

水分胁迫对猴耳环种子萌发及生理特性的影响

刘欣¹, 潘超美^{1*}, 柳跃¹, 肖斌¹, 李露华¹, 邹国光², 范光孝²

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广州莱泰制药有限公司, 广东 广州 510990

摘要: **目的** 通过对猴耳环种子萌发进行人工水分胁迫处理, 探讨其对种子萌发过程中生理生化指标的影响。**方法** 分别采用 5%、10%、15%、20% 聚乙二醇 6000 (PEG) 处理猴耳环种子, 测定种子的发芽率、平均发芽速度、发芽指数及萌发过程中细胞膜透性、脯氨酸量、可溶性蛋白量、丙二醛 (MDA) 量、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 活性的动态变化。**结果** 随着 PEG 胁迫强度的增加, 种子萌发受到明显抑制, 发芽率、发芽指数显著降低, 提高了平均发芽速度; 萌发期间各生理指标均高于对照, 细胞膜透性、脯氨酸、MDA 量呈上升趋势, 可溶性蛋白量呈下降趋势, SOD、POD 活性均不同程度地表现为先上升后下降的趋势。**结论** 猴耳环在轻度水分胁迫时, 具有一定的耐旱性。

关键词: 猴耳环; 聚乙二醇 6000; 种子萌发; 生理特性; 超氧化物歧化酶; 过氧化物酶

中图分类号: R282.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)02-0255-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.02.019

Effects of water stress on seed germination of *Pithecellobium clypearia* and physiological characteristics

LIU Xin¹, PAN Chao-mei¹, LIU Yue¹, XIAO Bin¹, LI Lu-hua¹, ZOU Guo-guang², FAN Guang-xiao²

1. College of Pharmacy, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Guangzhou Lifetech Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 510990, China

Abstract: **Objective** By the treatment of artificial water stress on seed germination of *Pithecellobium clypearia* to explore the physiological characteristics during seed germination. **Methods** The seeds of *P. clypearia* were treated with 5%, 10%, 15% and 20% PEG 6000, then the seed germination rate, mean germination speed, germination index, cell permeability, proline (Pro), soluble protein, content of malondialdehyde (MDA), and activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) were measured. **Results** With the increase of PEG stress intensity, the germination rate and germination index were decreased, and the mean germination speed was increased. The cell permeability, Pro, and MDA showed increasing trends, while soluble protein showed decreasing trend. The activities of SOD and POD presented rising tendency then followed by decreasing. **Conclusion** Under the light water stress, *P. clypearia* has ability to resist drought stress.

Key words: *Pithecellobium clypearia* Benth.; PEG 6000; seed germination; physiological characteristics; superoxide dismutase; peroxidase

猴耳环 *Pithecellobium clypearia* Benth. 为豆科含羞草亚科猴耳环属木本植物, 以嫩枝叶入药, 味微苦涩, 性微寒, 具有清热解毒、凉血消肿、止泻的功效^[1], 是治疗多种热毒症独特的南药。民间外用于烧伤、烫伤、疮痍疔肿治疗^[2]。现代临床主要用于治疗上呼吸道感染、急性胃肠炎、急性咽喉炎、急性扁桃体炎, 亦可用于细菌性痢疾。

我国的猴耳环商品药材主要来源于野生资源, 近年来, 随着毁林开荒活动的增加, 猴耳环生境受

到严重破坏; 加上原料药材的短缺而过度采挖, 造成猴耳环野生药材蕴藏量急剧下降, 不能满足市场的需求。猴耳环种子是典型的顽拗型种子, 其寿命很短, 必须随采随播, 否则随着种子自身水分的减少, 生活力迅速丧失。本实验采用聚乙二醇 6000 (PEG) 模拟水分胁迫的环境, 初次探讨水分缺失条件下猴耳环种子萌发过程中的生理变化及其萌发特性, 为猴耳环种质资源的保存和优质种苗的繁育奠定基础。

收稿日期: 2013-07-15

作者简介: 刘欣 (1988—), 女, 硕士研究生。E-mail: leafluxin@163.com

*通信作者 潘超美 (1956—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为药用植物种质资源评价与可持续利用。E-mail: tcmbotany@126.com

1 材料

猴耳环 *Pithecellobium clypearia* Benth. 种子于2012年采自广东省从化市流溪河林场内30年以上的野生植株,于冰箱4℃保存;选择成熟饱满,大小一致的种子作为实验材料。

