

黄皮种子脱水敏感性与萌发事件的研究*

宋松泉 傅家瑞

(中山大学生物系, 广州 510275)

摘 要

黄皮种子对脱水非常敏感,含水量从 51% 下降至 22.4%,种子的发芽率和发芽指数为零,是典型的顽拗性种子。自然脱水时,种子中可溶性糖的含量增加,淀粉的含量下降;磷酸化酶,异柠檬酸裂解酶以及胚轴中 α -和 β -淀粉酶的活性先增加然后下降;子叶中 α -和 β -淀粉酶的活性呈下降趋势。这些变化类似于吸水萌发的黄皮和豌豆种子。可以认为黄皮种子脱水敏感性的原因是在脱落时萌发。随着萌发过程的进行,水分成为限制因子,使种子生活力丧失。

关键词:黄皮种子;脱水敏感性;萌发事件;顽拗性种子

黄皮是一种有名的亚热带水果。其种子在贮藏过程中对脱水和低温敏感,是一种典型的顽拗性种子(Recalcitrant seeds)^[15,17]。Berjak 等^[8,9]用海榄雌(*Avicennia marina*)种子为材料,研究了种子脱水敏感性与亚细胞结构的变化,认为顽拗性种子脱水敏感性的原因是在脱落时或者脱落前后开始萌发。本文以黄皮种子为材料,研究了顽拗性种子脱水敏感性与萌发事件的关系。

材料与方 法

供试的黄皮品种为鸡心(*Clausena lansium* [lour.] Skeels cv. Jixin),购于广州市康乐市场。剥取种子并经过选择后,放在 28—30℃、相对湿度为 72—82%的条件下自然脱水,分别在 0、2、4、6、8、10 和 12 天取样进行各项测定。

种子生活力和发芽指数的测定 按照傅家瑞^[6]的方法。

含水量的测定 按照 Chin 等^[12]的方法,将胚轴和切成 1mm 厚的子叶薄片放在 101—105℃烘箱中 16h,以鲜重为基础计算含水量。

可溶性糖含量的测定 按照黄学林等^[7]的蒽酮比色法,以干重的百分数表示。

淀粉含量的测定 按照袁晓华和杨中汉^[1]的砷钼酸比色法测定还原糖的含量,然后以干重为基础,推算淀粉的含量。

* 国家自然科学基金和联合国国际植物遗传资源委员会(IBPGR)资助项目。

α-和β-淀粉酶活性的测定 按照夏叔芳和於新建^[3,4]的方法,用降解淀粉的 mg 数 · mg⁻¹ 蛋白 h⁻¹ 表示 α-淀粉酶的活性;β-淀粉酶的活性用形成麦糖的 mg 数 · mg⁻¹ 蛋白 h⁻¹ 表示。

磷酸化酶活性的测定 按照 Whelan^[21] 的方法,酶活性用形成 μmol/L 无机磷 · mg⁻¹ 蛋白 h⁻¹ 表示,用 KH₂PO₄ 做工作曲线。

异柠檬酸裂解酶活性的测定 按照 MoFadden^[18] 的方法,用形成乙醛酸的 μg 数 · mg⁻¹ 蛋白 h⁻¹ 表示酶活性。

蛋白质含量的测定 按照 Bradford^[11] 的考马斯亮蓝 G-250 方法,以牛血清白蛋白作标准。

以上实验均取三次重复平均值。

实验结果

一、种子含水量与生活力的变化

刚剥取的黄皮种子,千粒重约为 520g;胚轴:子叶的比率约为 1:178。胚轴的含水量(61%)比子叶的含水量(51%)高。种子的含水量约等于子叶的含水量。其发芽率和发芽指数分别为 100%和 14.3。自然脱水时,随着胚轴和子叶的含水量下降,种子的发芽率和发芽指数降低(图 1)。当胚轴的含水量下降至 55.2%(子叶的含水量下降至 43.6%)时,种子的发芽率仍为 100%,而发芽指数已下降了 51.5%。当胚轴含水量下降至 40.2%(子叶的含水量下降至 31.4%)时,发芽率下降为 12%,发芽指数继续下降约 97%。在临界状态下(从第 4 天到第 10 天),胚轴的含水量只丧失约 15%(子叶的含水量只丧失 12.2%),其发芽率和发芽指数却分别下降了 88%和 45%,说明黄皮种子对水分丧失高度敏感。

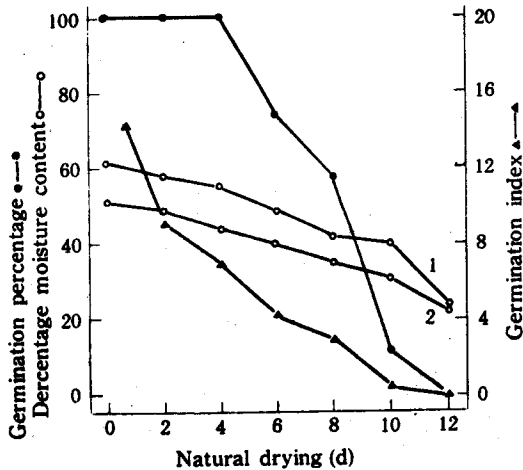


图 1 黄皮种子自然脱水对含水量、发芽率和发芽指数的影响

Fig. 1 Effects of natural desiccation on moisture content, germination percentage and germination index of Chinese Wampee seeds.

