

- 草药, 2007, 38(6): 911-914
- [5] 赵国平, 新关稔, 石川隆二, 等. 中日当归属药用植物 ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 1072-1076
- [6] Sylvain G R, Birgitta B. Phylogeny and classification of *Nardoeae* S. L. (Rubiaceae) inferred from molecular (ITS, rBCL, and tRNT-F) and morphological data [J]. *Am J Bot*, 2002, 89: 1027-1041
- [7] 陶刚, 刘涛, 朱英, 等. 贵州中药材钩藤属植物的分子鉴定 [J]. 中药材, 2008, 31(6): 825-828
- [8] Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, *et al*. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* [M]. San Diego: Academic Press, Inc. C A. 1990
- [9] Chou S J, Yen J H, Fang C L, *et al*. Authentication of medicinal herbs using PCR amplified ITS2 with specific primers [J]. *Planta Med*, 2007, 73: 1421-1426
- [10] Alvarez L, Wendel J F. Ribosomal ITS sequence and plant phylogenetic inference [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 29: 417-434

决明种子硬实及萌发特性研究

张春平¹, 何平^{1*}, 杜丹丹¹, 喻泽莉¹, 韦品祥¹, 胡世俊²

(1 西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715; 2 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要: 目的 通过对决明种子硬实和萌发特性的研究, 找到打破种子硬实、提高种子萌发率的适宜条件。方法 观察种子外部形态, 对决明种子长宽、千粒质量、净度、硬实率、含水量和吸水率进行测定, 通过研磨、预先冷冻和热水处理, 找到破除种子硬实的方法, 考察不同温度、不同质量浓度化学物质对种子萌发率的影响。结果 决明种子含水量为 10.43%, 未经处理的种子吸水率为 45.82%, 经过研磨处理和浓硫酸处理的种子吸水率分别为 154.2%、159.7%。经过 98% 浓硫酸处理 20 min 后的种子发芽率为 99.8%, 变温下 (25℃、14 h/15℃、10 h) 种子萌发率为 98.7%, 200 mg/L GA₃ 和 200 mg/L PEG 处理后的萌发率分别为 100% 和 98.9%, 较高质量浓度的 NNA 和 6-BA 对种子萌发具有明显的抑制效应。结论 种皮硬实是限制种子萌发的主要因素, 98% 的浓硫酸浸泡 20 min 可以较好地打破决明种子硬实, 200 mg/L GA₃ 和 200 mg/L PEG 能在短时间内显著提高种子的萌发率, 最佳萌发温度为 25℃, 14 h/15℃, 10 h。

关键词: 决明; 种子硬实; 吸水率; 萌发率

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)10-1700-06

Study on hardness and germination characteristic of *Cassia obtusifolia* seeds

ZHANG Chun-ping¹, HE Ping¹, DU Dan-dan¹, YU Ze-li¹, WEI Pin-xiang¹, HU Shi-jun²

(1 Key Laboratory (Ministry of Education) of Eco environments of Three Gorges Reservoir Region, Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources Research for Three Gorges Reservoir Region, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: Objective To break the seed hardness and improve the germination rate of the *Cassia obtusifolia* seeds, hardness and germination characteristic of *C. obtusifolia* seeds were studied. **Methods** Several physiological indexes like the weights per thousand seeds, pure rate, hard rate, content of moisture, and the rate of water absorption were measured. Methods of soaking in hot water, pre-freezing, immersing seed in H₂SO₄, and mechanical abrasion with coarse sand were used in the experiment. And the germination rate of *C. obtusifolia* seeds was determined under different temperature and different concentration of chemistry matter treatment. **Results** The content of moisture in *C. obtusifolia* seeds was 10.43%, the rate of water absorption (untreated) was 45.82%, the rate of water absorption treated by mechanical abrasion and H₂SO₄ were 154.2% and 159.7%, respectively. The rate of water absorption was 99.8% by the treatment of H₂SO₄ within 20 min. The germination rate under the alteration treatment of

