

20℃下3种蔬菜种子长年贮存后生理特性和遗传稳定性的研究

孟淑春, 张海英, 刘庞沅, 孔祥辉

(国家蔬菜系统工程技术研究中心, 北京 100089)

摘要:对在低温和常温下贮藏13年的萝卜、番茄和芹菜3种蔬菜超干种子的发芽势、发芽率、苗长、胚根根尖细胞染色体畸变率和随机扩增的多态性DNA(RAPD)等指标进行测定分析,并研究了种子活力、生活力及其遗传稳定性的变化。多年超干贮存后,部分处理染色体异常的百分率有所增加,它与发芽率成反比,但发芽率低的种子在繁殖更新后,异常率会降低,较高的染色体异常率不会遗传下去。

关键词: 蔬菜种子; 超干贮存; 染色体畸变; 随机扩增的多态性DNA(RAPD); 遗传稳定性

中图分类号: S601 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)04-0026-05

Studies on the Physiological Characteristics and Genetic Integrities of Long-stored Vegetable Seeds at 20℃

MENG Shu-chun, ZHANG Hai-ying, LIU Pang-yuan, KONG Xiang-hui

(National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing 100089, China)

Abstract: Physiological observations, detections and measures were conducted of energy and percentage of germination, seedling length, frequency of abnormal chromosome and RAPD on vegetable seeds of 3 species in order to assess seed vigor, viability, and genetic integrity under long term's and normal atmospheric temperature storage. The facts that these vegetable seed not only have more aging tolerance at normal temperature after ultra-drying treatment, but also hold its stability of genetic integrity, and seed vigor and viability remain well prove means that ultra-dry storage is a simple, practicable and effective method for vegetable seeds.

Key words: Vegetable seed; Ultra-dry storage; Chromosome aberration; RAPD; Genetic integrity

目前国内外保存种质资源的手段大多是利用自然或人工方法控制种子水分(MC)和贮藏温度以延缓种子的衰老,然后适时进行繁殖再生。低温低湿被公认为贮存正常型种子及延长种子寿命最为有效的方法,兴建具有降温降湿性能的种质贮藏库为遗传资源的收集保存提供了有效的技术手段和重要的设备保证。但低温低湿种质资源库造价高、能耗大,长年累月的维持费用对资源库是项沉重的经济负担。探求低能耗多年保存种质资源的方法甚为必要。本试验以发芽势和苗长表示种子活力,以发芽率表示种子生活力,采用根尖细胞染色体畸变率和

RAPD图谱分析作为评价种子生理特性和遗传稳定性的方法,以0℃贮藏的种子作为对照(ck),检测比较1987年开始经13年超干贮存后的3种蔬菜种子生活力、活力和遗传变异的结果,旨在经济贮存蔬菜种质资源新方法的开发积累资料、摸索经验。

1 材料和方法

1.1 材料

萝卜品种:美浓;番茄品种:强力米寿;芹菜品种:实梗。

以上种子为一般生产用的商品种子,来自北京

收稿日期:2003-05-07

基金项目:北京市科学技术委员会市级重点实验室(951890200);北京市科技新星计划(954812800)项目资助

作者简介:孟淑春(1973-),女,助理研究员,学士,主要从事蔬菜种质资源保存与评价研究工作。

市种子公司、北京市生产资料公司和北京市蔬菜研究中心开发部。

1.2 低水分干燥处理

种子的水分调控: 把商品种子经过低温低湿干燥箱(20℃, 相对湿度 20%) 干燥后取一小部分作为对照, 贮存在 0℃的低温箱中, 其余种子与硅胶以 1: 4 的比例(种子与新烘干冷却的硅胶的质量比) 混合于玻璃干燥器中进行吸附干燥, 经过一定天数后, 测定含水量低于常规贮存的含水量后, 取出 1/3 种子, 将其密封于两个镀锌铁皮制成的种子盒内。一个贮存在 0℃中, 作为 ED1 简称 E1, 另一个贮存于 20℃中, 作为硅干 1(简称硅 1) 处理, 其余 2/3 的种子, 经过不断更换硅胶继续干燥, 当其含水量低于 E1、硅 1 的 0.2% 左右后取约 1/2 的种子封装入两个种子盒中作为 E2 和硅 2, 剩余的种子再继续干燥, 当含水量比 E2、硅 2 低约 0.2% 后封装于两个种子盒中作为 E3 和硅 3。