1. 胚轴 embryonic axes; 2. 子叶 cotyledon

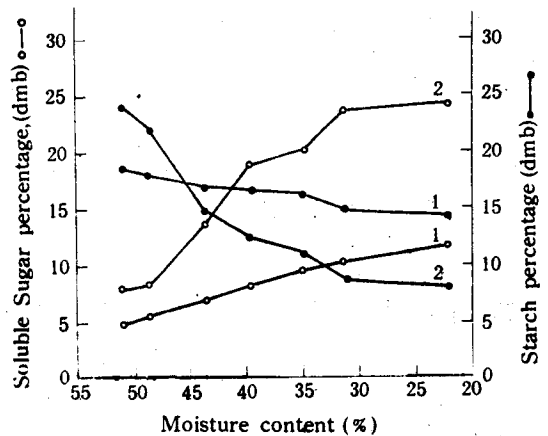


图 2 黄皮种子脱水过程中可溶性糖和淀粉含量的变化

Fig. 2 The changes of soluble sugar and starch content in Chinese Wampee seeds during desiccation

1. 胚轴 embryonic axes; 2. 子叶 cotyledon

二、可溶性糖和淀粉含量的变化

黄皮胚轴和子叶中可溶性糖的含量分别为 4.8% 和 7.8%。在脱水过程中,可溶性糖的含量增加(图 2),但子叶中可溶性糖的增加量比胚轴大得多。而胚轴和子叶中淀粉含量的变化则相反,淀粉含量随着水分丧失而下降(图 2),但胚轴中淀粉含量的变化比子叶小。当种子含水量从 51% 下降至 22.4% 时,胚轴和子叶中可溶性糖的含量分别增加了约 2.4 和 3.1 倍;淀粉的含量却分别下降了约 4% 和 16%。

三、 α -和 β -淀粉酶活性的变化

自然脱水时,胚轴中 α -和 β -淀粉酶活性先增加,然后稍有下降,到种子生活力完全丧失时, α -和 β -淀粉酶活性仍分别为新鲜胚轴的 85% 和 104% (图 3)。但子叶中 α -和 β -淀粉酶活性则随水分丧失而下降,变化趋势与种子发芽率相一致(图 1,3)。从图 1,3 中可以看出,当种子发芽率为 100% 时,子叶中 α -和 β -淀粉酶活性较高,酶活性随发芽率下降而降低。

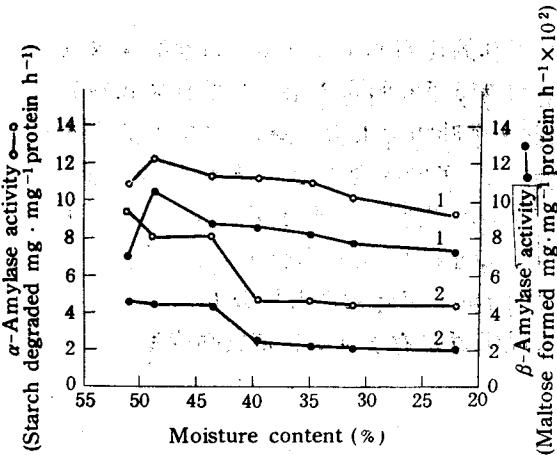


图 3 黄皮种子脱水过程中 α -和 β -淀粉酶活性的变化

Fig. 3 The changes of α -and β -amylase activity during desiccation of Chinese Wampee seeds

1. 胚轴 embryonic axes; 2. 子叶 cotyledon

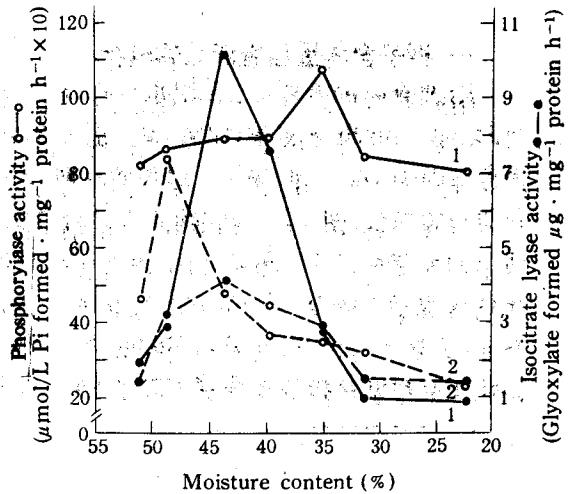


图 4 黄皮种子脱水过程中磷酸化酶和异柠檬酸裂解酶活性的变化

Fig. 4 The changes of phosphorylase and Isocitrate lyase activity of Chinese Wampee seeds during desiccation

