~ 95% 至 80% ~ 85% 之间为最佳。

丙二醛是不饱和脂肪酸氧化的最终产物,它能够破坏细胞膜系统,抑制细胞保护酶活性^[25],在大豆、花生^[26-27]种子老化过程中,均见丙二醛的积累。与之相似,本试验中发现老芒麦种子中丙二醛的含量随着老化程度的增加而升高,在 80% ~ 85% 梯度有一明显拐点,即发芽率低于该值,丙二醛积累更加迅速。该结果表明老化程度越深,种子内过氧化伤害程度越高。电导率和可溶性糖含量测定结果证实,老化种子的细胞膜完整性受到破坏,支持丙二醛含量测定结果。

SOD、POD、CAT 是抗氧化系统中重要的抗氧化酶,在防御过氧化伤害中具有重要作用^[28]。酶活性的变化表明老化种子内抗氧化酶防御能力的变化。本研究分析这 3 个酶活性变化,发现随着种子老化程度加剧,SOD 酶活性先增加,至发芽率 80% ~ 85% 开始降低;POD 酶活性与 SOD 类似,也呈现先增加后降低的趋势,但其拐点出现于 60% ~ 70% 发芽率水平;CAT 酶活性则呈持续降低趋势,表明三者种子老化抗氧化防御中的贡献不同。另外,由于丙二醛过量积累会抑制细胞保护酶活性^[29],丙二醛积累的拐点在 80% ~ 85%,SOD 和 POD 酶活性的降低与之同步或者稍后,暗示抗氧化酶活性的降低可能与丙二醛过量积累有关。但是目前对于老化种子酶活性的研究多是集中在酶的活性变化,然而酶的活性为何因种子老化而发生变化则是少之又少,有待做进一步研究^[30-31]。

另外,本试验中 4 个试验材料的抗老化能力具有明显的差异。首先随着老化程度的加深,与 E3、E4 相比,E1、E2 的活力指标下降得比较缓慢,说明 E1、E2 耐老化能力更强;其次,在同一老化梯度内,E2 的抗氧化酶活性却低于 E3、E4。

参考文献

- [1] 窦声云,周学丽,莫玉花. Na₂CO₃胁迫对老芒麦和星星草种子萌发的影响[J]. 草业科学,2010,27(9):114-131
- [2] 周晶. 八种禾草种子半透层特性及其发育形成研究[D]. 兰州:兰州大学,2013
- [3] 李合生,孟庆伟,夏凯,等. 现代植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社,2002
- [4] 陈默君,贾慎修. 中国饲用植物[M]. 北京:中国农业出版社,2002:114-127
- [5] 卢新雄,崔聪淑,陈晓玲,等. 国家种质库部分作物种子生活力监测结果与分析[J]. 植物遗传资源学报,2001,2(2):1-3
- [6] 白史旦,张新和,常丹,等. 青藏高原东南缘老芒麦自然居群遗传多样性的 SRAP 和 SSR 分析[J]. 草业学报,2010,19(4):122-134
- [7] 李玉荣,韩建国,孙彦,等. 新麦草种子劣变过程中生理生化变化[J]. 草地学报,2005,13(3):168-181
- [8] 颜启传. 种子学[M]. 北京:中国农业出版社,2001:110-116,425-431
- [9] 王秋芳,乔勇进,乔旭光,等. 臭氧处理对巨峰葡萄品质与生理生化的影响[J]. 果树学报,2010,3(11):19-23
- [10] Delouche J C, Baskin C C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seeds lot [J]. Seed Sci Technol, 1973,1(2):427-452
- [11] 徐本美,顾增辉. 用甲醇进行人工老化种子实验[J]. 种子,1985(5):14-15
- [12] Bhattacharyya S, Hazra A K, Sen Mandi S. Accelerated aging of seeds in hot water: germination characteristics of aged wheat seeds [J]. Seed Sci Technol, 1985,13(3):683-690
- [13] 国家技术监督局. 农作物种子检验规程[M]. 北京:中国标准出版社,1995:40
- [14] 国际种子检验协会(ISTA). 种苗评定与种子活力测定方法手册[M]. 北京:北京农业大学出版社,1987
- [15] 陶嘉玲. 种质库管理及种子贮藏[M]. 北京:IBPGR-CAAS, 1986:135-136
- [16] 贺文婷,彭德良. 植物对线虫胁迫的生理生化响应机制[J]. 植物保护,2007,33(2):57-60
- [17] 渠云芳,马金虎,贺润平,等. 高温老化对两个玉米品种种子活力发芽指标影响的研究[J]. 中国农学通报,2006,2(22):124-149
- [18] 肖家欣. 植物生理学实验[M]. 安徽:安徽人民出版社,2010
- [19] 杜笑村,仁青扎西,白史旦,等. 牧草种质资源综合评价方法概述[J]. 草业与畜牧,2010,18(11):6-11
- [20] 汤章城. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1999
- [21] 陈建勋,王晓峰. 植物生理学实验指导[M],3版. 广州:华南理工大学出版社,2006:61-65
- [22] 乔燕祥,高平平,马俊华,等. 两个玉米自交系在种子老化过程中的生理特性和种子活力变化的研究[J]. 作物学报,2003,29(1):123-127
- [23] 李合生. 植物生理生化实验原理及技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000
- [24] 内蒙古植物志编辑委员会. 内蒙古植物志(第五卷)[M],2版. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1994:124-154
- [25] 周龙,廖康,许正,等. 低温胁迫对新疆野山樱桃李电解质渗出率和丙二醛含量的测定[J]. 新疆农业大学学报,2006,29(1):47-50
- [26] 段莹,甄志高,赵晓环,等. 花生种子老化过程中的生理生化变化及对田间性状的影响[J]. 花生学报,2009,38(2):35-38
- [27] 乔燕平,天齐建,周建平,等. 大豆种子老化过程中生理特性变化的研究[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(5):616-620
- [28] 刘月辉,王登花,黄海龙,等. 辣椒种子老化过程中的生理生化分析[J]. 种子,2003(2):49-52
- [29] 覃勇荣,冯济海,梁文忠,等. 镉胁迫下的桑树幼苗叶片丙二醛含量动态分析[J]. 河池学院学报,2012,32(2):35-38
- [30] 代容春,林国宇,朱锦懋,等. 油茶种子老化过程中质膜伤害的定量分析[J]. 福建师范大学学报:自然科学版,2001,17(4):80-89
- [31] 李颜,王倩. 大葱种子人工老化与膜脂过氧化物的研究[J]. 种子,2007,26(3):24-35