

4种检测柠条种子活力技术的比较分析

李加国¹ 李松林² 韩梅³ 汪晓峰¹

(1 北京林业大学林木育种国家工程实验室 2 内蒙古赤峰市左旗十三敖包镇农牧业技术服务中心

3 内蒙古鄂尔多斯市林业治沙科学研究所)

摘要: 种子保存是当前植物种质资源保存的最有效、最安全的方式之一,快速、微量、准确检测种子库中种子活力的变化是当前植物种质设施保存技术研究的热点与重点。本文利用谷胱甘肽氧化还原电位($E_{\text{GSSG/2GSH}}$)、差示扫描量热分析(DSC)、电子自旋共振(EPR)和非损伤微检测(NMT)4种目前较为先进的方法,研究柠条种子在人工老化下的活力变化规律。结果表明,柠条种子在50℃、相对湿度(RH)为50%的老化条件下,其活力指数的下降速率要快于发芽率的下降速率;通过建立回归模型发现,在检测发芽率变化方面4种检测方法的优越性依次为EPR>NMT>DSC> $E_{\text{GSSG/2GSH}}$;在检测活力指数变化方面4种检测方法的优越性依次为NMT> $E_{\text{GSSG/2GSH}}$ =EPR>DSC。综合对检测柠条种子发芽率和活力指数拟合度情况,以及对种子非损伤的性质,认为NMT最适合用来跟踪监测贮藏种子的活力。

关键词: 柠条; 谷胱甘肽氧化还原电位; 玻璃态; 分子流动性; 非损伤微测

中图分类号: S722.1⁺6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2015)01-0015-07

LI Jia-guo¹; LI Song-lin²; HAN Mei³; WANG Xiao-feng¹. **Comparative analysis of four techniques for evaluating seed viability of *Caragana korshinskii* Kom.** *Journal of Beijing Forestry University* (2015) 37(1) 15-21 [Ch, 20 ref.]

1 National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing, 100083 P. R. China;

2 Agricultural Technology Service Center of Chi-feng Zuoqi Thirteen Aobao Town, Inner Mongolia, 024000 P. R. China;

3 Ordos Research Institute of Forestry Sand Control, Ordos, Inner Mongolia, 017000 P. R. China.

Seed preservation is one of the most effective and safest ways to retain sources of plant germplasm. How to check changes in seed viability rapidly and accurately at a micro-scale is a major issue in research facilities for preserving plant germplasm. With the GSH redox potential ($E_{\text{GSSG/2GSH}}$), differential scanning calorimetry analysis (DSC), electron spin resonance (EPR) and a non-invasive micro-test (NMT), we studied the variation in the pattern of seed viability for *Caragana korshinskii* under artificial aging. The results revealed that the seed vigor index decreased more quickly than the germination percentage under the aging conditions of 50℃ and RH of 50%. From regression modeling we found that the precedence of four advanced technologies was EPR>NMT>DSC> $E_{\text{GSSG/2GSH}}$ in terms of the rate of germination. Based on the vigor index, the precedence was NMT> $E_{\text{GSSG/2GSH}}$ =EPR>DSC. NMT is most suitable for detecting seed vigor while integrating the fitness of seed germination and vigor index, as well as considering that these technologies are non-invasive to seeds.

Key words *Caragana korshinskii*; glutathione half-cell redox potential; glassy state; molecular motion; non-invasive micro-test

收稿日期: 2014-01-02 修回日期: 2014-04-23

基金项目: “948”国家林业局引进项目(2011-4-54)、林业公益性行业科研专项(201104024)。

第一作者: 李加国。主要研究方向: 种子生物学。Email: lijiaquo2011@sina.com 地址: 100083 北京市清华东路35号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者: 汪晓峰 教授。主要研究方向: 种子生物学。Email: wxf801@sina.com 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.jbfu.edu.cn/>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

近年来由于人们对自然资源的过度消耗及气候环境的改变,导致物种不断流失,所以种质资源的保存和收集已成为世界性的行动。种子保存是当前植物种质资源保存最有效和最安全的方式之一。但种子成熟以后,便会进入衰老、死亡的阶段,其活力会逐渐下降^[1-2]。为了保持种子活力,通过低温保存技术建立种子库是一项有效可行的措施。虽然低温种子库可以延长种子的寿命,但种子的呼吸代谢并没有完全停止,其活力仍在下降,特别是濒危植物种子的库存量非常有限,如何监测低温库中种子活力的变化,以判断是否需要更换种质材料,一直是种子工作者们关注的重点问题。