1.3 超干贮存

对照, E1、E2 和 E3 种子贮存在 0℃低温冰箱内, 硅 1、硅 2 和硅 3 处理贮存在 20℃恒温箱中, 从 1998 年开始每年从其中取出部分种子进行 1 次种子生活力和活力等项目的测定分析, 直到 2000 年。本文仅报道 2000 年测定的结果。

1.4 试验方法

1.4.1 种子回湿 种子从种子盒中取出一定的数量后, 按需要数出规定的粒数, 数好后每一重复种子装入一个牛皮纸袋中, 袋口敞开, 置于室温和室内相对湿度条件下回湿 1 d, 再转入隔板下放有自来水的玻璃干燥器中(其中相对湿度接近于饱和), 按种子大小和种类的不同继续回湿 2~ 5 d。据报道, 经过超干燥处理后的种子含水量低, 在萌发前将各处理种子回湿 2 d, 使它们的含水量提高以避免直接萌发而导致的吸胀损伤^[1]。

1.4.2 种子浸出液电导度的测定 在玻璃干燥器中回湿的种子达到回湿时间以后, 将种子取出, 放在用尼龙纱做成的洗涤滤网上, 用去离子水冲洗数次, 以去掉种子表面附着的尘埃, 然后用干净的滤纸吸去种子表面附着的水分, 再将种子放入较粗的指形管(小粒种子) 或小烧杯(大粒种子) 等加有一定量去离子水的玻璃容器中, 如有种子飘浮在水面上, 则设法使其下沉, 在室温下浸泡 24 h 后用 DDS- 11A 型电导仪测定种子浸出液的电导度。

1.4.3 种子生活力和活力的测定 种子含水量、发

芽势和发芽率的测定参考国际种子检验规程的规定^[2]。采用我们自行设计的“斜面玻璃板法”进行萌发试验, 其原理与国外的卷纸活力测定法和国内的直立玻璃板发芽器相类似, 每块玻璃板上铺一张湿滤纸并在其上摆放一个重复的待萌发的种子, 然后喷水、覆盖上硫酸纸并放置于底部盛有自来水的保湿容器中在恒温箱内萌发, 每天进行 1 次通风换气。萌发时每个重复取种子 50 粒, 重复 4 次, 按规定测定发芽势并且测量萌发种子胚根至胚芽或至子叶的幼苗长度, 以所测量到的幼苗长度或种子的活力指数作为评价种子活力的指标, 苗长测量完后将试验材料继续萌发到规定的日数统计发芽率。供试种子萌发温度及相关测定时间如表 1 所示。

表 1 种子萌发测定的温度及时间

种 类	萝卜	番茄	芹菜
萌发温度(℃)	20	25	20
量苗长(d)	3	4	10
发芽势(d)	3	5	10
发芽率(d)	7	14	21

注: 苗长是指种子幼根顶端至子叶最高处的长度, 未萌发种子苗长作为零, 以平均 mm 数表示

1.4.4 染色体畸变率的观察

(1) 前处理。取供试蔬菜种子 5~ 6 粒放入培养皿中(培养皿内铺放滤纸), 加蒸馏水浸泡后在室温下过夜, 次日倒去蒸馏水, 将培养皿放进恒温培养箱中, 置于(25±1)℃条件下萌发。

(2) 取材。待根尖长到 1 cm 左右时, 用刀片将其切下立即放入卡诺固定液(乙醇: 冰醋酸= 3: 1) 中固定 1~ 2 d, 然后换至 70% 的乙醇中, 置于冰箱中待观察。