2 方法

2.1 实验设计和处理

选用PEG模拟水分胁迫方法,分别配制质量分数为5%、10%、15%、20% PEG溶液,相对应的水势分别为-0.08、-0.22、-0.43、-0.66 MPa,4个胁迫梯度记作I、II、III、IV。将新鲜的猴耳环种子,先用0.1%百菌清溶液消毒30 min,再用无菌水冲洗干净,均匀置于浸湿了不同质量分数PEG溶液的纱布中,设蒸馏水为对照(CK),30℃光照培养箱中培养,光照时间8 h/d,光照强度3 000~3 300 lx(此培养条件为前期种子萌发实验的最佳方案)。每天滴数滴溶液,保持纱布湿润,每3天更换1次纱布,以防止水势变动。

2.2 种子萌发指标的测定

观察记录每天种子发芽情况,以胚根长度突破种皮2 mm作为发芽标准。当3个重复中有1个种子发芽的时间,记为该种子发芽的起始期,并随时检出霉烂种子;当连续3 d没有种子发芽时,记为发芽的结束期。计算种子发芽率、平均发芽速度、发芽指数。

发芽率为正常发芽数占供试种子数的百分比;平均发芽速度 $=\sum(D \times n)/\sum n$, D 为从种子置床起算的天数,本实验以置床之日为0; n 为相应各天的发芽粒数。发芽指数 $(G_t)=\sum(G_t/D_t)$, G_t 为时间日的发芽数, D_t 为相应的发芽日数。

2.3 种子萌发过程中相关生理指标的测定

以置床之日为0计,第15天为发芽末次计数时间及取样时间。每隔3天测定子叶的细胞膜透性、脯氨酸(Pro)量、可溶性蛋白量、丙二醛(MDA)量、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性。

采用电导仪测定法测定细胞膜透性^[3];采用茚三酮显色法测定Pro量^[4];采用考马斯亮蓝G-250法测定可溶性蛋白质量^[5];采用TBA法进行测定MDA量^[3];采用氮蓝四唑(NBT)显色法测定SOD活性^[5];采用愈创木酚法测定POD活性^[5]。

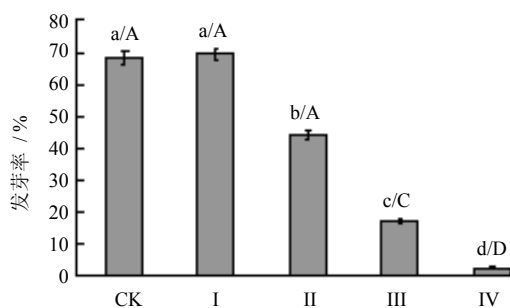
采用Microsoft Excel 2003软件对数据进行处理和绘图,采用SPSS 17.0统计分析软件对数据进行差异显著性检验(LSD法)。

3 结果与分析

3.1 水分胁迫对猴耳环种子萌发指标的影响

根据观察记录,除了IV组,其他处理组的种子在萌发试验的第2天均开始裂开。对照组(蒸馏水)种子在实验的第3天所有重复均开始萌发,I组2个重复在第4天有种子萌发,II组1个重复有种子萌发,而III组第7天才开始有种子开始萌发,直到萌发实验结束,IV组只有2颗种子萌发。

由图1、2可知,随着PEG质量分数的增加,猴耳环种子发芽率和发芽指数呈下降趋势,平均发芽速度呈上升趋势(平均发芽速度是衡量种子发芽快慢的一个指标,速度的数值小,表示种子发芽速度快,发芽能力较好)。I组的发芽率和平均发芽速度与对照组相比无显著性差异,发芽率还略高一些;说明适度的PEG质量分数是可以提高种子发芽率。PEG质量分数越高,水分胁迫程度越重,发芽率和发芽指数的下降幅度越大,对种子萌发指标的抑制程度显著增大($P<0.05$ 、 0.01)。



小写字母表示0.05差异水平,大写字母表示0.01差异水平,下同
Lowercase letters mean significant difference at level of 0.05 and uppercase letters indicate very significant differences at level of 0.01; same as follow

图1 水分胁迫对猴耳环种子发芽率的影响

Fig. 1 Effect of water stress on seed germination rate of *P. clypearia*

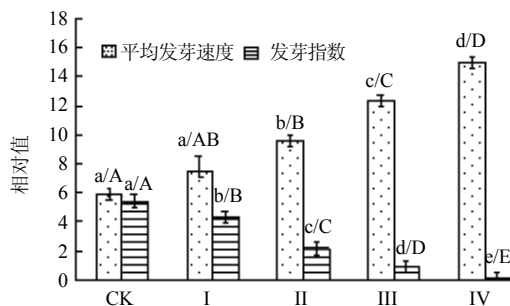


图2 水分胁迫对猴耳环种子平均发芽速度和发芽指数的影响

Fig. 2 Effect of water stress on mean germination speed and germination index of *P. clypearia*