1. 胚轴 embryonic axes; 2. 子叶 cotyledon

四、磷酸化酶和异柠檬酸裂解酶活性的变化

胚轴和子叶中磷酸化酶的活性随着种子含水量的下降而先上升后下降,胚轴中酶活性比子叶高(图 4),在新鲜种子中,胚轴的磷酸化酶活性是子叶的 179%。但酶活性高峰子叶比胚轴早 6 天。

异柠檬酸裂解酶活性的变化与磷酸化酶相似(图 4)。但胚轴的酶活性比子叶高得多,且活性高峰位于同一时期(种子脱水的第 4 天)。

讨 论

产生顽拗性种子的植物主要分布于热带和亚热带,如热带作物可可、橡胶、热带果树芒果、榴莲、荔枝以及热带林木坡垒、青皮等^[6,17]。大多数顽拗性种子体积大和重,千粒重常常超过 500g^[13]。在进入生理成熟期,正常性种子(Orthodox seeds)的含水量为 30—50%,然后通过脱水,到收获期的含水量为 15—20%。通常能被进一步干燥直到含水量在 1—5%的范围而不受到伤害。顽拗性种子在生理成熟时的含水量为 50—70%,一般不经过干燥,脱离母株时的含水量相对较高,种子对脱水伤害的反应高度敏感^[12,14]。黄皮主要分布于亚热带,千粒重约为 520g。刚收获的种子含水量为 51%(胚轴为 61.1%),在脱水过程中,种子的发芽率和发芽指数迅速下降,表现出典型的顽拗性种子特性。

玉米种子在萌发的 8 天之内,可溶性糖显著增加,半纤维素和淀粉减少。豌豆种子萌发时,淀粉和糊精的含量下降。大豌豆种子的萌发过程中,淀粉酶和磷酸化酶活性先增加然后下降^[10]。在未萌发的棉籽、蓖麻籽及南瓜籽中,异柠檬酸裂解酶的活性很低,而在萌发的向日葵、大豆、花生、西瓜等子叶中,存在着活跃的异柠檬酸裂解酶。这些酶活性迅速上升,达到高峰后又下降^[6]。顽拗性种子一般富含淀粉而脂质含量较少^[20]。离果的黄皮种子,洗净后放在垫有两层湿润滤纸的培养皿中,室温下(26—30℃)吸胀萌发。吸胀 72 小时后,胚根突出种皮。在吸水萌发过程中,种子的发芽率和可溶性糖含量增加;淀粉的含量下降; α -和 β -淀粉酶,以及异柠檬酸裂解酶的活性先增加然后下降。 α -、 β -淀粉酶和异柠檬酸裂解酶的活性高峰分别位于吸水萌发的 48,6 和 96 小时(宋松泉和傅家瑞,未发表资料)。黄皮种子在脱水过程中,可溶性糖含量增加,淀粉含量减少; α -和 β -淀粉酶、磷酸化酶以及异柠檬酸裂解酶的活性变化类似于吸水萌发的正常性种子和顽拗性种子(黄皮种子)。除杂交水稻干种子存在 α -淀粉酶外^[2],在其他种子中还未见报道存在 α -淀粉酶和异柠檬酸裂解酶,人们认为这两种酶是在种子萌发过程中重新合成的^[10,19]。刚收获的黄皮种子中 α -淀粉酶和异柠檬酸裂解酶就有一定的活性,很可能这两种酶是在种子采收前合成的。

Berjak 等^[8,9]发现,海榄雌种子刚刚脱落时,虽然外表上呈静止状态,但仍有代谢活性。根原基细胞紧密,极少液泡化,高尔基体,多聚核糖体已形成,线粒体有清晰的嵴及相对的电子透明基质,质体不含贮藏物质。脱落后不久,亚细胞结构开始变化。这些变化类似于萌发种子早期发生的变化,包括线粒体形成的速度加快,琥珀酸脱氢酶活性上升,细胞质和与膜结合的多核糖体以及蛋白质合成增加。甚至在没有加水的情况下,这些变化在短期内也连续发生。

