

不同贮藏温度下杉木种子的生理生化特征

陈琴, 黄开勇*, 戴俊, 郝海坤, 蓝肖 (广西壮族自治区林业科学研究院, 广西南宁 530002)

摘要 [目的]研究贮藏温度对贮藏过程中杉木种子活力的影响。[方法]采用生理生化检测方法,测定不同贮藏温度下杉木种子细胞膜透性、丙二醛含量、可溶性糖含量以及超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性。[结果]细胞膜透性在不同贮藏温度间存在显著差异,贮藏温度为4℃时,细胞膜透率最小,其次是-80℃;丙二醛含量在贮藏温度为40℃时显著高于其他温度处理,但在其他温度处理间无显著差异;超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性在不同贮藏温度间均存在显著差异,贮藏温度为4℃时,2种酶的活性均最强;可溶性糖含量在不同贮藏温度间无显著差异;细胞膜透性、丙二醛含量分别与超氧化物歧化酶之间存在极显著和显著的负相关。[结论]该试验条件下4℃是杉木种子的最适贮藏温度。

关键词 贮藏温度;杉木;种子;生理生化特征

中图分类号 S791 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)22-09355-03

Physiological and Biochemical Characteristics of *Cunninghamia lanceolata* under Ditterent Storage Temperatures

CHEN Qin et al (Guangxi Zhuang Autonomous Region Forestry Research Institute, Nanning, Guangxi 530002)

Abstract [Objective] Study the effects of storage temperatures on *Cunninghamia lanceolata* seeds vigor during storage. [Method] In this paper, cell membrane permeability, Malondialdehyde contents, soluble sugar contents, Superoxide dismutase activity and Catalase activity of *Cunninghamia lanceolata* seeds under different storage temperatures were determined by using physiological and biochemical detection methods. [Result] There were significant differences of cell membrane permeability among different storage temperatures. At the storage temperature of 4℃, the cell membrane permeability was the lowest, followed by -80℃. The content of Malondialdehyde at the storage temperature of 40℃ was significant higher than other temperatures, but it showed no significant differences among the other four temperatures. Obvious differences of Superoxide dismutase activity and Catalase activity were observed on different temperatures, and the highest activity of this two enzymes were found at the storage temperature of 4℃ respectively. There was no significant differences of the contents of soluble sugar on different storage temperatures. Very significant negatively correlation was found between cell membrane permeability and Superoxide dismutase activity, and significant negatively correlation was found between Malondialdehyde contents and Superoxide dismutase activity. [Conclusion] 4℃ is the optimal storage temperature for *C. lanceolata* seeds.

Key words The storage temperature; *Cunninghamia lanceolata*; Seed; Physiological and biochemical characteristic

林木种子是林业生产的重要物质基础,种子品质好坏直接关系到育苗和造林的成败^[1-3]。林木种子自生理成熟起,其劣变已开始,在劣变过程中,其内部发生一系列生理生化反应,包括膜结构的破坏、酶活性的变化、有毒物质的积累、内源激素的消长、遗传物质以及蛋白质的分解等^[4-7]。随着贮藏时间的延长,劣变对种子功能和结构的损害越大,因此全面掌握种子的贮藏知识,对提高种子品质及其在林业生产中的作用具有重要意义。

杉木(*Cunninghamia lanceolata*)是我国特有的针叶用材树种,也是我国华南地区的重要速生用材树种之一^[8]。在杉木种子发育过程中,败育形成涩粒现象十分严重,一般杉木涩粒率达50%~60%,通常种子园的杉木种子涩粒率达30%左右^[9-10]。杉木种子易于劣变,难以贮藏,影响了杉木种子品质,给杉木种苗生产带来了很大的困难^[11-12]。目前,有关杉木种子贮藏方面的系统研究仍较少,对于杉木种子在贮藏过程中的生理生化变化尚不明确^[13]。鉴于此,该研究从杉木种子细胞膜透性、丙二醛含量、可溶性糖含量和酶活性等方面展开研究,探讨不同贮藏温度条件下杉木种子各项生理生化指标的变化特征,以期对种子劣变机理的进一步研

究和种子贮藏提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料 供试种子于2012年11月采集于广西柳州市融安县西山林场2代杉木种子园。种子含水量为17.67%,净度为99.21%,优良度为29.50%,千粒重为5.82g,吸水率为25.90%。