传统的种子活力检测方法,如电导率的测定、发芽速度测定、TTC法、ATP含量测定和酶活性的测定等,具有工作量大、耗时长以及样品消耗多等缺点,给种子检验工作带来很多不利。寻找能快速、微量、准确检测种子活力的新技术是急需解决的问题。为此,美国国家种子库、英国皇家植物园千年种子库和中国农业科学研究院种质资源库等机构的科学工作者对种子保存过程中的玻璃态、分子运动速率、氧化胁迫、呼吸作用等方面的变化进行了系列研究^[3-7],发现种子的耐贮性与其细胞内的玻璃态转变温度(Glass-to-liquid transition temperature, T_g)密切相关,当种子处在玻璃态状态时,细胞内分子流动性降低,劣变反应速率降低,种子活力得以保持^[3]。采用电子自旋顺磁共振(Electron paramagnetic resonance(EPR) spectroscopy)等技术测定细胞内分子运动,可以从力学和热力学角度研究温度和含水量与种质老化速率的关系。有研究表明,香蒲(Typhaceae)花粉最佳贮藏含水量与分子流动性最低时的含水量相一致,但是分子运动速率最低时的贮藏温度却低于 T_g ,因而将分子流动性最低时的温度和含水量作为最佳贮藏条件^[4]。张明等^[5]利用DSC和EPR技术检测了家榆(*Ulmus pumila*)、玉米(*Zea mays*)和红花(*Carthamus tinctorius*)种子的胞内分子运动状况和玻璃态转变温度,发现当种子处在玻璃态时,分子流动性降低。还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)对种子细胞内氧化还原平衡状态起着重要作用,Kranner等^[6]对13种种子的研究发现, $E_{GSSG/2GSH}$ 能反映种子细胞活力状态,当种子发芽率下降50%时候, $E_{GSSG/2GSH}$ 上升20 mV。Xin等^[7]利用非损伤微测(Non-invasive micro-test technique, NMT)分析了大豆(*Glycine max*)、小麦(*Triticum aestivum*)、油菜(*Brassica campestris*)老化过程的氧气分子流,发现种子发芽率越高,氧气分子流越大,并且该技术不会对种子造成

损伤。这些技术的先进性在于具有准确、省工、快速和耗费种子少的优点,目前国内鲜有报道。这些技术的准确性、敏感性还缺乏广泛的验证,同时也缺少对比性研究。

人工加速老化是研究种子老化机制的常用方法,不仅可以缩短实验时间,还可以模拟种子在自然情况下的劣变机理^[8-9]。柠条(*Caragana korshinskii*)是我国西部水土保持和固沙造林的重要树种之一,具有耐旱、耐寒、耐高温的特点。本文以柠条种子为研究对象,运用人工加速老化的方法,对比 $E_{GSSG/2GSH}$ 、EPR、DSC、NMT 4种技术在检测种子老化过程中活力变化的准确性、可行性,为种质资源保存提供理论基础和实用技术。

1 材料与方法

1.1 材料

柠条种子由内蒙古鄂尔多斯市林业治沙研究所2011年提供,种子初始含水量为7.8%,初始发芽率为92%,千粒质量为51.4 g,贮存于-20℃冰柜备用。

邻苯二醛(OPT)、N-乙基马来酰亚胺(NEM)、还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)、自旋标记探针CP(3-carboxy-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl)购自Sigma公司,其余药品均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 柠条种子的处理与萌发实验

将柠条种子放在底部为饱和溴化钠盐溶液(RH=50%)的干燥器内,将密封好的干燥器置于50℃老化箱内,定期取样。种子老化过程中发芽率呈现反“S”型曲线下降,选择发芽率下降了0、20%、50%、80%和100%的点进行后续测试。

参考周正立等^[10]的发芽及测定方法。取50粒柠条种子放在底层铺有2层滤纸的玻璃培养皿(90 mm)中,4个重复,加入适量的蒸馏水,每天统计发芽数。萌发10 d后,计算发芽指数、活力指数。

发芽率 = (发芽种子数 / 种子总数) × 100% (1)

发芽指数(GI) = $\sum (G_i / D_i)$ (2)

活力指数(VI) = GI · m (3)

