

## 低温层积对 3 种椴树属植物种子活性氧含量和 抗氧化酶活性的影响

许世达, 王立, 吴莹, 徐汤俊, 耿兴敏<sup>①</sup>, 祝遵凌

(南京林业大学风景园林学院, 江苏 南京 210037)

**摘要:** 对 4 °C 低温层积 0~120 d 紫椴 (*Tilia amurensis* Rupr.)、辽椴 (*T. mandshurica* Rupr. et Maxim.) 和美洲椴 (*T. americana* Linn.) 种子的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量以及 SOD、POD 和 CAT 活性变化进行了比较。结果表明: 在低温层积过程中, 3 种植物种子的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量以及辽椴和美洲椴种子的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量总体上高于对照 (层积 0 d), 但紫椴种子的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量低于对照; 3 种植物种子的抗氧化酶活性呈现不同变化趋势, 其中, 辽椴种子的 SOD 和 POD 活性以及美洲椴种子的 POD 活性均高于对照。总体来看, 低温层积可促进 3 种植物种子中活性氧的积累, 并增强辽椴种子的 SOD 和 POD 活性及美洲椴种子的 POD 活性。

**关键词:** 椴树属; 种子休眠; 低温层积; 活性氧含量; 抗氧化酶活性

中图分类号: Q945.6<sup>+</sup>5; S792.36 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2022)06-0084-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2022.06.09

**Effect of low temperature stratification on reactive oxygen species content and antioxidant enzyme activities in seeds of three species of *Tilia* Linn.** XU Shida, WANG Li, WU Ying, XU Tangjun, GENG Xingmin<sup>①</sup>, ZHU Zunling (College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2022, 31(6): 84-86

**Abstract:** Variations of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents and SOD, POD, and CAT activities in seeds of *Tilia amurensis* Rupr., *T. mandshurica* Rupr. et Maxim., and *T. americana* Linn. during 4 °C low temperature stratification for 0-120 d were compared. The results show that during low temperature stratification, O<sub>2</sub><sup>-</sup> content in seeds of three species and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in seeds of *T. mandshurica* and *T. americana* are generally higher than those of the control (stratification for 0 d), but H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in seeds of *T. amurensis* is lower than that of the control; antioxidant enzyme activities of three species show different variation tendencies, in which, SOD and POD activities in seeds of *T. mandshurica* and POD activity in seeds of *T. americana* are all higher than those of the control. It is suggested that in general, low temperature stratification can promote reactive oxygen species accumulation in seeds of three species, and increase SOD and POD activities in seeds of *T. mandshurica* and POD activity in seeds of *T. americana*.

**Key words:** *Tilia* Linn.; seed dormancy; low temperature stratification; reactive oxygen species content; antioxidant enzyme activity

椴树属 (*Tilia* Linn.) 植物具有较高的观赏和经济价值, 应用前景广阔。目前椴树属植物以种子繁殖为主, 但受种皮<sup>[1]</sup>和萌发抑制物的影响<sup>[2,3]</sup>, 其种子具有深休眠的特性。研究发现, 在种子打破休眠过程中, 活性氧和抗氧化酶均发挥着重要作用<sup>[4-7]</sup>。

鉴于此, 作者以野生的紫椴 (*T. amurensis* Rupr.)、辽椴 (*T. mandshurica* Rupr. et Maxim.) 和美洲椴 (*T. americana* Linn.) 的种子为研究材料, 分析了低温层积过程中 3 种植物种子活性氧含量和抗氧化酶活性的变化, 以为椴树属植物种子休眠机制研究提供基础数据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

野生的紫椴和辽椴果实于 2021 年 3 月采集于吉林延边朝鲜族自治州安图县, 野生的美洲椴果实同时期采集于江西九江市; 将采集的果实置于阴凉干燥处保存、备用。

#### 1.2 方法

收集完整种子, 参照 Wu 等<sup>[5]</sup>的方法破除种子休眠并略加改进。先用浓硫酸 (质量分数 98%) 酸蚀, 其中, 紫椴种子酸

收稿日期: 2022-03-01

基金项目: 南京市绿化园林局项目 (YLKJ202005JH); 南京林业大学大学生创新创业训练项目 (2020NFUSPITP0916)

作者简介: 许世达 (1996—), 男, 河北石家庄人, 博士研究生, 主要从事园林植物种质创新方面研究。

<sup>①</sup>通信作者 E-mail: xmgeng76@163.com

引用格式: 许世达, 王立, 吴莹, 等. 低温层积对 3 种椴树属植物种子活性氧含量和抗氧化酶活性的影响 [J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(6): 84-86.

