

# ‘紫柄籽银桂’桂花种子脱水耐性与抗氧化系统的关系

李文君<sup>1</sup>, 沈永宝<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京林业大学风景园林学院, 南京 210037; <sup>2</sup>南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037)

**摘 要:** 通过测定‘紫柄籽银桂’桂花种子在自然脱水过程中生理生化的变化, 研究种子的脱水敏感性。结果表明: ‘紫柄籽银桂’种子不耐脱水, 种子生活力随着含水量的下降而降低, 种子含水量下降到 11.6% 时, 生活力仅为 6%; 自然脱水过程中, 种子细胞膜系统受到损伤, 相对电导率不断上升; 种子内 SOD 活性随着含水量下降而呈总体下降的趋势; POD 先波动上升, 脱水 12 h 时达到最大值, 之后急剧下降。种子  $O_2^-$  含量在脱水 12 h 之前随含水量的下降而下降, 12 h 之后随含水量的下降而急剧上升; 随着脱水的进行细胞膜质过氧化程度加剧, MDA 含量增加, 导致种子丧失生活力。

**关键词:** 桂花; 种子; 含水量; 生活力; 脱水耐性

中图分类号: S 685.14 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 02-0279-06

## Changes on Physiological Characteristics of *Osmanthus fragrans* ‘Zibing Ziyingui’ Seeds During Dehydration

LI Wen-jun<sup>1</sup> and SHEN Yong-bao<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; <sup>2</sup>College of Forestry Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** The physiological characteristics changes of *Osmanthus fragrans* ‘Zibing Ziyingui’ seeds during natural dehydration were measured to study the seed desiccation sensitivity. The results showed that *O. fragrans* seeds were desiccation-sensitive as the seed viability declined to 6% when the seed moisture content was reduced to 11.6%. The seed electrical conductivity increased with the declining moisture content, a sign, which was caused by increasing cell membrane cleavage. Superoxide dismutase (SOD) activity decreased rapidly during desiccation; But peroxidase (POD) activity increased to the maximal value when dehydration for 12 h, then declined rapidly when seeds were dehydrated more than 12 h. Superoxide anion radical content decreased with the declining moisture content, but it would increase rapidly when seeds were dehydrated more than 12 h. Malondialdehyde (MDA) content increased as seed moisture content declined, indicating that membrane peroxidation was accelerated and the seed viability would be lost.

**Key words:** *Osmanthus fragrans*; seed; moisture content; viability; desiccation sensitivity

根据贮藏特性, 种子可被分为正常性种子和顽拗型种子两大类 (Roberts, 1973)。顽拗型种子从母株上脱落时通常含水量很高且对脱水敏感, 干燥后易丧失生活力 (Berjak & Pammenter, 2004)。Vertucci 和 Farrant (1995) 指出, 种子耐脱水性可能是一种数量性状, 与种子内蛋白质、脂肪、碳水化合物化合物的积累正相关。

收稿日期: 2008 - 09 - 09; 修回日期: 2009 - 01 - 19

基金项目: 教育部林木和花卉种质资源标准化整理、整合与共享项目 (505002)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: ybshen@njfu.com.cn; ybshen@njfu.edu.cn)

顽拗型种子脱水敏感性是一种复杂的生理现象,其机理尚不清楚,可能受到劣变或保护机制的调节 (Kemmode & Finch-Savage, 2002)。Pammenter和 Berjak (1999)指出,顽拗型种子在脱水后死亡的原因可能是某些代谢活动被破坏、自由基攻击和氧化作用。脂类过氧化加剧和抗氧化保护系统活性的下降被认为是顽拗型种子脱水过程中生活力下降的主要原因 (Greggains et al, 2001),顽拗型种子在干燥过程中伴随着脂类过氧化的加剧和自由基的积累。Bailly等 (2001)指出,种子耐脱水能力也可能与细胞内清除氧化反应的保护机制有关;Li和 Sun (1999)报道,可可种子胚轴和子叶的脱水敏感性与抗氧化系统酶的活性快速下降有密切关系。顽拗型种子 SOD、CAT、POD、ASA-POD活性的高低直接影响着脱水耐性。但是对碳水化合物在脱水过程中所起作用,研究结果并不一致。