式中: D_i 为发芽日数, G_i 为与 D_i 相对应的每天发芽种子数, m 为发芽结束时幼根的干质量。

1.2.2 柠条种子 $E_{GSSG/2GSH}$ 的测定

参考Seal等^[11]的实验方法,略作修改。液氮研磨柠条种子,将粉末放于装有50 mg PVP的2 mL离

心管中,计算样品质量,每个处理6个重复。然后加入2 mL提取缓冲液(0.1 mol/L HCl, 0.5% Triton X-100),放置于冰上20 min,14 000 r/min 4℃离心15 min。每支离心管中取100 μL上清液分装在2个PCR管中,一个管中加入等体积提取缓冲液用于测定GSH,另一个管中加入等体积0.04 mol/L NEM用于测定GSSG。混匀后在酶标仪下测定。GSH的稀释液为0.1 mol/L Na₂HPO₄-0.005 mol/L EDTA缓冲液(pH8.0),稀释100倍;GSSG的稀释液为0.1 mol/L NaOH,稀释20倍。然后加入1 mg/mL OPT-甲醇溶液,静置30 min后测定荧光强度,酶标仪的激发波长334 nm,发射波长为422 nm,根据标准曲线计算GSH、GSSG含量。 $E_{GSSG/2GSH}$ 的计算公式: $E = E_0 - \frac{RT}{2F} \ln \frac{(GSH)^2}{GSSG}$,式中: T 为热力学温度, R 为气体常数, F 为法拉第常数, $E_0 = -240$ mV。

1.2.3 柠条种子 T_g 的测定

参考张明等^[5]的实验方法。将不同活力的柠条种子使用硅胶干燥48 h(减少水分的影响,保持样品含水量相同),将种胚研磨后,取适量研磨后粉末测量,每个处理6个重复。差示扫描量热仪(DSC 2910)测试参数为:温度扫描范围为0~90℃,升温速率为10℃/min。玻璃态的转变由热流曲线的阶梯状变化确定, T_g 为热流曲线阶梯状变化起始2端温度的中点处所指示的温度。

1.2.4 柠条种子细胞内分子运动速率的测定

参考Buitink等^[3-4]的实验方法,略作修改。柠条种子在蒸馏水中浸泡2 h后除去种皮,然后将种胚浸泡在CP溶液(1 mmol/L) 45 min后加入终浓度为200 mmol/L的K₃Fe(CN)₆,再放置15 min,最后将种胚用蒸馏水分洗净后晾干。取种胚放置于内径为3 mm的石英玻璃管中,然后放在电子顺磁共振波谱仪(Bruker X-band EPR spectrometer E-500)上测量细胞中探针分子CP的分子运动速率,每个处理6个重复。室温检测条件为:中心磁场为3 400 G,扫场宽度为180 G,扫描时间60 s,调制幅度为0.8 G,调制频率为100 kHz,时间常数为0.1 s,微波频率为9.35 Hz,功率为2~20 mW。

弱固定化谱(W)和强固定化谱(S)的比值(W/S)可以反映处于快运动范围和慢运动范围的自旋标记的相对数量(图1),通过 W/S 可以表征探针分子CP在细胞内运动状况的变化。

1.2.5 柠条种子氧气分子流测定

参考Xin等^[7]的方法。将柠条种子放在缓冲液中吸涨3 h,然后转移到测试液中平衡10 min。每个处理检测30粒种子,检测时间为6 min,每个处

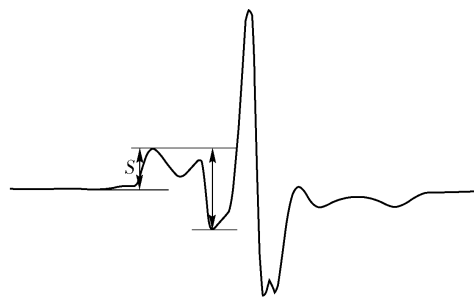


图1 CP标记的柠条种胚的标准EPR图谱

Fig. 1 Standard EPR spectra of seed embryo of *C. korshinskii* axes labeled with CP

理3个重复。利用非损伤微测(NMT-YG-100, Younger USA LLC, Amherst, MA01002, USA)检测柠条胚根中部和子叶的O₂分子流(图2)。测试时先在样品近处测得一个电流(I_1),然后远离样品dx再测得一个电流(I_2),根据换算表计算出O₂分子浓度(C_1, C_2),利用Fick定律计算O₂分子的流速。