1.2 试验设计 将初始条件相同的杉木种子装入避光密封袋中,分别置于40℃、常温、4℃、-20℃和-80℃等5个温度水平下进行贮藏。贮藏3个月后取出杉木种子,测定其生理生化指标。

1.3 生理生化指标测定项目及方法

1.3.1 细胞膜透性的测定。参照电导率法^[14]测定种子水浸提液相对电导率。精确称取杉木种子样品0.2g,放在盛有20ml重蒸馏水的三角瓶中,振荡浸泡3h后,测定种子水浸提液的电导率(L_1),然后将样品加热煮沸30min,杀死组织细胞(损失的水分用重蒸馏水补充),待冷却后测定种子水浸提液的电导率(L_2),相对电导率的计算见公式(1)。

$$\text{相对电导率}(\%) = \frac{L_1}{L_2} \times 100 \quad (1)$$

1.3.2 可溶性糖和丙二醛含量测定。参照林艳等^[15]所使用的硫代巴比妥酸法进行测定。称取去皮杉木种子0.2g,加入2ml 10%三氯乙酸(TCA)和少量石英砂,研磨至匀浆,再加6ml TCA进一步研磨,将匀浆转移至离心管中,4000r/min离心10min;吸取离心的上清液2ml(对照加2ml蒸馏水),加入2ml 0.6%硫代巴比妥酸(TBA)溶液,混匀物于沸

基金项目 广西林业科技项目“杉木良种选育及高效栽培技术研究与示范”(桂林科字[2010]3号);广西地方标准制修订项目“杉木容器育苗技术规程”(2011-1)。

作者简介 陈琴(1986-),女,广西南宁人,助理工程师,硕士,从事人工林定向培育研究,E-mail:jingqin_168@163.com。*通讯作者,高级工程师,硕士,从事林木育种与栽培技术研究,E-mail:huangky73@163.com。

收稿日期 2013-06-27

水浴上反应 15 min,迅速冷却后再离心,取上清液分别测定 532、600 和 450 nm 波长下的吸光度,分别按照公式(2)和(3)计算出反应液中可溶性糖和丙二醛的浓度,然后根据公式(4)和(5)分别计算出提取液中可溶性糖和丙二醛的浓度,最后分别根据公式(6)和(7)计算出杉木种子中可溶性糖含量和丙二醛含量。

$$C_1 = 11.71D_{450} \tag{2}$$

$$C_2 = 6.45(D_{532} - D_{600}) - 0.56D_{450} \tag{3}$$

$$C_3 = \frac{C_1 \times \frac{V_1}{1\,000}}{V_2} \tag{4}$$

$$C_4 = \frac{C_2 \times \frac{V_1}{1\,000}}{V_2} \tag{5}$$

$$\text{可溶性糖含量}(\mu\text{mol/g}) = \frac{C_3 \times V}{m} \tag{6}$$

$$\text{丙二醛含量}(\mu\text{mol/g}) = \frac{C_4 \times V}{m} \tag{7}$$

式中: C_1 为反应液中可溶性糖的浓度($\mu\text{mol/L}$), C_2 为反应液中丙二醛的浓度($\mu\text{mol/L}$), C_3 为提取液中可溶性糖浓度($\mu\text{mol/ml}$), C_4 为提取液中丙二醛浓度($\mu\text{mol/ml}$), V_1 为反应液体积(ml), V_2 为测定时提取液用量(ml), V 为提取液总量(ml), D_{450} 、 D_{532} 、 D_{600} 分别为波长 450、532、600 nm (非特异吸收)处的吸光度值。

1.3.3 超氧化物歧化酶活性测定。按照《保健食品中超氧化物歧化酶(SOD)活性测定》(GB/T5009.171-2003)中邻苯三酚自氧化的方法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性。