桂花 (*Osmanthus fragrans* Lour) 为木犀科木犀属植物,具有很高的园林观赏价值。桂花种子为有胚乳种子,成熟后不能立即萌发 (陈俊愉, 2001)。对桂花种子贮藏特性和耐脱水性的研究还未见报道,其脱水敏感性的机理尚不清楚。作者旨在通过对‘紫柄籽银桂’ (*Osmanthus fragrans* ‘Zibing Ziyingui’) 桂花种子自然脱水过程中抗氧化系统的变化与生活力等的相关研究,揭示其种子脱水敏感特性,为种子贮藏和种质资源保存奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试种子材料

本试验所用的‘紫柄籽银桂’ (*Osmanthus fragrans* ‘Zibing Ziyingui’) 成熟种子于 2007年 5月中旬采自南京市江宁区实验茶场,采后立即去除果肉,将种子保存于  $(3 \pm 1)$  °C 冰箱中备用。

### 1.2 种子脱水及含水量与生活力测定

2007年 5月 20日,按照林木种子检验规程 (GB2772-1999) (国家质量监督局, 1999) 测定种子的初始含水量。之后将种子置于室温  $(25 \pm 1)$  °C,自然干燥 72 h。在干燥过程中于 0、1、2、3、4、5、7、9、12、24和 72 h各取 4 × 100粒种子,剥去外种壳,剥离胚 (但不伤及胚),立即放入 0.5% TTC溶液中染色 4 ~ 6 h (35 °C 恒温箱)。根据染色结果,计算种子生活力 (国家质量监督局, 1999)。

在得知种子的初始含水量 (G) 后,根据种子在自然脱水之前的质量  $M_1$  与脱水之后的质量  $M_2$ ,推算种子相对含水量 (%) =  $[M_2 - M_1 \times (1 - G)] / M_2 \times 100$ 。

### 1.3 相对电导率和抗氧化系统指标测定

参考韩建国等 (2000) 的方法,采用 DS-11A (DDS-1A) 型电导率仪测定电导率,3次重复。

取脱水不同时间的种子 (去除种壳),按照张志良和瞿伟菁 (2003) 的方法测定 POD活性,按照高俊凤 (2006) 的方法测定 SOD活性、超氧阴离子自由基含量和 MDA含量。均 3次重复。

### 1.4 生理指标的相关分析

使用 SPSS 15.0分析软件进行各生理指标的相关分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 种子脱水过程中生活力的变化

成熟‘紫柄籽银桂’种子的初始含水量为 36%,在脱水过程中种子含水量不断下降,5 h内下降较快,其后下降缓慢 (图 1)。在自然脱水  $(25 \pm 1)$  °C 条件下,种子含水量下降到 20.7%需 12 h,下降到 16.4%需 24 h,而降低到 11.6%则需 72 h。

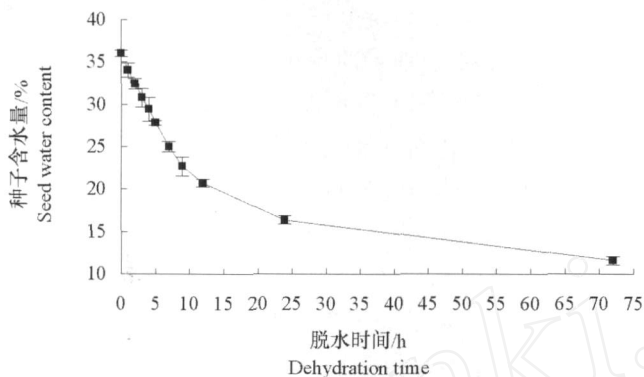


图1 '紫柄籽银桂' 种子脱水过程中含水量的变化

Fig. 1 Changes on seed water contents of *O. fragrans* 'Zibing Ziyingui' during dehydration