①收稿日期: 2010-02-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070080)

作者简介: 张春平 (1982—), 男, 山东潍坊人, 博士, 主要从事植物资源学与植物分子生物学等方面的研究。

Tel: 13667652727 E-mail: chunpingzhang520@163.com

* 通讯作者 何平 Tel: (023) 68254122 E-mail: heping196373@126.com

25 ℃ 14 h/15 ℃ 10 h was 98.7%. The germination rate treated by 200 mg/L GA₃ and 200 mg/L PEG were 100% and 98.9%, respectively. NAA and 6-BA with higher concentration have the effect of restraint to the germination of *C. obtusifolia*. **Conclusion** Seed coat is the limiting factor of germination. The seed hardness could be broken by H₂SO₄(98%), GA₃(200 mg/L) and PEG (200 mg/L) could improve the germination rate of the seeds in short time (1 d) obviously. The most appropriate temperature for the seed germination of *C. obtusifolia* is 25 ℃ 14 h/15 ℃ 10 h

Key words: *Cassia obtusifolia* L.; seed hardness; water absorption rate; germination rate

决明子为豆科植物决明 *Cassia obtusifolia* L. 或小决明 *C. tora* L. 的干燥成熟种子,具有祛风散热,清肝明目,润肠通便等功效^[1],其主要成分为蒽醌类衍生物,具有降血压、调血脂、保肝和调节免疫等疗效^[2-5]。早在《神农本草经》中就有“久服能益精光,轻身”的记载。目前国内外对决明子的研究多集中在化学成分及药理作用等方面^[6],而有关决明子萌发生理方面的研究则少见报道。决明子属硬实性种子,透水性能差,导致种子出现发芽不整齐等现象。在借鉴紫苏子萌发特性的研究^[7]和金荞麦种遗传多样性分析和研究^[8]的基础上,本研究主要探索决明子硬实的破除方法和发芽条件,以期决明子的育种和农业栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料:供试的决明种子由中国医学科学院药用植物研究所提供,经西南大学生命科学学院何平教授鉴定确定为决明 *Cassia obtusifolia* L. 的干燥成熟种子。

1.2 方法

1.2.1 种子外部形态的测定:选取饱满的决明种子100粒,分别测量每粒种子的长和宽,3次重复。

1.2.2 种子净度的测定:随机称取100 g种子,将杂质和净种子分离,然后称量净种子的质量,计算种子净度,3次重复。

1.2.3 种子的硬实率:随机选取净种子100粒,置于培养皿中,25 ℃蒸馏水浸种24 h,然后统计未吸胀的种子,计算种子硬实率,3次重复。

1.2.4 种子的千粒质量:千粒质量是用来表明种子饱满程度的重要指标,在农业生产上也是播种量的重要依据,供试的决明子采集后在通风阴凉处风干,进行净度分析后,将纯净的决明种子用四分法分成4份,从每份中取250粒,1 000粒为一组,3次重复,用电子天平称量后计算平均值^[9]。

1.2.5 种子含水量测定:先将100粒风干的决明子进行称质量,然后放入(100±2) ℃烘箱内烘12 h,取出后在干燥器内冷却至室温后称质量,按下式计

算含水量。

$$\text{含水量} = (W_2 - W_3) / (W_2 - W_1) \times 100\%$$

W₁ 为最后一次恒重时称量瓶的质量, W₂ 为未进行烘干前称量瓶加种子的质量, W₃ 为烘干后称量瓶加种子的质量^[10]

1.2.6 种子吸水率的测定:称取3份决明子,每份5 g,一份不经任何处理,一份用浓H₂SO₄浸泡酸蚀30 min,另一份用石英砂打磨表面,直至种子表面失去光泽为止。置于加有蒸馏水的小烧杯中25 ℃吸胀,分别于2、4、8、12、24、36、48 h取出种子,用滤纸吸干种子表面水分,称定质量,3次重复,计算吸水率[吸水率=(浸种后质量-浸种前质量)/浸种前质量×100%]。