3.2 水分胁迫对种子萌发细胞膜透性的影响

由图3可知,随着培养天数的增加,各处理组的膜透性呈递增的趋势,第6天到第9天的增幅是最大的;经PEG处理的4组膜透性均比对照组的高。PEG浓度越高,相对膜透性越大,伤害程度就越深;其中I、II和III 3组的变化范围相对集中,胁迫程度相当;IV组的胁迫程度最高,伤害度达73.9%。

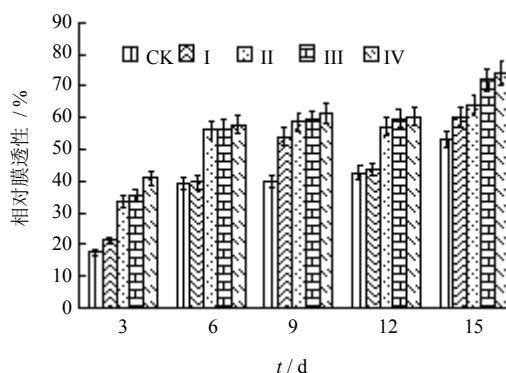


图3 水分胁迫对猴耳环细胞膜透性的影响

Fig. 3 Effect of water stress on cell permeability of *P. clypearia*

3.3 水分胁迫对种子萌发 Pro 的影响

Pro 量的增减在一定程度上反映植物受到水分胁迫的情况以及对水分胁迫的忍耐和抵抗能力。如图4所示,经PEG处理的4组Pro量在萌发过程中均高于对照组;尤其是在第9天II组Pro累积明显高于对照及其他处理组,是对照组的4.22倍;在第12天时对照、I和II 3组处于下降趋势了,而III和IV组仍然持续升高,分别比对照组增加了2.15倍和2.18倍。

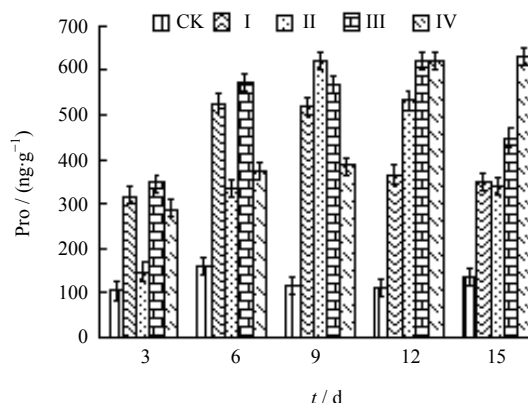


图4 水分胁迫对猴耳环 Pro 量的影响

Fig. 4 Effect of water stress on content of Pro in *P. clypearia*

3.4 水分胁迫对种子萌发可溶性蛋白的影响

植物体内的可溶性蛋白质大部分是参与各种代谢的酶类,其量的高低是了解植物体内总代谢的一个重要指标^[6]。由图5表明,种子萌发过程中,随萌发天数的增加,可溶性蛋白量总体表现为下降的趋势;对照组最低值在第9天为34.92 μg/g,II组在第12天出现最低值41.49 μg/g,其他3组最低值均在第15天。经胁迫处理的各组可溶性蛋白量均高于对照,但各胁迫处理并未随着浓度的加强而呈正积累,只IV组可溶性蛋白累积明显高于其他组,II组明显低于其他处理组。

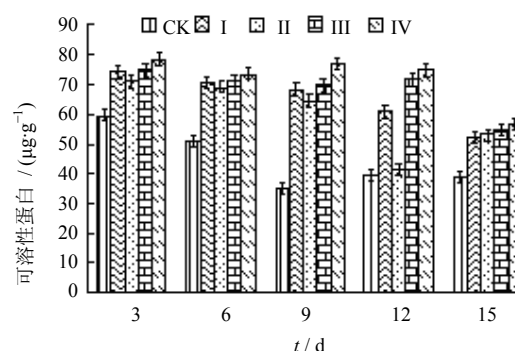


图5 水分胁迫对猴耳环可溶性蛋白量的影响

Fig. 5 Effect of water stress on soluble protein content of *P. clypearia*

3.5 水分胁迫对种子萌发 MDA 量的影响

植物在逆境条件下,会发生膜的过氧化作用^[7]。MDA量高低可以表示脂质过氧化程度和膜系统伤害程度。由图6可知,水分胁迫促进了猴耳环种子萌发过程MDA量的积累,经胁迫处理的4组MDA量均高于对照组;IV组MDA量明显高于其他组,胁迫程度最深,伤害度最大,最高时是对照

