

## 提高黄皮种子活力的途径

向旭 傅家瑞

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

**摘要** 黄皮种子经脱水至40%左右或持续贮藏(一年以上)后种子活力迅速下降, PEG对劣变种子直接引发不但不能提高其活力, 反而使其活力更为下降, 甚至丧失萌发能力而引发加速了代谢物质的消耗和渗漏。在黄皮种子脱水前用ABA、Ca<sup>2+</sup>、茶多酚(抗氧化剂)预处理, 明显降低了黄皮种子的脱水敏感性。结合用PEG引发技术, 则能较大幅度提高黄皮种子脱水后的活力, Ca<sup>2+</sup>短时高温引发也能提高黄皮种子贮藏一年后的活力, 说明预处理是提高脱水和贮藏后黄皮种子活力的必要措施。

**关键词** 黄皮; 预处理; 引发; 种子活力

## THE WAYS TO INCREASE VIGOUR OF WAMPEE (*CLAUSENA LANSIUM*) SEEDS

Xiang Xu Fu Jiarui

(The School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

**Abstract** The vigour of wampee seeds decreased rapidly as moisture content was reduced to about 40% after desiccation, or after continued storage for one year or more. Direct PEG priming could not improve but decrease the vigour of deteriorated wampee seeds, even made their germinability lost. The experiments showed that the solute leakage of wampee seeds or excised embryos increased greatly after priming. The pretreatments with ABA, Ca<sup>2+</sup> or tea polyphenol before desiccation obviously reduced the desiccation sensitivity of seeds, and those in combination with PEG priming after desiccation could markedly increase the vigour of the seeds. In comparison with control, the short-term and high-temperature priming with Ca<sup>2+</sup> before storage improved the vigour of seeds preserved after one year. The results showed that the pretreatments before desiccation were necessary for increasing the viability of wampee seeds.

**Key words** Wampee; Pretreatment; Priming; Seed vigour

黄皮种子为典型顽拗性种子<sup>[1,2]</sup>, 不耐脱水和低温, 一般条件下寿命很短, 在室内自然风干, 寿命只有十来天, 在15℃下贮藏, 寿命可延长至600-800 d, 但脱水和贮藏后萌发率和活力指数都大幅下降, 贮藏一年后活力指数不足贮藏前的三分之一。如何提高顽拗性种子脱水和贮藏后的活力是种子生理研究的一项重要内容。引发(Priming)技术早已应用于正常性种子的生产实践中<sup>[3-6]</sup>, 对提高劣变的正常性种子活力有显著的效果<sup>[4,6]</sup>。但由于顽拗性种子发育成熟

时不经历脱水过程,含水量高达40–70%,成熟脱落后不经水合(hydration)即可萌发,与正常性种子成熟后的水合萌发有本质上的区别,因此限制了引发技术在顽拗性种子的应用。本试验以黄皮种子作材料并对此做了初步的探索。

## 1 材料和方法

黄皮(*Clausena lansium* (Lour.) Skeels)种子于1994年采自广州市郊岭南园艺场4–5年生果树,1995–1996年采自广州市果树研究所实验果园6–7年生果树,品种均为“鸡心”,果实成熟后取样,需保存的材料在室内风干两天后混合百菌清(4%)贮放于15℃恒温培养箱中。

### 材料处理

1. 用ABA( $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$  mol/L)、 $Ca^{2+}$ ( $10^{-3}$ 、 $10^{-2}$  mol/L)及ABA+ $Ca^{2+}$ 浸泡处理2 d后,室内风干脱水4 d,用PEG6000 34.2% (渗透势为-1.5 MPa)<sup>[7]</sup>在15℃条件下引发5 d,作萌发实验。