在自然脱水过程中, '紫柄籽银桂' 种子生活力随着含水量的下降而不断降低 (图 2), 方差分析表明种子含水量对生活力有极显著的影响 ( $P < 0.001$ )。在初始含水量 (36%) 时, 种子生活力为 74%; 当种子含水量下降到 22.7% 时, 生活力下降到 16.0%; 而当含水量下降到 11.6% 时, 生活力仅为 6.2%。'紫柄籽银桂' 种子生活力随含水量变化的过程特点表现出顽拗型种子特征 (Roberts, 1973)。

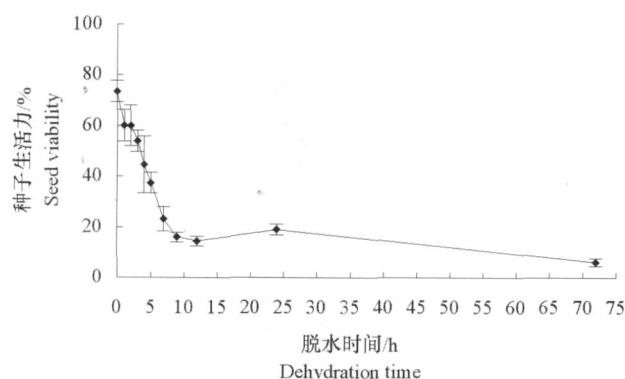


图2 '紫柄籽银桂' 种子脱水过程中生活力的变化

Fig. 2 Changes on seed viabilities of *O. fragrans* 'Zibing Ziyingui' during dehydration

## 2.2 种子脱水过程中相对电导率的变化

在自然脱水过程中, 种子相对电导率不断上升 (图 3), 这说明膜结构的破坏不断加剧。特别是在脱水初期的前 4 h, 膜系统透性急剧增加, 后期的变化趋于缓慢。

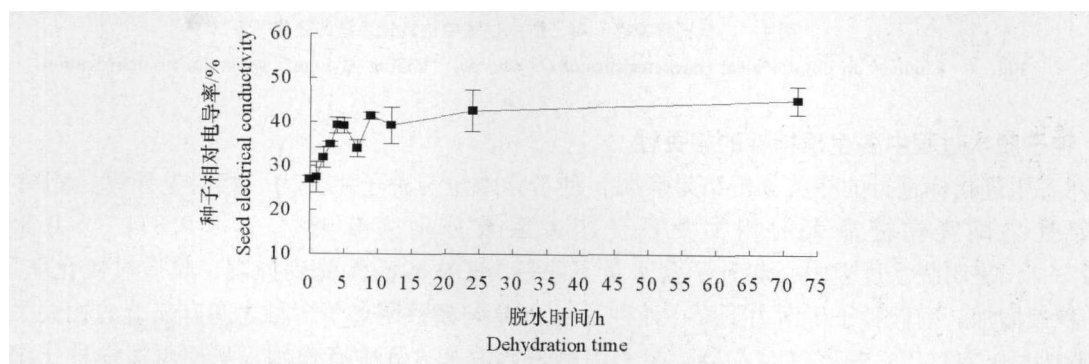


图3 '紫柄籽银桂' 种子脱水过程中相对电导率的变化

Fig. 3 Changes on seed electrical conductivity of *O. fragrans* 'Zibing Ziyingui' during dehydration