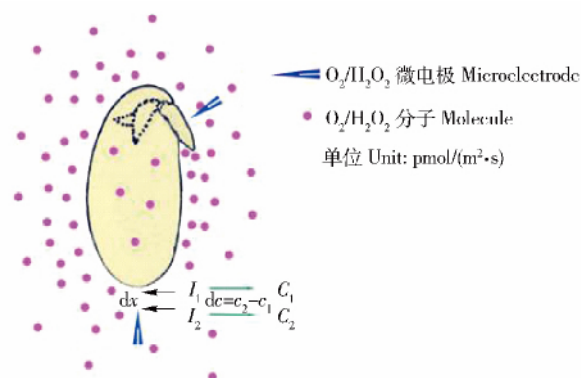


图2 NMT检测柠条种子O₂分子流原理图

Fig. 2 O₂ molecular flow diagram while checking the seed viability of *C. korshinskii* by NMT

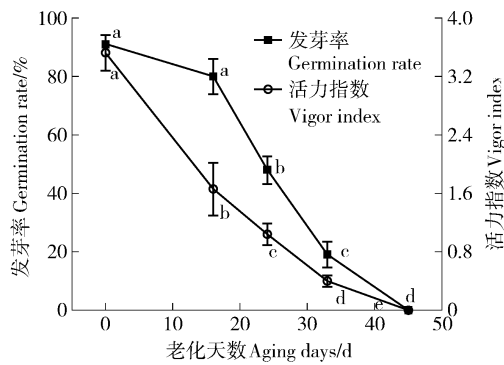
1.3 数据分析

数据分析应用Excel 2007、Spss 16.0、Origin 8.6辅助完成,采用LSD法分析差异显著性($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 人工老化对柠条种子活力的影响

在50℃和50%相对湿度下,柠条种子老化45 d后,发芽率降至零,其发芽率变化呈现典型的反“S”形曲线(图3)。在老化刚开始阶段(0~16 d),发芽率下降缓慢(降低12%),自老化16 d后,发芽率迅速下降,当老化33 d时,种子发芽率由80%下降到19%。柠条种子的活力指数则自开始老化就迅速下降,前16 d由开始的3.52下降到1.66,降低了52.8%。自33 d到种子完全死亡,发芽率与活力指数的下降速度均有所减缓。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。Low-case alphabets in the Figure refers the significant difference ($P < 0.05$), the same convention for all Figures.

图3 不同老化天数下柠条种子的发芽率和活力指数

Fig. 3 Germination and vigor index of *C. korshinskii* seeds at different aging days

2.2 人工老化对柠条种子不同测定指标的影响

2.2.1 人工老化对柠条种子 $E_{GSSG/2GSH}$ 的影响

GSSG/2GSH 是细胞内重要的氧化还原对, 其变化可以反映体内的氧化还原状态。如图4所示, 在前24 d, $E_{GSSG/2GSH}$ 呈现波动性降低。自24 d以后, $E_{GSSG/2GSH}$ 含量不断升高, 当种子发芽率为0时, $E_{GSSG/2GSH}$ 由24 d的 -181.23 mV 升至 -172.13 。

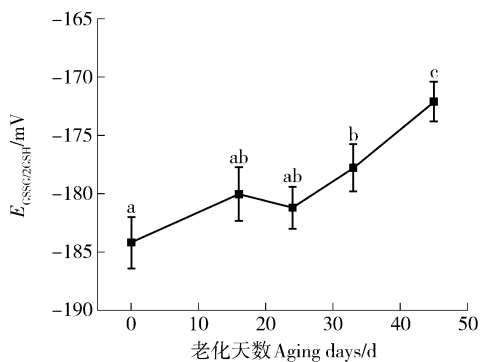


图4 不同老化天数下柠条种子的氧化还原电位的变化

Fig. 4 Changes of $E_{GSSG/2GSH}$ of *C. korshinskii* seeds at different aging days

2.2.2 人工老化对柠条种子 T_g 的影响

植物种子一般都会存在玻璃态状态, 玻璃态可以有效延缓种子的劣变速率。玻璃态转变温度 (T_g) 越高, 玻璃化状态越稳定, 劣变反应就不易发生^[4, 12]。如图5所示, 随着种子老化程度的加深, T_g 整体呈现不断下降趋势。未老化的柠条种子, T_g 为 54.92°C , 在老化前24 d内, T_g 变化较小, 降低了 0.49°C 。当老化到33 d以后, 柠条种子的 T_g 降低幅度增加, 在第33天降低了 3.16°C , 种子活力完全丧失时候(45 d), T_g 降低了 5.48°C 。