(3) 染色体观察。取出待观察根尖用 1% 醋酸洋红染色、压片、显微镜下观察、计数并照相。最后, 各项数据用平均值表示。

1.4.5 3 种蔬菜种子多年超干贮存后的 RAPD 分析

DNA 提取: 参照 Murray 和 Thomspon^[3] 的 CTAB 法提取 DNA, 最后将 DNA 浓度稀释为 25 ng/μL 作为工作液; DNA 扩增反应: 总反应体系为 25 μL, 包括 Tris-HCl (pH 8.0) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 2.0 mmol/L, 4 种核苷酸各为 100 μmol/L, 15 ng 引物, 50 ng 模板 DNA, 1.0 单位的 Taq DNA 聚合酶。反应程序参考许勇^[4]等 PCR 反应程序: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 37℃退火 30 s、72℃延伸 1 min, 循环 35 周; 最后 72℃延伸 7 min。PCR 仪为美国 PE 公司生产的 PE- 480 扩增仪, 引物与 dNTP 购

自上海生工公司, Taq DNA 聚合酶购自北京泰克金公司; 电泳检测: 反应产物在含 0.5 μg/mL EB 的 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳分离, 紫外灯下观察照相。

2 结果与分析

2.1 种子发芽率和种子活力的变化

自 1987 年开始贮存供试种子, 至 2000 年测定 20℃和 0℃温度下贮存 13 年后种子浸出液的电导度、种子的发芽势、幼苗长度和种子发芽率等有关种子质量的指标, 结果列入表 2。

从表 2 的结果中可见, 0℃贮存时, 2.1%~

5.4% 的萝卜种子含水量都较适宜于种子生活力的保持, 但对照的苗长与处理间有显著差异。在 20℃的常温下, 种子初始贮存含水量 2.2%~3.6% 的处理中, 以 2.2% 初始含水量对种子质量的保存较为有利, 表现出具有较高的发芽率和发芽势。与一般传统贮存方法只能贮存 4~5 年的结果^[5] 相比较, 超干贮存的方法能使种子在 20℃温度下贮存 13 年后仍有 90% 以上发芽率, 它说明此方法具有较好的贮存效果, 虽然稍逊于 0℃贮存的对照, 但它的贮存费用要明显低于 0℃贮存的方法, 因而萝卜种子可以利用超干方法来进行多年贮存。

表 2 种子超干贮存 13 年后发芽率和活力的比较

蔬菜种类	处 理	贮初含水量(%)	电导度(μs/ cm)	发芽势(%)	发芽率(%)	苗 长(mm)
萝 卜	0℃ ck	5.4	9.00×10 ³	91.0 a	95.0 a	21.21 a
	0℃ E1	3.6	9.40×10 ³	87.5 a	96.0 a	18.07 b
	0℃ E2	2.2	8.60×10 ³	89.0 a	97.0 a	19.14 b
	0℃ E3	2.1	7.10×10 ³	90.5 a	98.5 a	18.46 b
	20℃ 硅 1	3.6	10.5×10 ³	71.5 b	90.5 a	7.52 c
	20℃ 硅 2	2.2	10.9×10 ³	84.5 a	92.5 a	9.05 c
	20℃ 硅 3	2.1	7.10×10 ³	57.5 c	86.5 b	4.99 d
番 茄	0℃ ck	6.2	1.67×10 ²	93.0 a	93.5 a	25.90 a
	0℃ E1	4.6	1.60×10 ²	95.5 a	97.5 a	23.00 a
	0℃ E2	2.4	1.61×10 ²	91.5 a	93.5 a	13.40 c
	0℃ E3	1.9	1.31×10 ²	90.0 a	95.5 a	20.70 b
	20℃ 硅 1	4.6	1.20×10 ²	94.0 a	96.5 a	15.70 c
	20℃ 硅 2	2.4	1.10×10 ²	94.5 a	97.0 a	10.00 d
	20℃ 硅 3	1.9	1.40×10 ²	58.5 b	94.0 a	3.30 e
芹 菜	0℃ ck	6.6	2.80×10 ²	37.0 c	56.5 b	11.20 b
	0℃ E1	4.6	6.70×10 ²	50.5 a	68.5 a	15.53 a
	0℃ E2	2.6	5.30×10 ²	44.5 b	60.0 b	13.66 a
	20℃ 硅 1	4.6	6.00×10 ²	8.5 d	14.0 d	1.53 c
	20℃ 硅 2	2.6	7.00×10 ²	9.5 d	23.0 c	1.98 c