### 2.3 种子脱水过程中抗氧化体系的变化

从图 4, A 中可以看出, ‘紫柄籽银桂’种子的 SOD 活性随着含水量下降而呈总体下降的趋势, 在脱水前 5 h 由  $360.3 \text{ U} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$  下降到  $112.8 \text{ U} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ , 随后虽小幅度提高, 但总体呈缓慢下降趋势。方差分析也表明含水量变化对 SOD 活性的影响达到极显著水平 ( $P < 0.001$ )。由于 SOD 活性下降, 种子细胞内的氧化过程可能会因此而上升, 加速种子生活力的丧失。

从图 4, B 中可以看出, 在自然脱水过程中, ‘紫柄籽银桂’种子的 POD 活性先波动性上升, 脱水 12 h 时达到最大值, 此后, 急剧下降。

种子自然脱水 12 h 时,  $\text{O}_2^-$  含量随含水量的下降而下降, 脱水 12 h 后, 又随含水量的下降而急剧上升 (图 4, C), 表明此时活性氧清除系统可能被严重破坏。值得注意的是, 脱水 12 h 时 POD 的活性达到最大值, 表明 POD 对清除  $\text{O}_2^-$  有作用。

从图 4, D 中可以看出, ‘紫柄籽银桂’种子中 MDA 含量随着含水量的下降而增加, 表明随着脱水的进行, 细胞膜脂质过氧化程度加深, 膜系统的功能也可能受到了严重的破坏, 引起 MDA 的大量积累。

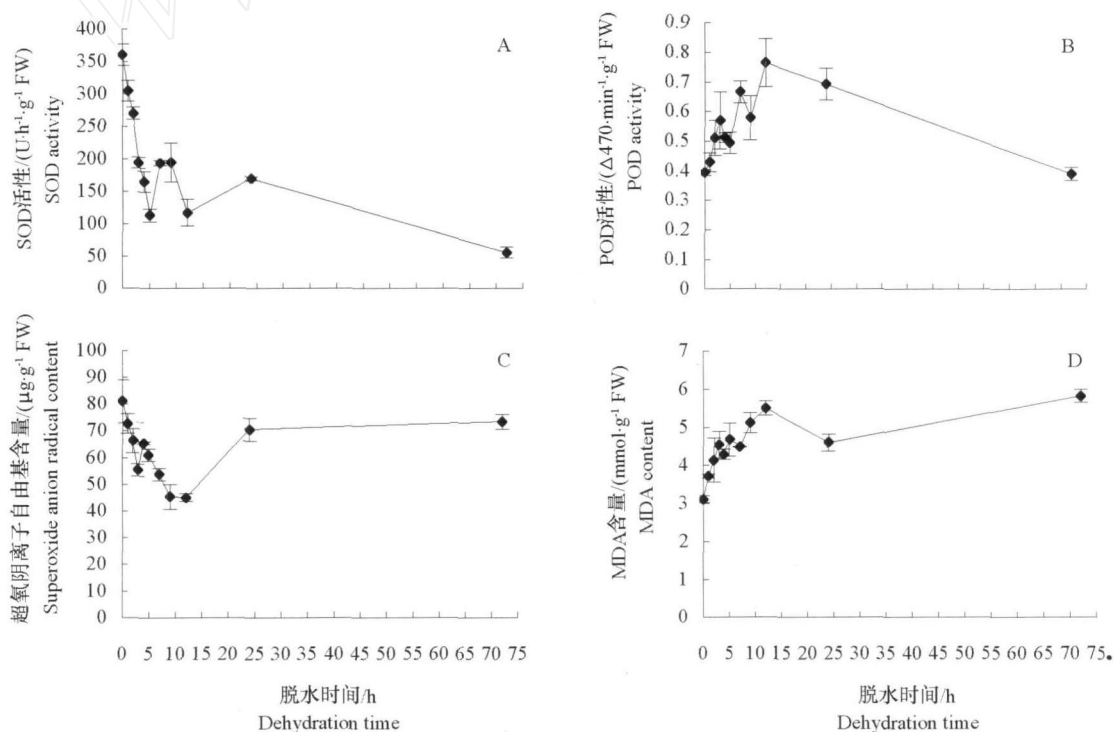


图 4 ‘紫柄籽银桂’种子脱水过程中抗氧化系统的变化

Fig. 4 Changes on physiological characteristics of *O. fragrans* ‘Zibing Ziyngui’ seeds during dehydration