1.2.7 种子硬实的处理

(1)对照(CK)处理:将50粒种子放于铺有双层滤纸的培养皿中,加蒸馏水置于25 ℃的恒温培养箱内进行萌发实验,重复3次,每天定时统计发芽率,截至第5天。

(2)浓H₂SO₄处理:用98%的浓H₂SO₄分别浸泡种子5、10、15、20、30 min,不断搅拌,取出后用自来水冲洗干净,然后用蒸馏水冲洗,按对照中的方法进行萌发实验。

(3)热水处理:将种子用80 ℃热水浸泡30 min后,按(1)中的方法进行萌发实验。

(4)冷冻处理:将种子分别放于-85 ℃和-20 ℃下进行冷冻处理,24 h后取出种子,用蒸馏水冲洗数次,按(1)中的方法进行萌发实验。

(5)研磨处理:将种子放于盛有石英砂的研钵中进行研磨,直到种子表面失去光泽为止。然后按(1)中的方法进行萌发实验。

1.2.8 萌发条件的确定:根据种子硬实处理的实验结果,将种子经98%浓H₂SO₄预先处理20 min,先打破种子硬实,再进行萌发条件的确定实验。每个培养皿50粒种子,重复3次,每天定时统计发芽率,截至第3天。

发芽温度:将处理后的种子置于变温(25 ℃ 14 h/15 ℃ 10 h)和恒温(15、20、25、30 ℃)的培养

箱中进行发芽。

分别用不同质量浓度的 GA_3 、6-BA、NAA 和 PEG 处理种子: 将种子浸泡在不同浓度的溶液中各 30 min, 然后用蒸馏水洗净, 进行发芽实验(表 1)。

表 1 不同化学物质的处理

Table 1 Treatment with different chemistry substances

化学物质	质量浓度/($mg \cdot L^{-1}$)	处理时间/min
GA_3	50、100、200、400	30
6-BA	10、25、50、100	30
NAA	10、50、100、200	30
PEG	50、100、200、400	30

2 结果与分析

2.1 种子形态特征、净度、千粒质量、硬实率和含水量: 经过外部形态观察, 决明种子略呈菱形, 两端平行倾斜, 种皮呈绿棕色, 平滑有光泽。种子长(5.19 ± 0.87) mm, 种子宽(2.34 ± 0.19) mm, 净度(99.27 ± 1.72)%, 千粒质量(22.85 ± 0.83) g、硬实率(92.47 ± 1.65)%、含水量(10.43 ± 0.24)%。

2.2 种子的吸水特性: 通过图 1 可以看出, 不同处理对决明种子的吸水特性具有明显的影响, 48 h 内未经处理的 CK 组种子吸水率最高仅为 45.82%, 而经过研磨处理和浓硫酸处理的种子最高吸水率分别高达 154.23%、159.76%。其中经过研磨处理的种子在 2~24 h 内吸水速率最快, 24 h 后吸水趋于平稳, 经过浓硫酸处理的种子也是在 2~24 h 吸水速度最快, 24 h 后趋于平稳, 研磨处理和浓硫酸处理后的吸水率差异不大, 但是经过浓硫酸处理的种子吸水速率最高, 为未经处理的 3.5 倍。由此可见, 种皮是限制决明种子吸水的机械障碍, 而浓硫酸处理则可以破除这种障碍。

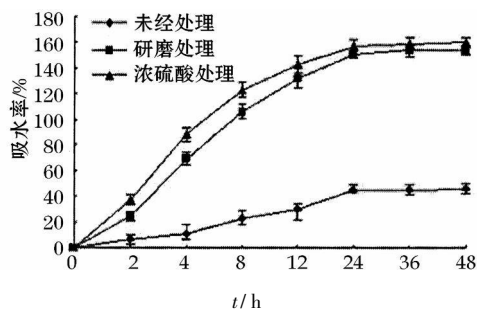


图 1 决明种子吸水率曲线

Fig 1 Water absorption rate curve of *C. obtusifolia* seeds

2.3 浓硫酸处理对种子发芽率的影响: 由图 2 可知, 在第 5 天时, 各处理的种子发芽率都达到最高, 其中经过 20 min 处理的种子发芽率最高, 可以达到 99.8%, 而未经处理的种子发芽率仅为 26.3%, 其次为经过 15 min 处理的种子, 为 94.5%, 经过浓硫