2. 用抗氧化剂(茶多酚)不同浓度(0.001%、0.01%、0.05%、0.1%)预处理黄皮种子12 h后风干脱水4 d,作萌发实验。

3. 茶多酚(0.01%)预处理脱水4 d后的黄皮种子,再用PEG6000进行引发,PEG6000的浓度为27.3%和34.2%,其渗透势在15℃时分别相当于-1.0 MPa和-1.5 MPa<sup>[7]</sup>;引发在三种温度(4℃、15℃、30℃)下进行。茶多酚由浙江农业大学茶学系杨贤强教授提供。

4. 贮藏(15℃)1–2年的黄皮种子与新鲜黄皮种子作PEG引发试验,引发温度为4℃和15℃,测定活力指数及溶质外渗率。溶质外渗率测定是将种子从PEG溶液转到双蒸水中,按下述方法测定。

5.  $Ca^{2+}$ 短时高温引发:  $CaCl_2$ 浓度1%和3%,处理温度与时间为50℃(15、30、60 min),60℃(5、10、15 min),70℃(1、2、5 min),处理后即做萌发实验。另一部分处理材料室内风干2 d后,混合百菌清于15℃条件下保存,一年后检测活力指数。以上每个处理用黄皮种子100粒,重复三次,结果以平均值计量。

**含水量测定** 将种子切成碎粒,置铝盒中于 $105 \pm 2$ ℃烘至恒重。

**萌发试验** 用玻板直立发芽法<sup>[8]</sup>,于30℃条件下萌发,10 d后统计发芽率及测定胚根长度,然后计算出简易活力指数(以下简称活力指数)。简易活力指数 = 发芽率 × 胚根平均长度(mm)。

**电导率测定** 将待测种子(或剥取种子胚轴)用双蒸水洗净表面后,置于干净试管中,加入定量双蒸水浸泡12 h,用DDS-11型电导仪测量,然后煮沸10 min,冷却后再测定,两者的比值即为相对电导率(溶质外渗率)<sup>[8]</sup>。

## 2 实验结果

### 2.1 脱水劣变后黄皮种子的引发效果

黄皮种子经室内风干4 d后其含水量从50%以上下降至 $40 \pm 2\%$ ,活力指数则下降50%以上,经PEG引发处理也未能提高(见表1),但脱水前经ABA、 $Ca^{2+}$ 预处理后,特别是 $Ca^{2+}$

10<sup>-3</sup> mol/L 处理, 再用 PEG 引发, 则活力指数大幅提高(比对照活力指数提高 138%), 效果极显著。较低浓度的 ABA (10<sup>-5</sup> mol/L) 和 Ca<sup>2+</sup> (10<sup>-2</sup> mol/L) 也能提高黄皮种子脱水后的活力, 明显降低了黄皮种子的脱水敏感性(表 1)。

用茶多酚预处理能提高种子活力。浓度为 0.01% 的茶多酚比对照活力提高 40% 以上, 而较低和较高浓度均不适合(表 2)。

表 1 ABA、Ca<sup>2+</sup> 预处理对黄皮种子脱水后引发的效果

Table 1 Effects of ABA and Ca<sup>2+</sup> pretreatment on the priming of wampee seeds after desiccation

预处理 Pretreatment for 2 d	脱水前活力指数 Vigour index before dehydration	活力指数 Vigour index		± %	
		脱水4d Dehydration for 4 d	PEG(-1.5MPa)引发 Priming	脱水4d Dehydration for 4 d	PEG(-1.5MPa)引发 Priming
		Control	28.9	12.5	10.5
ABA 10 <sup>-4</sup> mol/L	16.8	6.8	8.7		
10 <sup>-5</sup> mol/L	14.3	14.3	16.5	+14.4	+57.14
Ca <sup>2+</sup> 10 <sup>-2</sup> mol/L	20.2	8.2	18.4		+75.23
10 <sup>-3</sup> mol/L	21.6	15.6	25.0	+28.4	+138.09
ABA 10 <sup>-5</sup> mol/L + Ca <sup>2+</sup> 10 <sup>-3</sup> mol/L	19.9	6.9	11.3		+7.62
ABA 10 <sup>-4</sup> mol/L + Ca <sup>2+</sup> 10 <sup>-3</sup> mol/L	13.2	7.4	9.8		