2.2.3 人工老化对柠条种子内部分子运动的影响

从EPR图谱发现(图6), 随着老化时间加长,

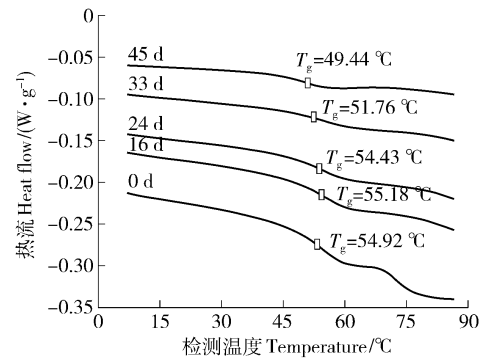


图5 不同老化天数下柠条种子的 DSC 谱图和 T_g 的变化

Fig. 5 Change of T_g and its DSC spectra of *C. korshinskii* seeds at different aging days

柠条种子内部处于快运动范围内的自旋标记的相对数量逐渐增加, 处于慢运动范围内的自旋标记的相对数量逐渐减少。当老化时间较短时(0~16 d), 柠条种胚的EPR波谱的主要成分为强固定化谱, 弱固定化谱非常小, 其W/S值为0.18, 即处于慢运动范围内的自旋标记的相对数量较多。随着种子老化程度的加深, 柠条种胚的EPR波谱的弱固定化谱越来越强, 第45天的时候, W/S值为0.87, 处于慢运动范围内的自旋标记的相对数量比未老化种子增加了32%。

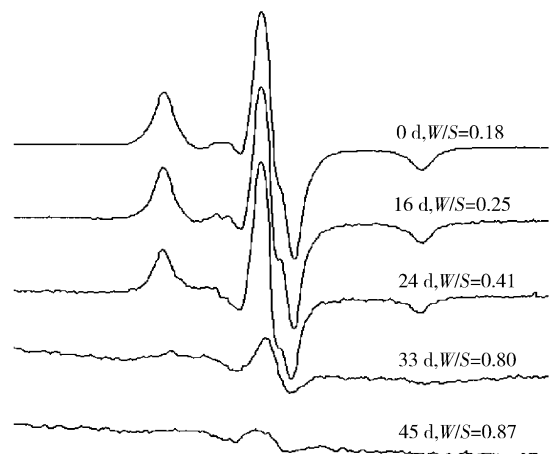


图6 不同老化天数下柠条种子的EPR谱图和W/S值

Fig. 6 W/S value and its EPR spectra of *C. korshinskii* seeds at different aging days

2.2.4 人工老化对柠条种子氧气消耗量的影响

细胞内氧气含量的变化反映着种子代谢强度。图7表明, 柠条种子胚根中部和子叶的 O_2 分子流变化规律一致, 但是胚根中部的 O_2 分子流值明显高于子叶。与3种检测方法不同的是, 柠条种子 O_2 分子流在老化前期阶段就迅速降低, 当种子老化到第16天, 胚根中部和子叶的 O_2 分子流分别由 $52.1 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 和 $35.2 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 降低到 $26.1 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 。

($\text{cm}^2 \cdot \text{s}$) 和 $20.1 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$, 降低幅度分别为 51.3% 和 42.9%。随着老化程度加深, 种子的耗氧量迅速降低。在种子发芽率为 0 的时候, 胚根中部和子叶的 O_2 分子流仅为未老化种子的 6.7% 和 4.5%。

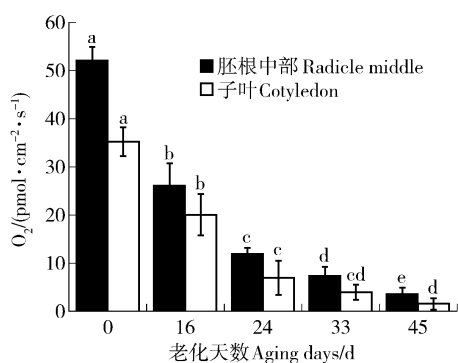
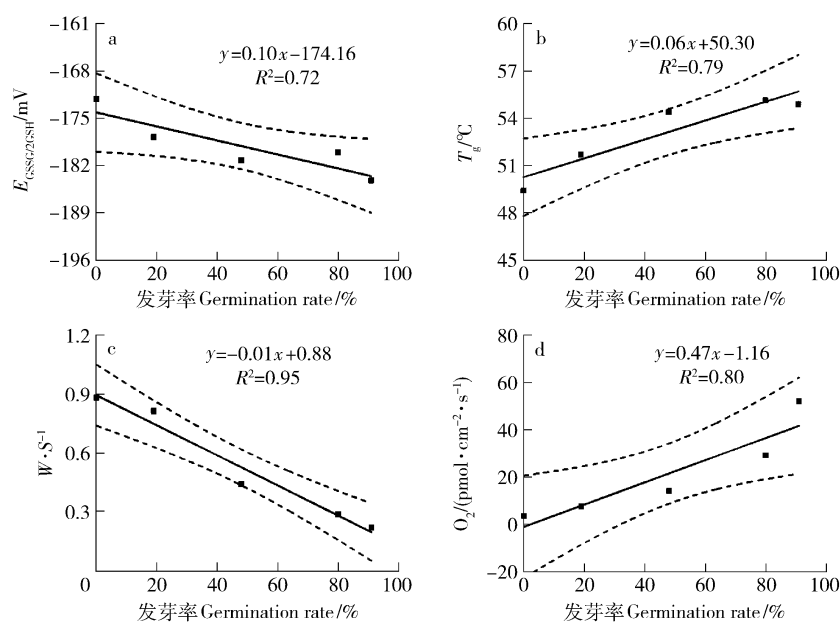