蚀 30 min, 辽椴和美洲椴种子酸蚀 50 min; 再用 500 mg · L<sup>-1</sup>GA<sub>3</sub>溶液浸泡 8 h。每个树种取 5 000 粒处理后种子进行低温(4 ℃)层积沙藏, V(种子) : V(湿沙) = 1 : 3。每周洒水和翻动 1 次, 每次洒水约 100 mL。分别在层积 0(对照)、30、60、90、120 d 取完整未发芽的种子各 0.5 g, 参照李玲等<sup>[8]</sup>的方法测定 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量, 参照刘子凡<sup>[9]</sup>的方法测定 SOD、POD 和 CAT 活性。每个指标重复取样测定 3 次。

1.3 数据处理和分析

采用 EXCEL 2016 软件进行数据整理和分析。

2 结果和分析

2.1 种子活性氧含量的变化

结果(表 1)显示:低温层积过程中,3 种植物种子 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量均高于对照(层积 0 d)。紫椴种子 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量随层积时间延长先升高后降低,在层积 60 d 最高,较对照升高 37.48%。辽椴种子 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量在层积 30 d 最高,较对照升高 87.78%,此后随层积时间延长总体上逐渐下降。美洲椴种子 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量在不同层积时间均高于对照,且随层积时间延长波动变化。

结果(表 1)显示:低温层积过程中,紫椴种子 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量均低于对照,并随层积时间延长波动变化;在层积 30 d 最低,较对照降低 49.12%,随后不同程度升高。辽椴种子 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量总体上高于对照,并随层积时间延长波动变化;在层积 60 d 最高,较对照升高 96.63%。美洲椴种子 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量均高于对照,并随层积时间延长先升高后降低;在层积 90 d 最高,较对照升高 83.29%,其他层积时间与对照无显著差异。

表 1 低温层积过程中 3 种椴树属植物种子活性氧含量的变化<sup>1)</sup>  
Table 1 Variation of reactive oxygen species content in seeds of three species of *Tilia* Linn. during low temperature stratification<sup>1)</sup>

层积时间/d Stratification time	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 含量/(nmol · g <sup>-1</sup> ) O <sub>2</sub> <sup>-</sup> content		
	紫椴 <i>T. amurensis</i>	辽椴 <i>T. mandshurica</i>	美洲椴 <i>T. americana</i>
0(CK)	90.25	100.66	66.59
30	105.44(16.83%)	189.02(87.78%)	128.00(92.22%)
60	124.08(37.48%)	140.94(40.02%)	112.78(69.36%)
90	113.69(25.97%)	141.35(40.42%)	158.63(138.22%)
120	98.88(9.56%)	115.89(15.13%)	117.60(76.60%)

  

层积时间/d Stratification time	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 含量/(μmol · g <sup>-1</sup> ) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> content		
	紫椴 <i>T. amurensis</i>	辽椴 <i>T. mandshurica</i>	美洲椴 <i>T. americana</i>
0(CK)	28.97	17.79	16.22
30	14.74(-49.12%)	28.42(59.75%)	23.32(43.77%)
60	20.06(-30.76%)	34.98(96.63%)	24.55(51.36%)
90	24.99(-13.74%)	16.28(-8.49%)	29.73(83.29%)
120	20.21(-30.24%)	27.67(55.54%)	21.30(31.32%)

<sup>1)</sup> 括号内正值和负值分别表示较对照升高和降低的百分数 Positive and negative values in brackets represent increased and decreased percentages compared with the control, respectively.

2.2 种子抗氧化酶活性的变化

结果(表 2)显示:低温层积过程中,紫椴种子 SOD 活性高于或低于对照(层积 0 d),并随层积时间延长波动变化;在层积 60 d 最低,较对照降低 58.51%;在层积 120 d 最高,较对照升高 7.17%。辽椴种子 SOD 活性均高于对照,并随层积时间延长先升高后降低;在层积 90 d 最高,较对照升高 86.86%。美洲椴种子 SOD 活性高于或低于对照,并随层积时间延长波动变化。

结果(表 2)显示:低温层积过程中,紫椴种子 POD 活性高于或低于对照,并随层积时间延长波动变化;在层积 30 d 最低,较对照降低 11.68%;在层积 120 d 最高,较对照升高 176.59%。辽椴种子 POD 活性均高于对照,且随层积时间延长波动升高;在层积 120 d 最高,较对照升高 456.56%。美洲椴种子 POD 活性均高于对照,且随层积时间延长逐渐升高。