1.3.4 过氧化氢酶活性测定。采用紫外分光光度法测定^[16]。

1.4 数据处理 采用 Microsoft Excel 2003、SPSS18.0 进行试验数据处理及作图,采用单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan's 新复极差法比较数据组间的差异($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 贮藏温度对杉木种子细胞膜透性的影响 多数研究结果认为,种子衰老时其膜结构受到破坏,细胞膜透性增加,膜脂过氧化是导致种子衰老的重要原因^[17-19]。通过细胞膜离子的渗漏性检测可以判定林木种子细胞膜系统的完整性,而通过植物组织的水浸提液的相对电导率,可反映出细胞膜的渗漏程度。相对电导率低,说明细胞膜系统的完整性较好,反之,则说明细胞膜系统受损严重^[20]。从图 1 可以看出,贮藏于不同温度条件下的杉木种子,其水浸提液的相对电导率之间存在显著差异,说明贮藏温度对杉木种子细胞膜透性具有显著的影响。贮藏温度为 4℃ 时,种子水浸提液的相对电导率最低,显著低于 40℃、常温和 -20℃ 这 3 种处理,说明当贮藏温度为 4℃ 时,种子细胞膜的渗漏强度较小,种子细胞膜系统完整性较好。贮藏温度为 -80℃ 时,杉木种子水浸提液的相对电导率均低于 40℃、常温及 20℃ 3 种处理,说明超低温保存对杉木种子细胞膜系统具有一定保护作用。在 40℃、-20℃ 和常温条件下,种子水浸提液的相对电导率较高,说明高温贮藏条件下杉木种子细胞膜透性容易受到

破坏。

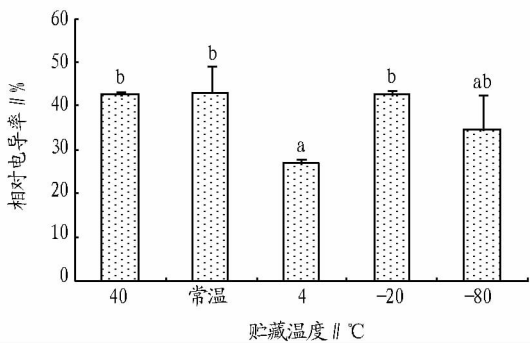


图 1 贮藏温度对杉木种子细胞膜透性的影响

2.2 贮藏温度对杉木种子丙二醛含量、可溶性糖含量的影响 在种子老化过程中,自由基清除酶的活性降低,其清除自由基及过氧化物的能力减弱,而有机自由基可进一步氧化生成丙二醛(MDA),进而导致有毒物质丙二醛的积累^[21-22]。不同贮藏温度条件下,杉木种子丙二醛含量和可溶性糖含量见表 1。从表 1 可以看出,与其他贮藏温度相比,贮藏温度为 40℃ 时,丙二醛含量最高,达 0.094 1 $\mu\text{mol/g}$,分别达 4℃ 和 -80℃ 时丙二醛含量的 2 倍以上,同时也显著高于其他处理温度;贮藏温度在 40℃ 以下时,丙二醛的含量虽不存在显著差异,但从数值上可以看出,在 4℃ 和 -80℃ 时丙二醛含量较低,这与细胞膜透性的结果对应。可溶性糖含量在各贮藏温度之间不存在显著差异。

表 1 贮藏温度对杉木种子丙二醛含量、可溶性糖含量的影响

贮藏温度/℃	丙二醛含量/ $\mu\text{mol/g}$	可溶性糖含量/ $\mu\text{mol/g}$
40	0.094 1 $\pm$ 0.027 7b	0.349 9 $\pm$ 0.024 4a
常温	0.058 0 $\pm$ 0.005 4a	0.350 5 $\pm$ 0.024 7a
4	0.046 8 $\pm$ 0.013 3a	0.358 9 $\pm$ 0.009 1a
-20	0.057 1 $\pm$ 0.046 6a	0.361 0 $\pm$ 0.030 7a
-80	0.046 2 $\pm$ 0.018 1a	0.347 7 $\pm$ 0.008 4a

2.3 贮藏温度对杉木种子酶活性的影响 酶系统的破坏是导致种子衰老的又一重要原因,其中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)等酶对自由基及过氧化物具有清除作用^[23-24]。不同贮藏温度条件下杉木种子 SOD 活性见图 2。根据图 2 中的方差结果可知,杉木种子 SOD 活性在不同贮藏温度之间存在显著差异。贮藏温度为 4℃ 时,种子 SOD 活性最高,显著高于其他处理温度,其次为 40℃。杉木种子 SOD 活性在常温、-20℃ 和 -80℃ 3 种温度之间无显著差异。

由图 3 中方差结果可知,杉木种子 CAT 活性在各贮藏温度条件下也存在显著差异。温度为 4℃ 时,CAT 活性最高,达 727.20 U/(g·min),显著高于其他处理温度,其次为 -20℃;贮藏温度为 -80℃ 时,种子 CAT 活性最低,为 422.04 U/(g·min),显著低于其他处理温度;种子 CAT 活性在常温和 40℃ 这 2 种温度条件下不存在显著差异。