图7 不同老化天数下柠条种子的 O_2 分子流

Fig.7 O_2 influx of *C. akorshinskii* seeds at different days



实线为回归线, 虚线为 95% 置信区间。Solid lines are regression, dotted lines are 95% confidence interval.

图8 柠条种子的发芽率与 $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ 、 T_g 、 W/S 和 O_2 内流的关系

Fig.8 Correlation between germination of *C. korshinskii* seeds and $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$, T_g , W/S and O_2 influx

3 结论与讨论

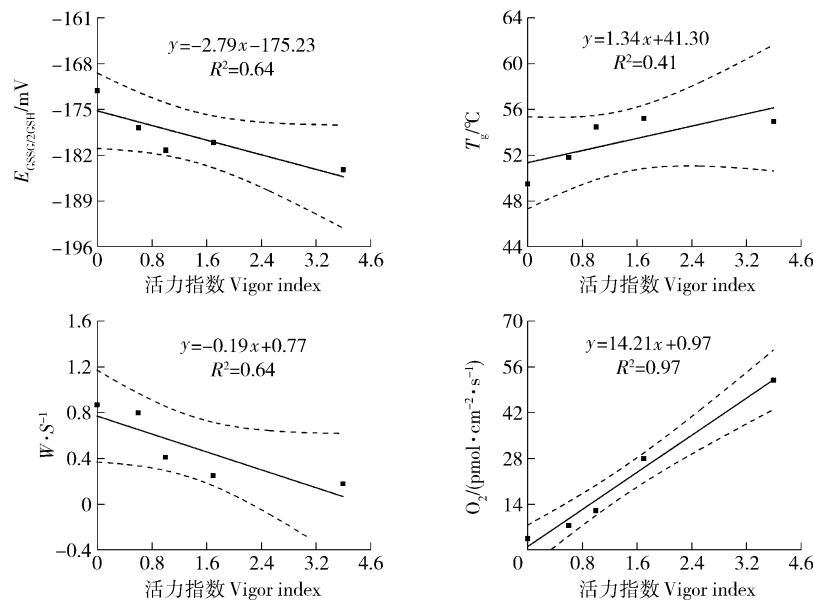
人们在研究种子老化机理的时候通常采用人工加速老化的方法, 虽然这种方法不能完全代表种子处于自然老化下的状态, 但因其能较好的模拟种子劣变过程, 节约实验时间, 所以被广泛使用^[13]。种子的发芽率与活力指数对人工加速老化的敏感性有很大的不同, 当种子发芽率还没有大的变化时, 其活力指数往往已经大幅降低^[14]。本实验结果同样发现活力指数的下降速率要大于发芽率, 与未老化的柠条种子相比, 老化到第 16 天的种子的发芽率仅下降了 12.1%, 而此时其活力指数已经下降了 52.8%

2.3 4 种检测方法与种子活力变化的相关性分析

4 种检测方法的结果分别与柠条种子的发芽率 (图 8) 和活力指数 (图 9) 做线性回归分析。由于 NMT 检测的胚根中部和子叶的变化规律一致, 并且胚根对种子的萌发有至关重要的作用, 所以以胚根中部 O_2 分子流为例进行分析。结果表明 4 种检测方法的指标与柠条种子的发芽率、活力指数均具有显著相关性 ($P < 0.05$), 但其 R^2 数值不同。对发芽率来讲 $R^2(E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}) < R^2(T_g) < R^2(\text{O}_2 \text{ 内流}) < R^2(W/S)$, 即 EPR 预测柠条种子发芽率变化的准确性最高 ($R^2 = 0.95$), NMT 次之 ($R^2 = 0.80$); 对活力指数来讲 $R^2(T_g) < R^2(E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}) = R^2(W/S) < R^2(\text{O}_2 \text{ 内流})$, 即 NMT 预测柠条种子活力指数变化的准确性最高 ($R^2 = 0.97$), EPR 和 $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ 相同 ($R^2 = 0.64$), DSC 最小 ($R^2 = 0.41$)。