酸处理 30 min 的种子发芽率为 91.2%, 最低的为处理 5 min 的种子, 为 62.5%。经过 30 min 处理后的种子发芽率低于 20 min 和 15 min 的处理, 可能是因为浸泡时间过长, 浓硫酸对种子造成了部分伤害, 从而导致发芽率的降低。并且在第 1 天浓硫酸处理 20 min 的种子发芽率就已经达到 84.7%, 明显高于其他处理组。这说明浓硫酸处理对破除决明种子硬实、提高种子发芽率具有良好的效果, 可以作为破除硬实的参考方法。

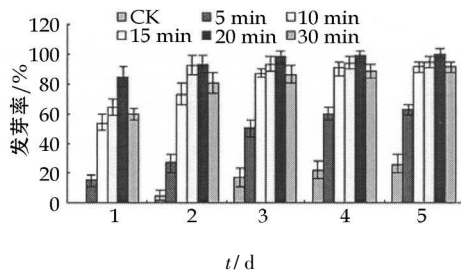


图 2 不同时间浓硫酸处理的种子发芽率

Fig 2 Germination rate of seeds treated by H_2SO_4 in different times

2.4 研磨、冷冻和热水处理对种子发芽率的影响: 由图 3 可知, 各处理后的种子都在第 5 天发芽率达到最大值, 最高的为研磨处理后的种子, 发芽率为 97.5%, 其次为 80 °C 热水处理的种子, 为 95.7%, -20 °C 处理的种子发芽率次之, 为 94.3%, -85 °C 处理后的种子发芽率为 90.6%。最低的为对照组, 为 26.3%, 并且对照组明显低于其他处理组。在以上处理中, 研磨后的种子发芽率高于其他处理组, 但是与经过 20 min 浓硫酸处理后的种子发芽率相比 (99.8%), 其发芽率则略低。图 2 中显示, 20 min 处理后的种子在第 1 天和第 2 天发芽率就达 84.7% 和 93.3%, 而研磨处理后的种子仅为 60.2% 和 85.5% (图 3)。这说明浓硫酸处理后的种子能在更短的时间内迅速整齐地发芽, 并且考虑到研磨处理不易掌握时间和程度, 而浓硫酸只要掌握好时间 (20 min) 即可, 并且便于操作, 所以浓硫酸处理应该是较为方便的方法。

2.5 不同温度下的种子发芽率: 由图 4 可以看出, 5 d 内各温度下的种子发芽率都呈增长趋势, 并且都在第 5 天达到最大值, 发芽率最高的为变温组 (25 °C、14 h/15 °C、10 h), 为 98.7%, 其次为 25 °C 和 20 °C, 分别为 95.5% 和 91.8%, 最低的为 15 °C, 为 82.6%。15 °C 下在第 1 天和第 2 天时, 其发芽率为 0, 这可能是因为温度过低, 限制了种子体内正常的生理代谢, 使得种子无法正常快速发芽, 种子从第 3