注: 采用 Duncan's 新复极差 (SSR) 检验法进行检验, 检验水准为 0.05

强力米寿番茄种子长期超干贮存的结果表明, 除了硅 3 处理的发芽势下降较多外, 其他所有处理的发芽势和发芽率均与对照处于同一水平上, 相互之间无显著差异。在 20℃温度下经过 13 年贮存的硅 1 和硅 2 处理的发芽率均能保持在 96% 以上, 但硅 1 处理的苗长显著优于硅 2, 同时在 0℃温度下贮存的 E1 处理的苗长也显著大于 E2, 这可能是硅 1 和 E1 的贮存含水量(4.6%) 与其他处理相比更有利于番茄种子活力的保持, 本项研究的结果充分表明番茄种子适宜于超干贮存, 而且效果极佳。

芹菜种子贮初含水量为 4.6% 和 2.6% 的处理 E1 和 E2 在 0℃条件下超干贮存 13 年后, 它们的发芽势、苗长和发芽率都高于对照处理, 而相同含水量的硅 1 和硅 2 处理在 20℃下超干贮存的效果却远

远低于对照处理, 表明芹菜种子在低温条件下贮存对含水量较为敏感, 在常温条件下的超干处理效果并不理想, 需要继续研究其适用的方法。

种子浸出液的电导度测定在本项试验中未发现规律性的差异。

2.2 多年超干贮存后萌发的蔬菜种子胚根根尖细胞染色体畸变情况

不同处理种子胚根根尖细胞染色体经过观察计数, 多年超干 20℃常温贮存后的萝卜、番茄和芹菜等种子染色体的异常畸变率比在 0℃低温下贮存种子的畸变数量要多, 但经统计分析, 番茄种子染色体的畸变率与对照相比并无显著性的差异, 萝卜和芹菜种子则有显著差异(表 3)。

由表 3 可看出, 除萝卜种子的对照外, 其他供试

蔬菜种子在 0℃和 20℃条件下经过多年贮存后, 胚根根尖细胞染色体均有变异发生。所有在 20℃条件下贮存 13 年后的种子, 其胚根根尖细胞染色体畸变率均高于 0℃条件下贮存的对照种子, 说明超干

种子在低温条件下有利于蔬菜种子长年保持胚根根尖细胞染色体的稳定。异常细胞染色体类型多表现为“单桥”, 其次为“落后”, “双桥”和“多桥”较为少见。

表 3 胚根根尖细胞染色体观察结果

蔬菜种类	处 理	观察细胞总数 (个)	正常细胞数 (个)	异常细胞染色体类型				异常细胞 总数(个)	畸变率 (%)
				单桥	落后	双桥	多桥		
萝卜	0℃ ck	112	112	0	0	0	0	0	0 a
	20℃ 硅 1	825	796	14	12	3	0	29	3.52 b
	20℃ 硅 2	62	59	3	0	0	0	3	4.84 b
番茄	0℃ ck	402	396	5	1	0	0	6	1.49 a
	20℃ 硅 1	410	398	6	5	1	3	12	2.93 a
	20℃ 硅 2	326	318	5	3	0	0	8	2.45 a
芹菜	0℃ ck	256	252	3	1	0	0	4	1.56 a
	20℃ 硅 1	189	176	10	0	0	3	13	6.88 c
	20℃ 硅 2	126	120	3	0	1	2	6	4.76 b

注: 采用 Duncan's 新复极差(SSR) 检验法进行检验, 检验水准为 0.05

番茄种子经多年贮存后处理硅 1 和硅 2 的胚根根尖细胞染色体畸变率分别高于对照 1.44% 和 0.96%, 但与对照均无显著差异。硅 1 和硅 2 的根尖细胞染色体畸变率均低于 3%, 说明其染色体只发生了轻微的异常变异, 因此可以认为番茄种子在适宜的含水量范围内可适用于常温下长年贮存。此结果与活力试验结果相一致。萝卜种子经多年贮存后硅 1 和硅 2 处理的胚根根尖细胞染色体畸变率分别为 3.52% 和 4.84%, 两处理之间无显著性差异。芹菜种子经多年贮存后硅 1 和硅 2 处理的胚根根尖细胞染色体畸变率分别高于对照 5.32% 和 3.20%, 且与对照的差异均达到极显著水平, 说明芹菜种子常温下长年贮存的效果不如番茄、萝卜种子好。