### 2.4 种子脱水过程中各生理指标的相关性

对各生理指标进行的相关分析结果表明, 种子含水量与种子生活力、相对电导率、MDA 含量及 SOD 活性之间存在极显著的相关关系 (相关系数分别为  $0.938^{**}$ 、 $-0.874^{**}$ 、 $0.856^{**}$  和  $0.801^{**}$ ), 表明脱水过程中引起种子含水量下降后, SOD 的活性受到抑制, 膜质过氧化作用加剧, MDA 积累增加, 引起种子生活力下降; 而种子中 POD 与超氧阴离子含量之间有显著的相关关系 (相关系数为  $-0.711^{*}$ ), 表明 POD 在清除超氧阴离子自由基过程中有作用, 从而可保护种子细胞免受自由基的伤害。

### 3 结论与讨论

在自然脱水过程中, '紫柄籽银桂' 种子生活力不断下降, 表明种子不耐脱水, 属顽拗型种子, 种子的脱水耐性的临界含水量为 27.8%, 低于此含水量种子生活力急剧下降。Wang等 (2002) 指出可以利用电导率来确定脱水耐性的临界含水量, 且脱水速率也对临界含水量产生影响。相对电导率测定结果表明, 在自然脱水过程中, 种子相对电导率在前 5 h (含水量高于 27.8% 时) 增加不明显, 并且与种子生活力呈负相关, 这与银杏种子、七叶树种子、银槭种子、*Trichilia anetica* 种子胚轴和木菠萝胚轴脱水过程中浸泡液的电导率呈上升趋势的研究结果 (Becwar et al, 1982; Wesley-Smith, 2001; 颜世超等, 2005; Kioko et al, 2006; Yu et al, 2006) 相似。

Francini等 (2006) 认为, 种子在脱水过程中失去活力最可能的原因是抗氧化系统效率下降和自由基含量上升。本研究中发现, 在脱水过程中, '紫柄籽银桂' 种子中 SOD 的活性随着含水量的下降而降低, 与银槭、木豆、欧洲板栗、欧洲七叶树种子胚轴、银杏种子、小麦芽、七叶树种子的研究结果 (Finch-Savage et al, 1994, 1996; Kalpana et al, 1994; Niedzwiedz-Siegien et al, 2004; 颜世超等, 2005; Francini et al, 2006; Yu et al, 2006) 相一致, 但与脱水时玉米胚中 SOD 活性先下降后增加的变化趋势 (罗银玲等, 2005) 不同, 其原因有待进一步研究。

在自然脱水过程中, '紫柄籽银桂' 种子中 POD 活性先波动性上升, 最后急剧下降, 这与荔枝种子、板栗种子胚轴和银杏种子 (Song & Fu, 1999; 颜世超等, 2005; 宗梅等, 2006) 脱水时 POD 活性变化的趋势一致。另外, '紫柄籽银桂' 种子内 POD 活性只与种子内的超氧阴离子含量之间存在显著的负相关关系, 表明 POD 活性这种变化趋势可能与种子脱水过程中自由基含量的变化有关系。