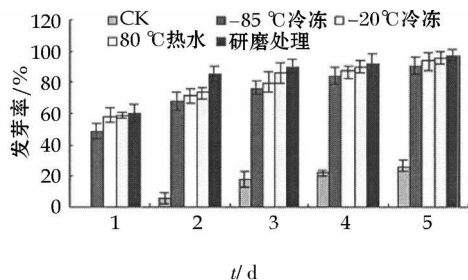


图 3 不同预处理后的种子发芽率

Fig 3 Germination rate with different pre treatments

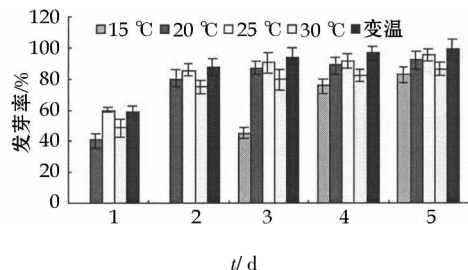


图 4 不同温度下的种子发芽率

Fig 4 Germination rate under different temperatures

天开始发芽,并且均低于其他温度下的发芽率。30 °C下发芽率为 86.3%,低于变温组和 25 °C组。由此可以说明变温(25 °C 14 h / 15 °C 10 h)是种子发芽较为适宜的温度条件。

2.6 GA₃、6-BA、NAA、PEG 处理后的种子发芽率:由图 5 可以看出,不同质量浓度 GA₃ 处理后的种子的发芽率与对照组比都有不同程度的提高,都在第 3 天达到最大值,其中经过 200 mg/L GA₃ 处理过的种子发芽率最高,为 100%,其次是 100、50 mg/L,最低的是对照,为 85.2%。400 mg/L GA₃ 处理后的发芽率为 91.4%,低于其他处理,这可能是因为高质量浓度的 GA₃ 抑制了发芽。在第 1 天,200 mg/L GA₃ 处理后的发芽率就达到 92.4%,远远高于其他质量浓度的处理。这说明了 200 mg/L GA₃ 可以在最短的时间内较为整齐地发芽,因此此质量浓度可作为适宜的发芽处理。由图 6 可以看出较高质量浓度的 6-BA 对种子的发芽不仅没有促进作用反而有较强的抑制作用,50 mg/L (50.3%) 和 100 mg/L (46.7%) 处理下的发芽率都低于对照组 (85.2%)。但是低质量浓度 (10 mg/L) 的 6-BA 则有促进作用,发芽率为 94.5%。图 7 所显示的为 NAA 处理后的种子发芽规律与 6-BA 处理有相似之处,也是高质量浓度抑制发芽,而低质量浓度则能促进发芽。100、200 mg/L 下的发芽率为 49.5%、48.7%,均低于对照组。而 10 mg/L 下的发芽率为 95.6%。图 8 可以看出,经过各质量浓度 PEG 处理