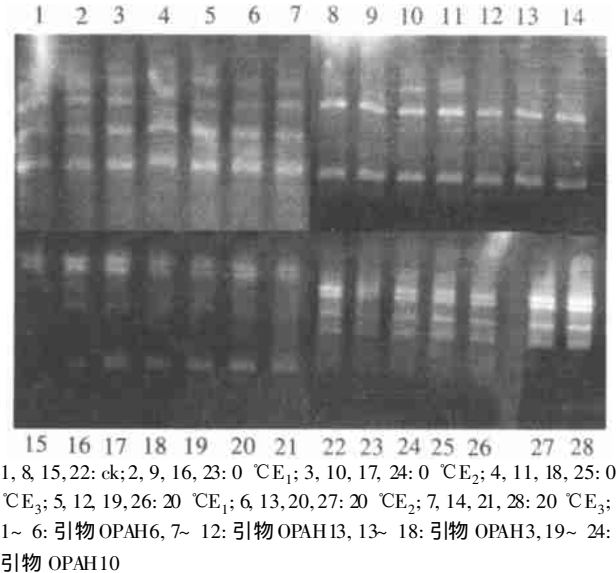


图 1 多年超干贮存后的萝卜种子 RAPD 分析

2.3 3 种蔬菜种子多年超干贮存后的 RAPD 结果分析

采用 100 多个引物对贮藏 13 年的 3 种蔬菜种子进行 RAPD 分析的结果表明, 多年贮藏后超干种子的 RAPD 带型与对照种子的 RAPD 带型没有明显差异(图 1~3), 这说明虽然某些超干种子的染色体畸变率比对照高, 但 DNA 并没有发生变异, 表明经过长期超干贮藏的种子遗传稳定性良好。

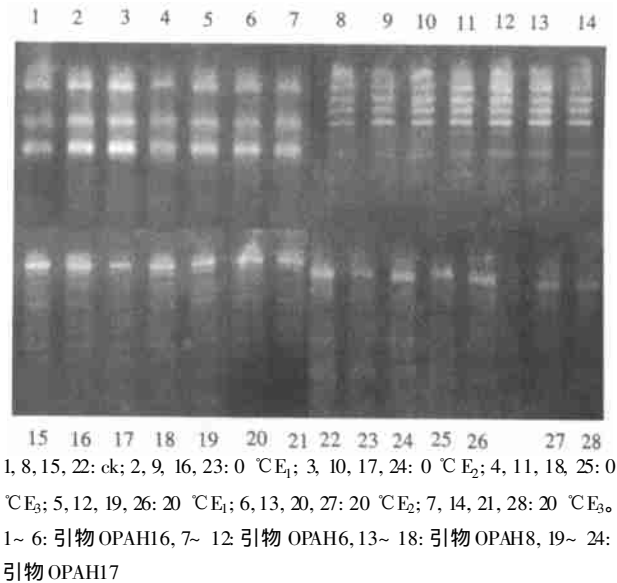
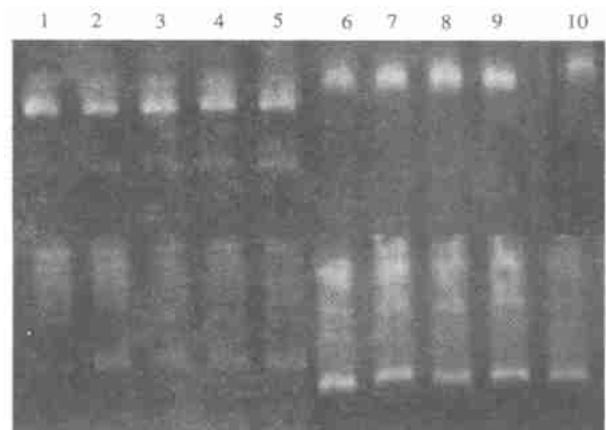