(图 3)。Kapoor 等^[9] 研究发现, 水稻 (*Oryza sativa*) 种子在不同的老化条件下, 其活力指数对劣变的敏感性有很大不同; 因此, 在评价种子活力变化的时候, 发芽率与活力指数都是重要的考察指标。

正常型种子在成熟脱水之后, 其细胞质会呈现一种高粘度的玻璃态, 处于玻璃态的细胞质阻止了其中各种组分的运动, 同时也对种子细胞质的劣变反应起到了抑制和延缓的作用^[15]。玻璃态转变温度是用来描述玻璃态向粘流态转变的温度指标, T_g 取决于水分状态、温度和化学结构组成; T_g 越高, 表示其细胞质的玻璃态稳定性越高, 细胞内的蛋白质等大分子空间构象越稳定, 细胞质内分子运动速率



实线为回归线, 虚线为 95% 置信区间。Solid lines are regression, dotted lines are 95% confidence interval.

图 9 柠条种子的活力指数与 $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ 、 T_g 、 W/S 和 O_2 的线性关系

Fig. 9 Linear correlation between vigor index of *C. korshinskii* seeds and $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$, T_g , W/S and O_2 influx

受到束缚越大,从而降低了细胞劣变反应的速率^[1]。本文实验结果也证实了这种现象(图 5、6),在种子老化的前 24 d,其 T_g 较高并且变化不大,当老化至 33 d 后, T_g 降低幅度较大。EPR 的实验结果 (W/S) 与 T_g 相对应,当种子老化后期,细胞内处于快运动范围的自旋标记的数量明显增加。本实验结果与实验室前期在家榆、玉米和红花上的研究结果相一致^[5]。这可能是由于活性氧的作用,使得细胞内化合物分子量降低、组分的结构发生改变,进而导致分子运动速率增加。由于抗氧化系统的作用, T_g 和分子流动性在老化初期变化并不显著;当抗氧化系统失衡后, T_g 不断降低,分子流动性加快,劣变反应强烈;因此, EPR 能较好的反应发芽率的变化。

当前研究认为,活性氧的积累是导致种子发生劣变的重要因素^[2]。植物清除活性氧的系统通常分为酶促(SOD、CAT、APX 等)和非酶促(ASA、GSH 等)两大类,对于种子来说, GSH 是清除活性氧的最主要的非酶促物质。单一的抗氧化剂含量的变化并不能较好的反应外界胁迫环境对种子造成的影响,利用 Nernst 方程计算的 $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ 可以检测种子活力的变化^[6, 11]。虽然柠条种子的 $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ 总体呈上升趋势,但在老化过程的前期(0 ~ 24 d), $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ 变化并不是特别明显(图 4);这与 Seal^[11] 的研究发现相似,可能是这一阶段种子的玻璃态转变温度较高,细胞质粘度较大,限制了相应的生化反应的发生及水分的流动,因而 GSH、GSSG 和 $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ 变化不大。Chaouch 等^[16-17] 研究发现, GSH 被过度氧化为

GSSG 并不是植物细胞死亡的唯一原因。本实验结果也表明,谷胱甘肽氧化还原电位并不能完全反映种子的活力状态。

O_2 在植物光合作用、呼吸作用、交替氧化酶活性等方面起着重要的作用, O_2 的运输与植物对外界胁迫的反应之间的关系引起了广泛的关注。种子在老化过程中,线粒体的结构和功能受到损伤,呼吸作用相关酶的活性下降,通常表现为耗氧量和呼吸作用下降^[18-20]。Xin 等^[7] 发现大豆、小麦、油菜种子在老化过程中,氧气分子流随着发芽率的下降而下降。本实验结果也表明(图 7),柠条种子在老化过程中, O_2 进入柠条种子的流量迅速降低,表明其呼吸作用下降。柠条种子 O_2 分子流的变化规律与其活力指数变化规律非常一致,自老化初期就呈现显著性变化,其 $R^2 = 0.97$,相关性明显高于其他 3 种测试指标。