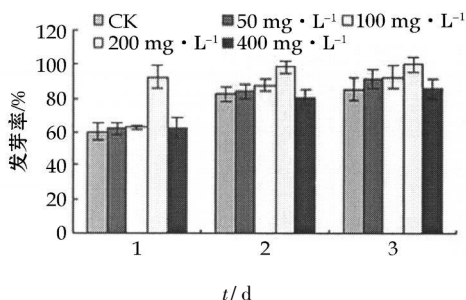


图 5 GA₃ 处理后的种子发芽率

Fig 5 Germination rate with different concentration of GA₃

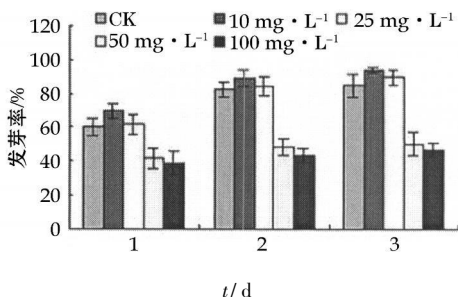


图 6 6-BA 处理后的种子发芽率

Fig 6 Germination rate with different concentration of 6-BA

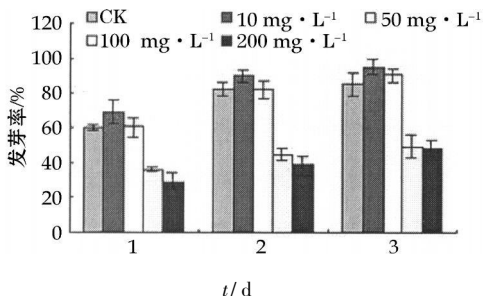


图 7 NAA 处理后的种子发芽率

Fig 7 Germination rate with different concentration of NAA

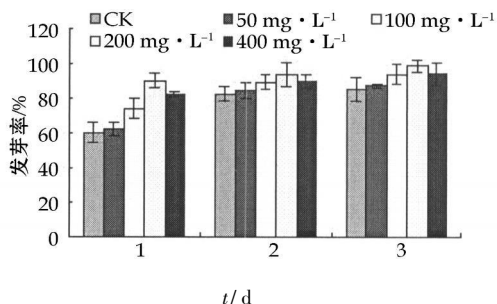


图 8 PEG 处理后的种子发芽率

Fig 8 Germination rate with different concentration of PEG

度为 200 mg/L 时发芽率最高,为 98.9%。

由上述各种处理可以看出,经过 200 mg/mL GA₃ 处理后发芽率最高 (100%),其次是 200 mg/L

PEG 处理, 为 98.9%, 最后是 10 mg/L 6-BA (94.5%) 和 NAA (95.6%)。GA₃ 处理和 PEG 引发都具有发芽时间短并且发芽整齐的特点^[11], 是较为适宜的处理方法。

3 讨论

3.1 决明种子的硬实性: 由于种皮坚硬而很难进行吸胀萌发的种子称为硬实性种子, 不同植物的种皮细胞层次和排列、色素种类和量以及不透明物质(角质层、蜡质、胶质和半纤维层) 沉积等不同, 因而硬实程度不同^[13-14]。而且由于多数硬实性种子的种皮非常坚韧, 往往限制水分的渗入和气体的交换, 阻碍氧气的进入和二氧化碳的排出, 从而抑制呼吸, 不能保证萌发所需的能量, 从而对种胚存在机械束缚作用^[13-14]。有关报道显示, 硬实数量由植物遗传基因控制, 与种子本身成熟度有关, 并且受生态环境影响^[15-16]。从种子的吸水曲线可以看出, 决明种子属典型的硬实性种子, 未经任何处理的种子透水性差, 吸水率仅为 45.82%, 这严重地影响了决明种子的吸胀萌发, 所以破除硬实对种子的萌发非常有必要。种子的硬实率为 92.47%, 但是经过各种处理后, 可达 99.8%, 这说明了限制种子发芽的原因不是生理上因素, 而是种皮结构阻碍了水分和气体的交换, 这与毛柄小勾儿茶、银杏和秤锤树等植物的种子相似^[17-19]。

3.2 各种处理对种子硬实的破除: 对于硬实性种子, 一般采用的方法主要有物理、化学和生物学的方法。物理学方法主要是对种子进行研磨, 化学方法主要用浓硫酸进行酸蚀。在本实验中采用了酸蚀、研磨、冷冻和热水处理等多种方法, 旨在破除种子的硬实, 提高发芽率, 缩短萌发时间。通过对多种方法的比较, 研磨处理轻重程度难以掌握, 容易对种子造成破损, 引起腐烂。用 98% 浓硫酸处理则具有较好的效果, 种子发芽整齐, 发芽率高。

3.3 不同温度对种子萌发率的影响: 实验结果显示不同温度下, 种子的萌发状况有所不同。经过浓硫酸处理后的种子在变温条件下(25℃、14 h/15℃、10 h) 萌发率最高。而在其他温度下均低于变温组合。这说明种子在萌发过程中需要不同时段温度搭配才能更好地促进萌发, 并且在实际生产中, 要采用浓硫酸处理与适当温度相结合的方法。

3.4 不同化学物质处理对种子萌发率的影响: 实验中采用了不同质量浓度的 GA₃、6-BA、NAA、PEG 处理决明种子, 通过实验得出了各种化学物质提高种子萌发率的适宜浓度。其中高质量浓度的 6-BA 和