图 2 多年超干贮存后的番茄种子 RAPD 分析

3 讨论

由于种子老化而导致的染色体的异常是一个普遍现象^[6,7]。据文献报道^[8], 用显微镜观察细胞分裂的染色体, 如有 3%~4% 细胞发生染色体不正常



1, 6, 11, 16: 0 °C ck; 2, 7, 12, 17: 0 °C E₁; 3, 8, 13, 18: 0 °C E₂; 4, 9, 14, 19: 20 °C E₁; 5, 10, 15, 20: 20 °C E₂. 1~ 5: 引物 OPB8, 6~ 10: 引物 OPC10, 11~ 15: 引物 OPB18, 16~ 20: 引物 OPAH3

图 3 多年超干贮存后的芹菜种子 RAPD 分析

时,可以肯定染色体已发生了变异。谭富娟等^[8]为研究变异细胞的传递情况,将多年贮存后已发生染色体变异的陈种子在田间播种,它们长出的植株在田间生长正常,采收后,除考查主要性状外,还取种子催芽,观察胚根根尖细胞染色体中异常率仅为 0.4%。表明陈旧种子种植后畸变的染色体可以恢复正常,在更新繁殖的种子中不会继续存留着高异常畸变率的染色体。

本试验结果表明,延缓种子的老化对贮藏温度和水分都有一定的要求,贮存时间的延长和贮存期间温度、种子含水量偏高或偏低等都会导致染色体损伤和畸变。随着种子老化程度的加重,种子生活力降低,细胞染色体畸变率相应升高,染色体畸变率与种子活力之间存在一定的负相关性。

超干贮存 13 年后供试蔬菜种子总的效果较好,与刘长河^[5]曾介绍过的几种蔬菜种子在 10~ 15 °C 条件下贮存发芽率逐年下降的结果相比较,超干贮存表现出明显的优势。番茄、萝卜种子表现尤佳,13

年后发芽率仍能保持 90% 以上,而常规贮存萝卜种子 7 年后则完全丧失发芽率。本试验中芹菜种子的超干贮存效果相对较差,13 年后的发芽率比贮存初期下降了 59%~ 75%,而常规贮存的芹菜种子 4 年后发芽率就下降了 60%~ 66%,5 年后就降为 0,由此可见,20 °C 超干贮存对芹菜种子仍比常规贮存的效果要好。上述结果表明,20 °C 下长期超干贮存蔬菜种子,除应使种子保持较低的含水量外,不同的蔬菜种类会产生不同的存贮效果,其间差异尚有待于继续试验研究。

参考文献:

- [1] 张海英,孟淑春,孔祥辉. 多年超干贮存对大葱种子生理生化特性的影响[J]. 华北农学报, 2001, 16(4): 47-51.
- [2] 国际种子检验协会. 国际种子检验规程(中译本)[M]. 北京: 农业出版社, 1993. 41-44, 27-29.
- [3] Murry H G, Thomspson W F. Rapid isolation of wheat DNA[J]. Nucleic Acid Res, 1980, 8: 4321.
- [4] 许勇, 欧阳新星, 张海英, 等. 西瓜黄瓜快速简单 RAPD 技术的研究[A]. 见: 侯喜林, 常有宏. 园艺学进展(II)[M]. 南京: 东南大学出版社, 1998. 457-463.
- [5] 刘天河. 几种瓜类作物和蔬菜种子的寿命及贮藏方法与发芽率的关系[J]. 植物生理学通讯, 1986, (3): 78-80.
- [6] Grzesiuk S, Tluczkiwiez J. Viability and vigor of aging winter grains[J]. Acta Soc Bot, 1982, 51: 251-262.
- [7] 景新明, 郑光华, 陶嘉龄. 超干的榆树种子在加热老化过程中活力变化与染色体变异[J]. 植物学报, 1994, (增刊): 73-78.
- [8] 谭富娟, 范传珠, 马缘生, 等. 燕麦种子贮存后遗传完整性研究[J]. 种子, 1997, (5): 9-12.
- [9] Zheng G H, Jing X M, Tao K L. Ultradry storage cuts cost of gene bank[J]. Nature, 1998, 23-25.