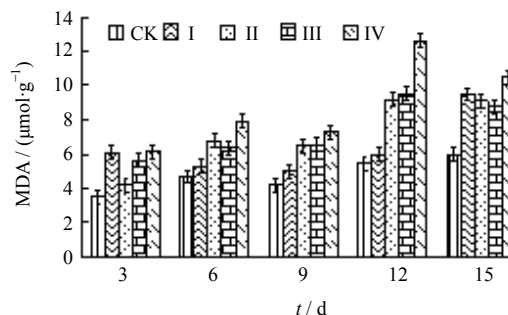


图6 水分胁迫对猴耳环 MDA 量的影响

Fig. 6 Effect of water stress on MDA content of *P. clypearia*

组的 3.59 倍。但在第 3 天和第 15 天时 I 组的量高于 II、III 组, 在第 6 天时 II 组的量高于 I、III 组。结果表明轻度胁迫时, 膜系统伤害度与 PEG 处理质量分数没有呈正比的关系。

3.6 水分胁迫对种子萌发 SOD 活性的影响

SOD 的活性与植物抗性密切相关^[5]。由图 7 可知, 经 PEG 胁迫处理的各组 SOD 活性显著高于对照组; 种子萌发期间, 对照组的 SOD 活性比较稳定, 轻度胁迫 (I、II、III) 是先上升再下降的趋势, 而中度胁迫 (IV) 随着萌发天数的增加呈下降的趋势。结果表明, 轻度胁迫时植物体内 SOD 活性能够在一定时间内维持较高水平, 避免活性氧的大量积累, 减轻了活性氧引起的膜伤害; 随着时间的延长或胁迫浓度的增加, SOD 活性就会受到抑制。通过比对 MDA 量的变化趋势图, 发现与前人研究结果是一致的, 即 MDA 对 SOD 活性有不可逆的抑制作用^[8]。当胁迫程度加重, MDA 量不断积累, 当 MDA 量超过细胞的调节能力时, 就会导致 SOD 活性的降低, 因此, 轻度胁迫处理后期和中度胁迫随 MDA 量的急剧增加, SOD 活性呈下降趋势。

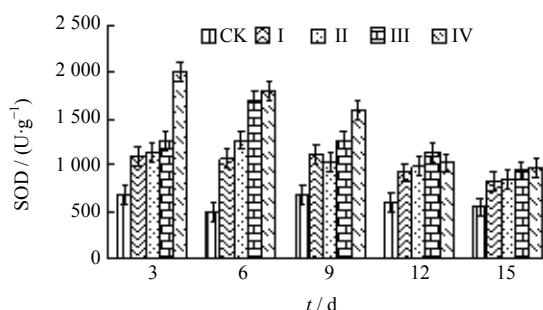


图 7 水分胁迫对猴耳环 SOD 活性的影响

Fig. 7 Effect of water stress on SOD activity of *P. clypearia*

3.7 水分胁迫对种子萌发 POD 活性的影响

POD 活性变化趋势与 SOD 活性变化趋势大体相同, 由图 8 可知, 经 PEG 胁迫处理的各组 POD 活性明显高于对照组; 种子萌发过程中, 对照组及轻度胁迫的 POD 活性变化为 2 次先升再降的趋势, 而中度胁迫随着萌发天数的增加呈下降的趋势。POD 活性变化趋势在一定程度上表明猴耳环种子在轻度水分胁迫条件下, 胁迫前期机体内活性氧清除系统的功能维持在一定的水平, 减轻了活性氧的伤害, POD 活性上升; 随着胁迫程度的加深, 超过了对活性氧的清除的范围值, 保护酶活性就会下降, 植物可能受到活性氧损害; 这与甘草叶片抗旱性研