结果(表 2)显示:低温层积过程中,3 种植物 CAT 活性均随层积时间延长波动变化。紫椴种子 CAT 活性在层积 90 d 最低,较对照降低 18.49%;在层积 120 d 最高,较对照升高 9.19%。辽椴种子 CAT 活性在层积 90 d 最高,较对照升高 29.56%;在层积 120 d 最低,较对照降低 27.42%。美洲椴种子

表 2 低温层积过程中 3 种椴树属植物种子抗氧化酶活性的变化<sup>1)</sup>  
Table 2 Variation of antioxidant enzyme activities in seeds of three species of *Tilia* Linn. during low temperature stratification<sup>1)</sup>

层积时间/d Stratification time	SOD 活性/(U · g <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> ) SOD activity		
	紫椴 <i>T. amurensis</i>	辽椴 <i>T. mandshurica</i>	美洲椴 <i>T. americana</i>
0(CK)	61.80	49.94	39.51
30	65.24(5.56%)	59.50(19.14%)	34.08(-13.74%)
60	27.19(-56.00%)	72.47(45.11%)	55.34(40.06%)
90	25.64(-58.51%)	93.32(86.86%)	51.92(31.41%)
120	66.23(7.17%)	67.86(35.88%)	35.69(-9.67%)

  

层积时间/d Stratification time	POD 活性/(U · g <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> ) POD activity		
	紫椴 <i>T. amurensis</i>	辽椴 <i>T. mandshurica</i>	美洲椴 <i>T. americana</i>
0(CK)	41.01	20.51	20.92
30	36.22(-11.68%)	44.39(116.43%)	32.66(56.12%)
60	57.59(40.43%)	39.37(91.96%)	58.98(181.93%)
90	41.18(0.41%)	46.94(128.86%)	65.47(212.95%)
120	113.43(176.59%)	114.15(456.56%)	114.48(447.23%)

  

层积时间/d Stratification time	CAT 活性/(U · g <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> ) CAT activity		
	紫椴 <i>T. amurensis</i>	辽椴 <i>T. mandshurica</i>	美洲椴 <i>T. americana</i>
0(CK)	9.03	6.09	6.78
30	7.90(-12.51%)	5.22(-14.28%)	3.46(-48.97%)
60	9.68(7.20%)	6.64(9.03%)	3.79(-44.10%)
90	7.36(-18.49%)	7.89(29.56%)	5.52(-18.58%)
120	9.86(9.19%)	4.42(-27.42%)	5.84(-13.86%)

<sup>1)</sup> 括号内正值和负值分别表示较对照升高和降低的百分数 Positive and negative values in brackets represent increased and decreased percentages compared with the control, respectively.

CAT活性均低于对照,且在层积30 d最低,较对照降低48.97%。

### 3 讨论和结论

上述研究结果表明:3种椴树属植物种子 $O_2^-$ 含量在低温层积过程中均不同程度升高,且辽椴和美洲椴种子 $H_2O_2$ 含量也总体升高,仅紫椴种子 $H_2O_2$ 含量降低。花棒(*Hedysarum scoparium* Fisch. ex Mey.)和石榴(*Punica granatum* Linn.)的种子经过低温层积后活性氧含量升高<sup>[6,10]</sup>。据此推断,低温层积可以诱导种子中活性氧的积累,且活性氧可作为信号分子促进种子打破休眠<sup>[11]</sup>。

低温层积过程中,3种椴树属植物种子SOD活性的变化趋势各异,在层积60和90 d,紫椴种子SOD活性明显降低,而辽椴和美洲椴种子SOD活性则恰好相反。蒋金娟等<sup>[12]</sup>认为,随着贮藏时间延长种子萌发率逐渐上升,而SOD活性逐渐下降;张恒溥等<sup>[13]</sup>发现,在低温层积60 d,非洲狗尾草品种‘纳罗克’(*Setaria sphacelata* ‘Narok’)种子SOD活性降至最低;但米槁(*Cinnamomum migao* H. W. Li)种子在低温层积150 d内SOD活性和萌发率逐渐上升<sup>[14]</sup>。可见,种子萌发过程中SOD活性的变化因植物种类和萌发条件不同而异。低温层积过程中,3种椴树属植物种子POD活性多高于对照(层积0 d),并在层积120 d达到最高,而其他种类植物种子的POD活性却随着层积时间延长呈现逐渐上升的趋势<sup>[15,16]</sup>。说明低温层积可以增强植物种子POD活性,这可能与长期低温层积对种子造成一定的生理胁迫有关。3种椴树属植物种子CAT活性在低温层积过程中无明显变化,说明3种椴树属植物种子CAT活性对低温层积的响应不敏感。当种子保存时间过长或条件不适合,有可能生成过量的活性氧,对种子产生胁迫<sup>[17]</sup>。本研究中,低温层积可能对3种椴树属植物种子产生了一定的胁迫作用,而在低温层积中后期SOD和POD活性升高可能与种子抵抗氧化损害有关。