在本文使用的 4 种技术中,综合发芽率和活力指数,其准确性、可靠性排序为: NMT > EPR > $E_{\text{GSSG}/2\text{GSH}}$ > DSC, 并且 NMT 属于非损伤性技术,用来检测的种子在实验结束后依然可以正常萌发。

参 考 文 献

- [1] WALTERS C, BALLESTEROS D, VERTUCCIV A. Structural mechanics of seed deterioration: standing the test of time [J]. Plant Sci, 2010, 179(6): 565-573.
- [2] McDONALD M B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment [J]. Seed Sci Technol, 1999, 27(1): 177-237.
- [3] BUITINK J, LEPRINCE O, HEMMINGA M A, et al. Molecular mobility in the cytoplasm: an approach to describe and predict

- lifespan of dry germplasm [J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97 (5): 2385–2390.
- [4] BUITINK J, CLAESSENS M A E, HEMMINGA M A, et al. Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seeds and pollen [J]. Plant Physiol, 1998, 118: 531–541.
- [5] 张明, 卓加金, 刘雪萍, 等. 种子贮藏含水量与胞内分子流动性及可溶性糖组分的关系 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(2): 478–485.
- ZANG M, ZHUO J J, LIU X P, et al. Relationship between biotermodynamics characteristic and soluble sugars components in storage of ultradried seeds [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(2): 478–485.
- [6] KRANNER I, BIRTIC S, ANDERSON K M, et al. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death [J]. Free Radical Bio Med, 2006, 40(12): 2155–2165.
- [7] XIN X, WAN Y L, WANG W J, et al. A real-time, non-invasive, micro-optrode technique for detecting seed viability by using oxygen influx [J]. Scientific Reports, 2013, 3: 3057.
- [8] SCHWEMBER A R, BRADFORD K J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions [J]. J Exp Bot, 2010, 61(15): 4423–4436.
- [9] KAPOOR N, ARYA A, SIDDIQUI M A, et al. Physiological and biochemical changes during seed deterioration in aged seeds of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Am J Plant Physiol, 2011, 6(1): 28–35.
- [10] 周正立, 王琳, 于军, 等. 锦鸡儿属两种植物种子萌发生理研究 [J]. 西北植物学报, 2013, 31(12): 2509–2515.
- ZHOU Z L, WANG L, YU J, et al. Seed germination physiology of two species of *Caragana* Fabr. [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2013, 31(12): 2509–2515.
- [11] SEAL C E, ZAMMIT R, SCOTT P, et al. Glutathione half-cell reduction potential as a seed viability marker of the potential oilseed crop *Vernonia galamensis* [J]. Ind Crop Prod, 2010, 32(1): 687–691.
- [12] WILLIAMS R J, LEPOPOLD A C. Glassy state in corn embryos [J]. Plant Physiol, 1989, 89(3): 977–981.
- [13] FREITAS R A, DIAS D C F S, OLIVEIRA A, et al. Physiological and biochemical changes in naturally and artificially aged cotton seeds [J]. Seed Sci Technol, 2006, 34(2): 253–264.
- [14] COPELAND L O, MCDONALD M B. Seed vigor and vigor testing [M]. New York: Springer, 2001: 165–191.
- [15] WILLIAMS R J, LEPOPOLD A C. Glassy state in corn embryos [J]. Plant Physiol, 1989, 89(3): 977–981.
- [16] CHAOUCH S, NOCTOR G. Myo-inositol abolishes salicylic acid-dependent cell death and pathogen defence responses triggered by peroxisomal hydrogen peroxide [J]. New Phytol, 2010, 188(3): 711–718.
- [17] CHAOUCH S, NOCTOR G, VANDERAUWER S, et al. Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by ISOCHORISMATE SYNTHASE1 in a daylength-related manner [J]. Plant Physiol, 2010, 153(4): 1692–1705.
- [18] CHATURVEDI P, TAGUCHI M, BURRS S L, et al. Emerging technologies for non-invasive quantification of physiological oxygen transport in plants [J]. Planta, 2013, 238(3): 599–614.
- [19] AMABLE R A, OBENDORF R L. Soybean seed respiration during simulated preharvest deterioration [J]. J Exp Bot, 1986, 37(9): 1364–1375.
- [20] CHOJNOWSKI M, CORBINEAU F, COME D. Physiological and biochemical changes induced in sunflower seeds by osmopriming and subsequent drying, storage and aging [J]. Seed Sci Res, 1997, 7(4): 323–332.

(责任编辑 赵 勃
责任编辑 蒋湘宁)