因此,可以认为顽拗性种子脱水敏感性的原因是在脱落时或者脱落后开始萌发。随着萌发过程的进行,细胞内各种代谢活动不断增强,种子或者幼苗对脱水变得非常敏感,水分丧失、甚至不丧失都会引起生活力下降,最终导致死亡。

参 考 文 献

- [1] 袁晓华、杨中汉主编,植物生理生化实验。高等教育出版社,1983,19—23。
- [2] 陆定志、杨煜峰、施天生等,杂交水稻干种子内存在 α -淀粉酶。植物生理学报,1987,13(4): 418—421。

- [3] 夏叔芳、於新建、苏丽英,大豆叶片淀粉酶的特性。植物生理学报,1989a,15(1): 41—45。
- [4] 夏叔芳、於新建,大豆叶片淀粉的降解及淀粉降解酶。植物生理学报,1989b,15(2):153—157。
- [5] 黄学林、陈润政等编,种子生理实验手册。农业出版社,1990,41—43。
- [6] 傅家瑞,种子生理。科学出版社,1985,66—393。
- [7] 傅家瑞,顽拗性种子。植物生理学通讯,1991,27(6):402—406。
- [8] Berjak, P., M. Dini and N. W. Pammenter, Possible mechanisms underlying the differing dehydration responses in recalcitrant and orthodox seeds; desiccation-associated subcellular changes in propagules of *Aricensia marina*. *Seed Sci & Technol.*, 1984, 12; 365—384.
- [9] Berjak, P., J. M. Farrant and N. W. Pammenter, The basis of recalcitrant seed behaviour. In: Recent advance in the development and germination of seeds, Taylorson, R. B. (ed), Plenum Press, New York, 1990, 89—108.
- [10] Bewley, J. D., and M. Black, *Seeds*. Plenum Press, New York, 1985, 253—303.
- [11] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72; 248—254.
- [12] Chin, H. F., B. Kirshnapillay and P. C. Stanwood, Seed moisture, recalcitrant vs. orthodox seed. In: Seed Moisture, Stanwood, P. C., M. B. McDonald(eds), CSSA special publication No. 14, USA, 1989, 15—22.
- [13] Chin, H. F., Conservation of recalcitrant seeds. In: Conservation of Plant Genetic Resource Through in Vitro Methods, FRIM/MNCPGR, 1991, 19—27.
- [14] Farrant, J. M., N. W. Pammenter and P. Berjak, Recalcitrance—a current assessment. *Seed Sci & Technol.*, 1988, 10; 155—166.
- [15] Fu, J. R., B. Z. Zhang and X. F. Wang. Desiccation and storage of four recalcitrant seeds. In: 22nd International seed testing congress, Edinburgh. Abstracts of papers, No. 9. 1989.
- [16] Fu, J. R., B. Z. Zhang, and X. F. Wang, et al., Physiological studies on desiccation, wet storage and cryopreservation of recalcitrant seeds of three fruit species and their excised embryonic axes. *Seed Sci & Technol.*, 1990, 18; 743—754.
- [17] Hofmann, P., and A. M. Steiner, An updated list of recalcitrant seeds. *Landwirtschaftliche forschung*, Frankfurt, 1989, 42 (4); 310—323.
- [18] McFadden, B. A., Isocitrate lyase. *Methods in enzymology*, 1969, 13, 163—170.
- [19] Moore, T. C., *Biochemistry and physiology of plant hormones*. 2nd edition. Springer-Verlag, New York, 1989, 1—27.
- [20] Tompsett, P. B., Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. *Ann. Appl. Biol.*, 1984, 105; 581—586.
- [21] Whelan, W. J., Phosphorylases from plants. *Methods in enzymology*, 1955, 1; 192—199.

STUDIES ON DESICCATION-SENSITIVITY AND GERMINATIVE EVENTS IN CHINESE WAMPEE (*CLAUSENA LANSIUM* [LOUR.] SKEELS) SEEDS

Song Songquan Fu Jiarui

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract

Chinese Wampee seed which is very sensitive to desiccation is a typical recalcitrant seed. Initially, the mean moisture contents of seeds were about 51% (wmb). The viability and germination index of seeds were lost completely when moisture content decreased to 22.4%. As seeds dry naturally, the content of soluble sugar in seeds increased and the content of starch in seeds decreased. In the meantime, the activities of phosphorylase and isocitrate lyase in seeds, and that of α - and β -amylase in embryonic axes rose initially, and then declined. These changes were very similar to those occurred in the germinating seeds of Chinese Wampee and pea. It is considered that the reason why Chinese Wampee seeds are sensitive to desiccation might be that the seeds germinate at their shedding. As these germination-related events proceed, the seeds become increasingly sensitive to desiccation, water becomes a limiting factor and the viability of seeds is lost.

Key words: Chinese Wampee seed; Desiccation-sensitivity; Germination-related events; Recalcitrant seeds