综上所述,总体来看,低温层积可增加3种椴树属植物种子中活性氧的积累,并导致辽椴种子SOD和POD活性及美洲椴种子POD活性升高,但3种植物种子的活性氧含量和抗氧化酶活性变化规律明显不同,这可能与植物本身的遗传差异和对环境的适应性差异有关。

#### 参考文献:

- [1] 杜凤国, 苏春华, 李云凤, 等. 紫椴和糠椴种子解剖构造的研究[J]. 吉林林学院学报, 1994, 10(2): 99-104.
- [2] 史锋厚, 沈永宝, 施季森. 南京椴种子发芽抑制物研究[J]. 福建林学院学报, 2007, 27(3): 222-225.
- [3] 孙 斌, 纪书琴. 紫椴种子萌发抑制物的研究[J]. 防护林科技, 2009(4): 34-35, 88.
- [4] 高英旭. 赤霉素 $GA_3$ 对不同层积催芽紫椴种子萌发的影响[J]. 辽宁林业科技, 2018(1): 29-33.
- [5] WU Y, SHEN Y B. Sulfuric acid and gibberellic acid ( $GA_3$ ) treatment combined with exposure to cold temperature modulates seed proteins during breaking of dormancy to germination in *Tilia miqueliana*[J]. The Protein Journal, 2021, 40(6): 940-954.
- [6] 苏立强. ROS对花棒种子萌发的影响及其作用机理研究[D]. 北京: 北京林业大学生物科学与技术学院, 2016: 17-36.
- [7] 杨 艳, 黎云祥, 胥 晓. 珙桐种子休眠解除和萌发过程中主要抗氧化酶活性和代谢产物含量的变化[J]. 植物分类与资源学报, 2015, 37(6): 779-787.
- [8] 李 玲, 何国振. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2021: 144-159.
- [9] 刘子凡. 种子学实验指南[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 97-104.
- [10] SHALIMU D, SUN J, BASKIN C C, et al. Changes in oxidative patterns during dormancy break by warm and cold stratification in seeds of an edible fruit tree[J]. AoB Plants, 2016, 8: plw024.
- [11] BAILLY C, EI-MAAROUF-BOUTEAU H, CORBINEAU F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology[J]. Comptes Rendus Biologies, 2008, 331(10): 806-814.
- [12] 蒋金娟, 王 琰, 朱德荣, 等. 自然贮藏对‘莫拉特II’杂交臂形草种子萌发及抗氧化酶活性的影响[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2021, 36(5): 919-924.
- [13] 张恒溥, 彭 健, 罗富成, 等. 低温层积对纳罗克非洲狗尾草种子酶活性及其萌发的影响[J]. 草原与草坪, 2016, 36(6): 35-38, 44.
- [14] 唐子燕, 刘济明, 黄小龙, 等. 米槁种子层积过程中贮藏物质含量及酶活性的变化[J]. 分子植物育种, 2022, 20(4): 1317-1324.
- [15] ZUO Y, YIN L, WEI B R, et al. Physiological changes of American ginseng seeds during cold stratification[J]. Seed Science and Technology, 2021, 49(3): 237-246.
- [16] BAO J P, ZHANG S L. Changes in germination, storage materials and antioxidant enzyme activities in pear (*Pyrus betulaefolia* Bge. and *Pyrus calleryana* Dcne.) stock seeds during cold stratification[J]. Seed Science and Technology, 2011, 39(3): 655-659.
- [17] EI-MAAROUF-BOUTEAU H, JOB C, JOB D, et al. ROS signaling in seed dormancy alleviation[J]. Plant Signaling and Behavior, 2007, 2(5): 362-364.

(责任编辑: 吴蕊夷, 惠 红)