表 2 茶多酚预处理对黄皮种子脱水后活力的影响

Table 2 Effects of tea polyphenol pretreatment on the vigour of wampee seeds after desiccation

茶多酚浓度 Tea polyphenol	预处理时间 Pretreatment hours	脱水时间 Dehydration hours	脱水后含水量 Moisture content after dehydration (g H <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> FW)	脱水后溶质外渗率 Solute leakage rate after dehydration (%)	活力指数 Vigour index	± %
0	12	96	40.6	62.5	10.6	0.00
0.001%	12	96	40.3	68.6	8.8	-16.98
0.01%	12	96	42.0	54.5	15.5	+46.23
0.05%	12	96	41.8	58.6	11.8	+11.32
0.1%	12	96	38.5	65.3	7.9	-25.96

经上述预备试验后, 选用 0.01% 茶多酚预处理, 进行脱水后引发实验, 结果见表 3。茶多酚预处理后结合 PEG 引发能显著地(P < 0.05) 提高黄皮种子脱水后的活力指数, 然而, PEG 浓度和引发温度对脱水劣变黄皮种子的活力也有较大的影响, 总体来看, 在 15℃ 条件下引发效果较好且较稳定。

表 3 茶多酚预处理结合 PEG 引发对黄皮种子脱水后活力的影响

Table 3 Effects of PEG priming on the vigour of wampee seeds pretreated with tea polyphenol and then desiccated

PEG 浓度 PEG concentration (%)	27.3						34.2						
	30		15		4		30		15		4		
	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	
引发温度 Priming temperature (℃)													
引发时间 Priming days													
活力指数 Vigour index	对照 Control	13.5	8.7	10.6	13.2	12.8	17.2	13.0	12.1	15.8	16.4	15.5	14.5
	茶多酚预处理 Tea polyphenol pretreated	12.6	8.9	14.8	16.7	13.2	19.0	16.7	13.6	22.5	20.1	16.9	13.2

显著性检验 Significance at P < 0.05

## 2.2 贮藏劣变后黄皮种子的引发效果

新鲜黄皮种子经引发后活力反而下降(表4),表明黄皮种子成熟时萌发过程已经开始,再经引发只会延长萌发过程而造成活力的下降,这从溶质外渗率的下降(PEG引发溶液中电导率升高)得以解释。贮藏一年和两年的种子经引发后则全部丧失萌发能力,其溶质外渗率也大幅下降(在PEG引发液中已大量泄漏)。这表明黄皮种子贮藏过程中仍维持较高的代谢活性,贮藏过程实际上就是一个缓慢的萌发过程,只是由

于温度和湿度条件尚不能满足其生长的要求,在此阶段引发只会加速其代谢物质的消耗和渗漏,因此对贮藏劣变后黄皮种子作引发只能促进其活力的丧失。

## 2.3 $Ca^{2+}$ 短时高温引发与黄皮种子贮藏后的活力

$Ca^{2+}$  短时高温引发对新鲜种子和贮藏后种子活力的影响与处理温度、时间及  $Ca^{2+}$  浓度三个因子相关。贮藏前黄皮种子经此高温引发后活力都不同程度降低,处理温度与时间较  $Ca^{2+}$  浓度的影响为大,较高温度和处理时间较长,活力下降较快,60℃处理15 min及70℃处理5 min使黄皮种子完全丧失活力,而50℃处理60 min及60℃处理5 min活力下降较小。同时,种子在贮藏一年后,该两种处理的种子活力大大高于对照,50℃处理60 min在3%  $Ca^{2+}$  浓度时高一倍,60℃处理5 min在3%  $Ca^{2+}$  浓度时高出近七成(表5)。由此说明,在合适的处理温度和时间条件下,较高的  $Ca^{2+}$  浓度可以显著提高贮藏后黄皮种子活力。此外,在不加  $Ca^{2+}$  的条件下,50℃处理60 min、60℃处理5 min及70℃处理1 min的种子在贮藏一年后其活力也比对照稍高,说明短时高温处理对保持黄皮种子贮藏后的活力也有较好的作用。