在自然脱水过程中, '紫柄籽银桂' 种子内超氧阴离子自由基含量先是随含水量的下降而下降, 最后又急剧上升。这种变化趋势可能是由于含水量较高时, 种子中的 SOD 和 POD 等自由基清除酶系的活性较高, 可以有效的清除超氧阴离子自由基, 但是当含水量下降到 20.7% 以下时, 自由基清除酶系的活性下降, 不能有效的清除该自由基, 反而引起自由基含量上升, 这与大叶南洋杉的研究结论 (Finch-Savage et al, 1994, 1996; Francini et al, 2006) 一致。在自然脱水条件下, '紫柄籽银桂' 种子中的 MDA 含量随着含水量的下降而上升, 这种变化与板栗胚轴、七叶树种子脱水时 MDA 含量变化 (Yu et al, 2006; 宗梅等, 2006) 相同, 但与小麦芽、玉米胚、银杏种子脱水时先上升后下降的趋势 (Niedzwiedz-Siegien et al, 2004; 罗银玲等, 2005; 颜世超等, 2005) 不一致, 这可能是由不同植物种类的特点决定的。此外, '紫柄籽银桂' 种子脱水过程中, 活性氧清除酶活性被破坏后, 活性氧开始积累, 并介导产生了 MDA, 加剧了膜质过氧化过程。通过对 '紫柄籽银桂' 种子在自然脱水条件下各生理指标变化的测定表明, 脱水对种子的伤害表现在脱水对细胞膜产生了伤害, 破坏了细胞膜的完整性; 同时, 在脱水过程中, SOD、POD 等抗氧化系统活性下降, 引起 MDA、超氧阴离子的积累, 加剧了过氧化作用, 导致了种子生活力的下降或丧失。

### References

- Chen Jun-yu. 2001. The flower taxonomy in China. Beijing: China Forestry Publishing House: 198 - 206. (in Chinese)
- 陈俊愉. 2001. 中国花卉品种分类学. 北京: 中国林业出版社: 198 - 206.
- Bailly C, Audigier C, Ladonne F, Vagner M H, Coste F, Corbineau F, Côme D. 2001. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. J Exp Bot, 52: 701 - 708.
- Becwar M R, Stanwood P C, Roos E E. 1982. Dehydration effects on imbibitional leakage from desiccation-sensitive seeds. Plant Physiol, 69: 1132 - 1135.
- Berjak P, Pammenter N W. 2004. Recalcitrant seeds. Benech-Arnold R L, Sánchez R A. Handbook of seed physiology. New York: Food Products Press: 305 - 345.