2.4 相关性分析 林木种子在贮藏过程中膜系统、有毒物质积累以及酶系统三者之间具有密切的联系。脂质过氧化

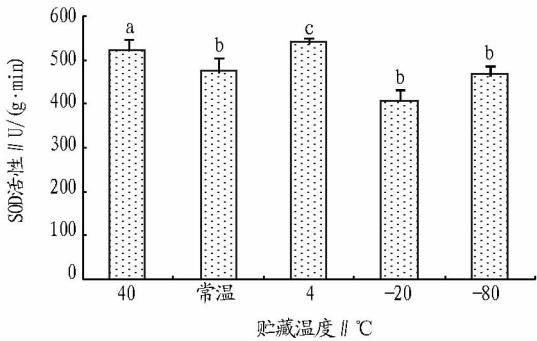


图2 贮藏温度对杉木种子 SOD 活性的影响

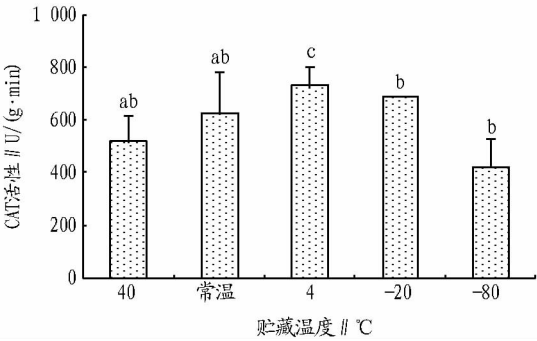


图3 贮藏温度对杉木种子 CAT 活性的影响

导致过氧化物生成,自由基清除酶对过氧化物具有清除作用,若酶对自由基及过氧化氢清除作用减弱,则有机自由基进一步氧化生成有毒物质丙二醛,而丙二醛的生成反过来又可抑制细胞保护酶的活性及降低抗氧化物的含量^[23-24]。杉木种子不同生理生化指标之间的 Pearson 相关性分析结果见表 2。从表 2 可以看出,杉木种子 SOD 活性与相对电导率之间存在极显著的负相关,同时还与丙二醛含量之间存在显著的负相关,与前人研究结果相似。

表 2 生理生化指标的相关性分析

指标	相对电导率	丙二醛含量	可溶性糖含量	SOD 活性	CAT 活性
相对电导率	1.000	0.399	0.166	-0.668**	-0.326
丙二醛含量	0.399	1.000	-0.259	-0.558*	-0.240
可溶性糖含量	0.166	-0.259	1.000	0.210	0.062
SOD 活性	-0.668**	-0.558*	0.210	1.000	0.331
CAT 活性	-0.326	-0.240	0.062	0.331	1.000

注: ** 表示在 0.01 水平(双侧)上显著相关; * 表示在 0.05 水平(双侧)上显著相关。

3 结论与讨论

(1) 根据杉木种子细胞膜透性、丙二醛含量以及酶活性进行综合分析表明:4℃是杉木种子的最适贮藏温度;高温对杉木种子细胞膜系统具有显著的破坏作用,同时促进有毒物质积累,加速种子劣变老化;超低温储存对杉木种子细胞膜系统具有一定的保护作用,减缓有毒物质积累。

(2) 杉木超氧化物歧化酶在贮藏温度为 40℃ 时活性较高,这可能是由于杉木种子在高温促进劣变的过程中,膜脂过氧化速率加快,过氧化物大量积累,从而刺激和诱导对过氧化物具有清除作用的超氧化物歧化酶活性的增加。

(3) 杉木种子浸提液相对电导率、丙二醛含量分别与 SOD 活性之间存在极显著和显著的负相关,说明杉木种子在贮藏的过程中,种子内部各项功能的变化相互影响,在评定种子贮藏条件时,应该尽可能综合种子的各项生理生化指标进行全面分析。

(4) Priestley^[25]指出与种子衰老密切相关的非酶促反应(美拉德反应)与膜脂过氧化有关,而且其反应产物的积累与糖分的水解密切相关,经过后期的研究证实,糖水解是种子劣变的重要特征。从该试验的结果来看,杉木种子在不同温度条件下贮藏 3 个月后,其可溶性糖含量在各贮藏温度之间未表现出显著的差异性,这可能与贮藏时间的长短有关,为探讨可溶性糖在不同贮藏温度下的差异性,应延长种子的贮藏时间后再作进一步深入研究。

参考文献

[1] 田冬. 林木种子贮藏方法[J]. 河北林业科技, 2011(3): 83.