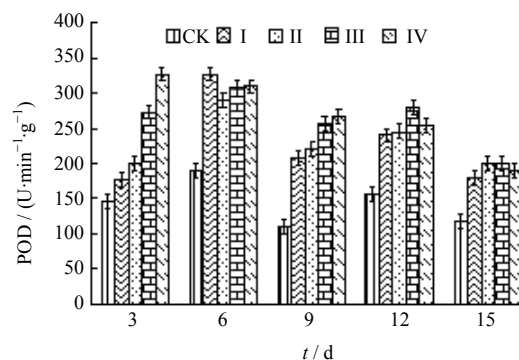


图 8 水分胁迫对猴耳环 POD 活性的影响

Fig. 8 Effect of water stress on POD activity of *P. clypearia*

究结果^[9]基本是一致的。

4 讨论

本实验结果表明, 只有 I 组的发芽率比对照组增加了 1.33%, 可见适度质量分数的 PEG 胁迫能刺激猴耳环种子活性的提高, 提高发芽率。当猴耳环种子随着水分胁迫程度增加 (PEG 质量分数 $\geq 10\%$), 种子发芽率、发芽指数均呈下降趋势, 平均发芽速度呈上升趋势, 相对胁迫率逐渐增大, 对种子的萌发有抑制作用。说明此时超过了猴耳环种子萌发过程的渗透调节承受限度, 因而对种子萌发及生长均造成伤害。

此外, 水分胁迫引起猴耳环种子在萌发期间的一系列生理变化。水分胁迫时植物体内积累各种物质, 能提高细胞液浓度, 使渗透势下降, 植物就可以从外界吸水维持膨压, 使生理过程正常进行^[10]。本实验结果表明, 水分胁迫均促进了猴耳环种子萌发过程中相对电导率、Pro、可溶性蛋白及 MDA 的积累, 均高于对照。但没有随着 PEG 质量分数的增加而呈正比累积, IV 组的相对电导率、可溶性蛋白及 MDA 量均高于其他处理组, Pro 量的最高值也是出现在 IV 组; 而轻度胁迫的 3 组之间胁迫范围相对集中。说明在一定水分胁迫条件下, 为了维持猴耳环种子的正常萌发, 积累更多的渗透调节物质, 以维持正常的生理代谢, 从而提高了猴耳环的抗旱适应性。但随着胁迫强度增加, 打破了生理代谢平衡, 各生理指标亦出现变化。

当水分胁迫在植物体耐受范围之内, 便会激活体内包括抗氧化酶在内的一系列保护机制的启动^[11], 从而引起机体内抗氧化活动的增强, 加速活性氧自由基的清除, 减低对种子萌发过程中的伤害度; 它包括 SOD、POD、过氧化氢酶 (CAT) 等。本实验表明, 水分胁迫下猴耳环种子萌发过程中 SOD、POD 活性明显增加, 均高于对照。说明在适度胁迫范围

内, 自由基的增加激活了 SOD 和 POD 活性, 从而增强了清除自由基的能力, 降低因自由基过多而引起膜脂过氧化作用造成的膜损伤^[12]。但随着萌发天数的增加, IV 组的 POD 和 SOD 活性呈下降的趋势, 而其他 3 组变化趋势为先升再降的波动; 说明胁迫的程度加强, 超出上述能力范围, 保护酶的活性就会降低。

参考文献

- [1] 陈元胜, 叶永才. 广东省中药材标准 [M]. 广州: 广东科学技术出版社, 2004.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- [3] 王晶英, 敖红, 张杰, 等. 植物生理生化实验技术与原理 [M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2003.
- [4] 张宪政. 作物生理研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1992.
- [5] 郑炳松. 现代植物生理生化研究技术 [M]. 北京: 气象出版社, 2006.
- [6] 韩多红, 晋玲, 张勇. NaCl 胁迫对膜莢黄芪种子萌发和幼苗生理特性的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2045-2049.
- [7] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2002.
- [8] 伍泽堂, 张刚元. 脱落酸、细胞分裂素和丙二醛对超氧化物歧化酶活性的影响 [J]. 植物生理学通讯, 1990, 24(4): 30-32.
- [9] 唐晓敏, 王文全, 马春英. 长期水分胁迫下甘草叶片的抗旱生理响应 [J]. 河北农业大学报, 2008, 31(2): 16-20.
- [10] Tang Z C. The plant reaction and adaptability under water stress [J]. *Plant Physiol Commun*, 1983(4): 1-7.
- [11] 刘杰. 聚乙二醇处理对羊草种子萌发及活性氧代谢的影响 [J]. 草业科学, 2002, 11(1): 59-64.
- [12] 石贵玉, 廖文雪, 秦丽凤, 等. PEG 模拟水分胁迫对香椿种子萌发的生理生化指标影响 [J]. 福建林业科技, 2009, 36(4): 142-145.