NAA 不仅对种子没有促进作用, 反而很大程度上抑制了种子的萌发。适宜质量浓度的 GA₃ 和 PEG 都对种子萌发有显著的提高作用。正常情况未经任何处理的种子第 1 天的发芽率为 0, 即便是第 5 天的发芽率也仅为 26.3%, 整齐发芽需要的时间为 10 d 左右, 严重地影响了实际生产, 这就需要找到缩短发芽时间, 并且能整齐发芽的方法。GA₃ 和 PEG 能在最短的时间内迅速整齐地发芽, 其第 1 天的发芽率就分别达到 92.4% 和 90.6%, 远远高于其他质量浓度的处理, 这说明 GA₃ 和 PEG 与其他化学物质相比更适用于处理决明种子。而且只用浓硫酸处理的种子第 1 天的发芽率仅为 84.7%, 也低于 GA₃ 和 PEG 处理后的结果。考虑到决明子种植的实际情况, 应该先用浓硫酸处理种子, 然后再选用 200 mg/L GA₃ 或 PEG 进行处理, 两种处理相互结合, 有利于大幅度缩短出苗时间, 提高出苗的整齐度。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 李续娥, 郭宝江, 曾志. 决明子蛋白质、低聚糖及萜萜苷降压作用的实验研究[J]. 中草药, 2003, 34(9): 842-843
- [3] Hase K, Kadota S, Basnet P, et al. Hepatoprotective effects of traditional medicines: Isolation of active constituents from seeds of *Celosia argentea* [J]. *Phytother Res*, 1996, 10(5): 387-392
- [4] 刘淑敏, 孙超, 谢伟华. 决明子提取物对高血脂模型小鼠聚脂基因表达的影响[J]. 中草药, 2009, 40(4): 583-587
- [5] 郝延军, 桑育黎, 赵余庆. 决明子的研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(9): 858-859
- [6] 郝严军, 桑育黎, 赵余庆. 决明子萜萜类化学成分研究[J]. 中草药, 2003, 34(1): 18-19
- [7] 张春平, 何平, 何俊星, 等. 不同处理对药用紫苏种子萌发特性的影响[J]. 中草药, 2010, 41(8): 1361-1365
- [8] 张春平, 何平, 何俊星, 等. ISSR 分子标记对金荞麦 8 个野生居群的遗传多样性分析[J]. 中草药, 2010, 41(9): 1519-1521
- [9] 刘丽, 郭巧生, 王云鹏, 等. 药用鼠尾草种子萌发特性的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(19): 1587
- [10] 李娜, 邵爱娟, 袁媛, 等. 不同产地牛膝种子生活力及形态的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(9): 1002
- [11] 何家庆, 王兴, 姚晴晴. 聚乙二醇对望江南种子萌发的影响[J]. 中草药, 2009, 40(9): 1466-1469
- [12] 颜启传. 种子学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001
- [13] 杨期和, 尹小娟, 叶万辉. 硬实性种子休眠的机制和解除方法[J]. 植物学通报, 2006, 23(1): 108-118
- [14] 郝建平, 徐笑飞, 杨东方, 等. 北柴胡快速繁殖及种子萌发条件研究[J]. 中草药, 2008, 39(5): 752-756
- [15] 徐本美, 白原生, 梁飞凤, 等. 兰花棘豆硬实种子的活力研究[J]. 种子, 1996, 15(2): 50-51
- [16] 彭幼芬. 世界林木种子生理概况和趋势[J]. 世界林业研究, 1998, 17(2): 8-12
- [17] 党海山, 张燕君, 江明喜, 等. 濒危植物毛柄小勾儿茶种子休眠与萌发生理的初步研究[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(4): 327
- [18] 郑光华, 史忠礼, 赵同芳. 实用种子生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1990
- [19] 徐本美, 冯桂强, 史华. 从秤锤树种子的萌发论酸蚀处理效应[J]. 种子, 1999, 5: 45