[2] 张剑, 刘玲玲, 刘亚敏. 林木种子采集贮藏及种子催芽技术[J]. 内蒙古林业调查设计, 2013, 36(4): 87-88, 105.

[3] 张玉凤, 董经纬, 蒋菊生, 等. 种子贮藏的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(19): 5855-5856.

[4] 贾立国, 樊明寿. 种子理化反应与种子衰老关系的研究进展[J]. 中国农学通报, 2006, 22(4): 260-263.

[5] 李颖, 毛培胜. 牧草种子老化生理与修复研究进展[J]. 种子, 2013, 32(11): 49-52.

[6] 王彦荣, 刘友良, 沈益新. 种子劣变的生理学研究进展综述[J]. 草地学报, 2001, 9(3): 159-164.

[7] 刘国贞, 吴福海, 宋华东, 等. 种子劣变机理的研究进展[J]. 山东省农业管理干部学院学报, 2007, 23(1): 159-160.

[8] 黄开勇, 陈代喜, 郝海坤, 等. 杉木无性系对比测定与选择研究[C]//第三届南方林木育种研讨会论文集(摘要)集. 北京: 中国林学会林木遗传育种分会, 2006.

[9] 高智慧, 史忠礼, 许月明, 等. 杉木种子发育生理、涩籽成因及降低败育措施的研究[J]. 林业科学研究, 2000, 13(6): 659-666.

[10] 吉前华, 郭雁君, 李少琼, 等. 不同处理对南方红豆杉种子萌发的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(31): 9858-9860.

[11] 俞新妥. 杉木栽培学[M]. 福州: 福建科技出版社, 1997: 258-278.

[12] 于淑兰. 32 种林木种子生活力的生物化学测定的试验研究[J]. 种子, 1984(1): 16-25.

[13] 林思祖, 黄世国. 杉木种子劣变某些生理生化过程的数学模型[J]. 西北植物学报, 2001, 21(5): 952-957.

[14] KAYA C, KIRNAK H, HIGGS D, et al. Supplem entary calcium enhances plant growth and fruit and fruityield in strawberry cultivars grown at high (NaCl) salinity[J]. Scientia Horticulturae, 2002, 93: 65-74.

[15] 林艳, 郭伟珍, 徐振华, 等. 大叶女贞抗寒性及冬季叶片丙二醛和可溶性糖含量的变化[J]. 中国农学通报, 2012, 28(25): 68-72.

[16] 杨兰芳, 庞静, 彭小兰, 等. 紫外分光光度法测定植物过氧化氢酶活性[J]. 现代农业科技, 2009(20): 364-366.

[17] 李春杰, 王彦荣, 朱延恒, 等. 紫花苜蓿种子对逆境贮藏条件的反应[J]. 应用生态学报, 2002, 13(8): 957-961.

[18] 王玉红. 高羊茅、老芒麦、燕麦种子劣变与膜结构和透性关系的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2008.

[19] 孔令琪. 贮藏时间对不同含水量燕麦种子劣变的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2010.

[20] 李铁华, 文仕知, 喻勋林, 等. 榉树种子贮藏过程中的活力变化研究[J]. 林业科技, 2008, 33(2): 4-7.

[21] VERTUCCI C W, ROOS E E. Seed moisture content, storage, viability and vigour (correspondence)[J]. Seed Science Research, 1993, 1: 277-279.

[22] MURTHY U M, LIANG Y, KUMAR P P, et al. Non - enzymatic protein modification by the Maillard reaction reduces the activities of scavenging enzymes in Vigna radiate[J]. Plant Physiology, 2002, 115: 213-220.

[23] 廉佳杰. 含水量对燕麦种子劣变影响的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2009.

[24] 李朋, 罗秀娟, 周春宏, 等. 脱水方法对棕榈种子萌发及膜脂过氧化的影响[J]. 西北植物学报, 2011, 31(10): 2021-2026.

[25] PRIESTLEY D A. Seed aging[M]. New York: Cornell University, 1986: 148.