## 3 讨论

顽拗性种子由于不耐脱水和低温,贮藏寿命都很短,其种质保存已成为普遍关注的问题。黄皮种子的保存经本实验室长期摸索后,尽管已能将其寿命延长至两年或两年以上,但贮藏中的劣变却是影响保存质量的一大难题,解决的途径一是通过预处理减少贮藏过程中劣变的发生,以提高贮藏后的活力;二是通过后处理例如“引发”技术来提高劣变种子的活力。本实验表明,仅是PEG引发不能提高脱水劣变和贮藏劣变后黄皮种子的活力,预处理则可以降低黄皮种子的脱水敏感性,是提高脱水和贮藏后黄皮种子活力的必要措施。预处理与PEG引发相结合可以在一定

表4 贮藏劣变后黄皮种子的引发效果

Table 4 Effects of priming on wampee seeds after storage

贮藏年限 Storage period (a)	引发条件 Priming condition	发芽率 Germinating rate (%)	活力指数 Vigour index	溶质外渗率(%) (剥取胚轴测定) Determined from excised embryo
0	Control	100	19.90	21.6
	-1.0 MPa 15℃ 5 d	100	16.30	10.0
	-1.5 MPa 15℃ 5 d	100	9.46	10.0
	-1.5 MPa 4℃ 5 d	100	9.72	10.2
1	Control	80	8.64	28.5
	-1.0 MPa 15℃ 5 d	0	0	21.9
	-1.5 MPa 15℃ 5 d	0	0	17.8
	-1.5 MPa 4℃ 5 d	0	0	16.5
2	Control	70	6.26	32.5
	-1.0 MPa 15℃ 5 d	0	0	24.6
	-1.5 MPa 15℃ 5 d	0	0	15.0
	-1.5 MPa 4℃ 5 d	0	0	17.8

程度上解决黄皮种子不耐脱水的问题, 而  $\text{Ca}^{2+}$  短时高温引发则可提高贮藏后的活力。

表5  $\text{Ca}^{2+}$  短时高温引发对黄皮种子贮藏后活力的影响  
Table 5 Effects of short-term and high-temperature priming with  $\text{Ca}^{2+}$  on the vigour of wampee seeds after storage

处理温度 Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	处理时间 Time (min)	$\text{CaCl}_2$ 浓度 $\text{CaCl}_2$ (%)	活力指数 Vigour index		$\pm$ %	
			贮藏前 Before storage	一年后 One year after storage		
Control			28.9	8.6	0.00	
50	15	0	21.1	7.6		
		1	17.2	5.6		
		3	22.7	7.0		
	30	0	13.4	6.1		
		1	24.4	6.6		
		3	18.0	8.6		
	60	0	25.6	13.7	+ 59.30	
		1	25.3	10.8	+ 25.58	
		3	25.6	17.5	+ 103.48	
60	5	0	23.7	9.9	+ 15.12	
		1	23.7	11.6	+ 34.88	
		3	24.8	14.6	+ 69.76	
	10	0	23.3	8.9		
		1	5.9	0		
		3	12.8	1.2		
	15	0	0.9	0		
		1	2.9	0		
		3	0.1	0		
	70	1	0	11.2	9.4	+ 9.30
			1	12.8	4.1	
			3	14.4	9.2	+ 6.97
2		0	10.8	5.5		
		1	25.7	2.6		
		3	21.1	3.9		
5		0	3.6	0		
		1	0.8	0		
		3	0.4	0		