- Francini A, Galleschi L, Saviozzi F, Pinzino C, Izzo R, Sgheri C, Navari-Izzo F. 2006. Enzymatic and non-enzymatic protective mechanisms in recalcitrant seeds of *Araucaria bidwillii* subjected to desiccation. *Plant Physiol Biochem*, 44: 556 - 563.
- Finch-Savage W E, Blake P S, Clay H A. 1996. Desiccation stress in recalcitrant *Quercus robur* L. seeds results in lipid peroxidation and increased synthesis of jasmonates and abscisic acid. *J Exp Bot*, 47: 661 - 667.
- Finch-Savage W E, Hendry G A F, Atherton N M. 1994. Free radical activity and loss of viability during drying desiccation-sensitive tree seeds. *Proc Royal Soc Edinb*, 102B: 257 - 260.
- Gao Jun-feng. 2006. Experimental guidance for plant physiology. Beijing: Higher Education Press (in Chinese).
- 高俊凤. 2006. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of P. R. C. Rules for forest tree seed testing. Beijing: Standard Press of China (in Chinese).
- 国家质量监督局. 1999. 林木种子检验规程. 北京: 中国标准出版社.
- Greggains V, Finch-Savage W E, Atherton N M, Berjak P. 2001. Viability loss and free radical processes during desiccation of recalcitrant *Avicennia marina* seeds. *Seed Sci Res*, 11: 235 - 242.
- Han Jian-guo, Qian Jun-zhi, Liu Zi-xue. 2000. A study on improving seed vigour by PEG treatment in *Zoysiagrass*. *Grassland of China*, (3): 22 - 28. (in Chinese).
- 韩建国, 钱俊芝, 刘自学. 2000. PEG渗透处理改善结缕草种子活力的研究. *中国草地*, (3): 22 - 28.
- Kapana R, Madhava Rao K V. 1994. Absence of the role of lipid peroxidation during accelerated ageing of seeds of pigeonpea *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. *Seed Sci Tech*, 22: 253 - 260.
- Kemode A R, Finch-Savage B E. 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. Black M, Pritchard H W. Desiccation and survival in plants: Drying without dying. Wallingford: CAB International: 147 - 184.
- Kioko J I, Berjak P, Pammenter N W. 2006. Viability and ultrastructural responses of seeds and embryonic axes of *Trichilia anetica* to different dehydration and storage conditions. *South Afr J Bot*, 72: 167 - 176.
- Li C, Sun W Q. 1999. Desiccation sensitivity and activities of free radical-scavenging enzymes in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. *Seed Sci Res*, 9: 209 - 217.
- Luo Yin-ling, Song Song-quan, He Hui-ying, Lan Qin-ying. 2005. Changes in desiccation tolerance of *Maize* embryos during its development. *Acta Botanica Yunnanica*, 27 (3): 301 - 309. (in Chinese).
- 罗银玲, 宋松泉, 何惠英, 兰芹英. 2005. 玉米胚发育过程中脱水耐性的变化. *云南植物研究*, 27 (3): 301 - 309.
- Niedzwiedz-Siegen I, Bogatek-Leszczynska R, Côme D. 2004. Effects of drying rate on dehydration sensitivity of excised wheat seedling shoots as related to sucrose metabolism and antioxidant enzyme activities. *Plant Sci*, 167: 879 - 888.
- Pammenter N W, Berjak P. 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation tolerance mechanisms. *Seed Sci Res*, 9: 13 - 37.
- Roberts E H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci Technol*, 1: 499 - 514.
- Song S Q, Fu J R. 1999. Desiccation sensitivity and peroxidation of membrane lipids in lychee. *Trop Sci*, 39: 102 - 106.
- Vertucci C W, Farrant J M. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. Galili G, Kigel J. Seed development and germination. New York: Marcel Dekker Inc: 237 - 271.
- Wang X J, Loh C S, Yeoh H H, Sun W Q. 2002. Drying rate and dehydrin synthesis associated with abscisic acid-induced dehydration tolerance in *Spathoglottis plicata* orchidaceae protocorms. *J Exp Bot*, 53: 551 - 558.
- Wesley-Smith J. 2001. Freeze-substitution of dehydrated plant tissues: Artefacts of aqueous fixation. *Protoplasma*, 218: 154 - 167.
- Yan Shi-chao, Gao Rong-qi, Yin Yan-ping. 2005. The relationship between moisture content of *Ginkgo biloba* seeds and activity of reactive-oxygen-scavenging enzymes. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 21 (3): 207 - 210. (in Chinese).
- 颜世超, 高荣岐, 尹燕平. 2005. 银杏含水量变化与活性氧清除酶活性的关系. *中国农学通报*, 21 (3): 207 - 210.
- Yu F Y, Du Y, Shen Y B. 2006. Physiological characteristics changes of *Aesculus chinensis* seeds during natural dehydration. *J Forestry Res*, 17 (2): 103 - 106.
- Zhang Zhi-liang, Qu Wei-jing. Experimental guidance for plant physiology. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press (in Chinese).
- 张志良, 瞿伟菁. 2003. 植物生理学实验指导. 第3版. 北京: 高等教育出版社.
- Zong Mei, Cai Li-qiong, Lü Su-fang, Liu Yu-tan, Jia Shu-hua, Cai Yong-ping. 2006. Effect of different desiccation methods on *Castanea mollissima* embryo axis desiccation sensitivity and physiological metabolism. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (2): 233 - 238. (in Chinese).
- 宗梅, 蔡丽琼, 吕素芳, 刘玉潭, 贾书华, 蔡永萍. 2006. 不同脱水方法对板栗胚轴脱水敏感性和生理化的影响. *园艺学报*, 33 (2): 233 - 238.