前人的研究表明, 植物组织中相对高浓度  $\text{Ca}^{2+}$  可以延缓衰老<sup>[9]</sup>; 钙和多胺能提高花生种子活力<sup>[10]</sup>; 钙能提高苹果果实 SOD 和 POD 的活性, 减少超氧化物自由基在体内的生成, 从而抑制由超氧化物自由基介导的 ACC 形成乙烯的能力及其对膜系统的伤害<sup>[11]</sup>; 采后热处理 (果实、蔬菜) 可抑制呼吸、乙烯产生、软化及与衰老相关的其它过程<sup>[12]</sup>; 热处理与  $\text{Ca}^{2+}$  结合比单独处理能较好地保持苹果的品质<sup>[13]</sup>。本实验也表明,  $\text{Ca}^{2+}$  处理可提高黄皮种子脱水和贮藏后的活力, 进一步证明了 Ca 在延缓衰老、防止劣变方面的广泛效果。PEG 引发的目的是为达到慢吸胀的效果, 劣变种子在吸胀初期由于水分迅速进入使膜系统易受损害, 以致难以修复, PEG 引发则能控制种子吸水速度, 使膜恢复到正常或接近正常状态。由此可推测,  $\text{Ca}^{2+}$  处理与 PEG 引发相结合提高了黄皮种子脱水后的活力应是保护了膜的正常功能并减少了膜的损伤。

由于黄皮种子成熟时具有较高的含水量,较高的呼吸活性,金剑平等<sup>[2]</sup>认为成熟的黄皮种子已进入了萌发过程。Leprince等<sup>[14]</sup>认为呼吸代谢通过伤害的自由基机制在植物组织的脱水敏感性中起着中心的作用,脱水伤害的程度取决于脱水过程中的脱水条件(温度、氧及其它外界因子)和植物组织本身的代谢状态,脱水过程中代谢活性越高脱水造成的损伤就越大。本实验通过脱水前抗氧化剂预处理能一定程度上提高黄皮种子的活力,进一步证实黄皮种子脱水伤害及贮藏过程中的劣变与其已进入萌动过程、较高的呼吸代谢水平有密切相关。有关黄皮种子脱水敏感性的呼吸代谢生理正在研究中。

### 参考文献

- 1 宋松泉,傅家瑞.黄皮种子脱水敏感性与萌发事件的研究.华南植物学报,1992,试刊I:48-52
- 2 金剑平等.不同发育时期黄皮种子脱水敏感性的研究.热带亚热带植物学报,1994,2(2):58-64
- 3 吕小红,傅家瑞.聚乙二醇渗透调节处理提高花生种子活力和抗寒性.中山大学学报(自然科学版),1990,29(1):63-70
- 4 吴晓东,杨兴洪.植物种子的引发研究.植物学通报,1996,13(1):32-36
- 5 Benley J D, Black M. Seed Physiology of Development and Germination, New York; Plenum Press, 1985, 343-345
- 6 傅家瑞.花生种子萌发前期生理与提高种质的途径.中山大学学报(自然科学版),1994,33(2):115-122
- 7 Michel B E, Kaufmann M R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiol, 1973, 51:914-916
- 8 黄学林,陈润政编.种子生理学实验手册.北京:农业出版社,1990,83-84
- 9 Poovaiah B W. Molecular and cellular aspects of calcium action in plants. HortScience, 1988, 23:267-271
- 10 袁小丽等. CaCl<sub>2</sub> 和多胺对花生种子乙烯释放和提高种子活力的影响.中山大学学报(自然科学版),1990,29(4):91-98
- 11 关军锋等.采后钙处理“金冠苹果乙烯生成、超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性的影响.中国植物生理学会第七次全国会议学术论文汇编,太原:中国植物生理学会,1996,128
- 12 Klein J D, Lurie S. Heat treatment for improved postharvest quality of horticultural crops. Hort Technology, 1992, 2:316-320
- 13 Lurie S, Klein J D. Calcium and heat treatments to improve storability of 'Anna' apples. HortScience, 1992, 27:36-39
- 14 Leprince O et al. The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature. Physiol Plant, 1995, 94:233-240