

ZHONG ZI SHENG WU
XUE YAN JIU ZHI NAN

种子生物学 研究指南

宋松泉 程红焱 龙春林 姜孝成 主编

62



科学出版社

www.sciencep.com

种子生物学研究指南

宋松泉 程红焱 主编
龙春林 姜孝成

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书结合多位作者及其同事多年来的研究工作,在广泛收集国内外大量文献的基础上,比较全面系统地介绍了种子生物学的研究技术。内容包括:种子形态与组分、种子发育、种子萌发与休眠、种子老化与抗氧化系统、种子分子生物学技术以及种子/胚(轴)的超低温保存技术。

本书可作为种子科学与技术工作者的研究用书,也可供综合性大学、高等农林和师范院校生物学专业的师生参考。

图书在版编目(CIP)数据

种子生物学研究指南/宋松泉等主编. —北京:科学出版社,2005

ISBN 7-03-015108-9

I. 种… II. 宋… III. 种子-生物学-研究-指南 IV. Q945.6-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 016136 号

责任编辑:姜朋逊 霍春雁/责任校对:宋玲玲

责任印制:钱玉芬/封面设计:王 浩

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005年3月第一版 开本:BS(720×1000)

2005年5月第二次印刷 印张:13 1/2

印数:1 201—2 200 字数:257 000

定价:40.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换(新欣))

序

植物种质资源是人类赖以生存的物资基础。目前人类所面临的粮食、能源和环境等问题都与植物种质资源的保护和利用有直接或间接的关系,植物种质资源的保护和利用也与人类社会的生存和可持续发展紧密相关。

我国具有丰富的气候资源和植物种质资源,是世界上植物多样性最丰富的国家之一。长期以来,由于人口压力大、生态环境恶化等原因,我国的植物多样性正受到前所未有的严重威胁。植物多样性的保护包括原生境保护和迁地保护。种质资源库保存是植物迁地保护的最重要形式,而种子则是植物种质资源长期保存的理想材料。

正常性种子能够在低温低含水量下长期贮藏,采用种子库保存植物种质资源具有经济、简便、安全、可靠、技术较成熟等诸多优点;但到目前为止,顽拗性种子的长期贮藏还没有成功的报道。我国云南、广东、福建、海南等地具有丰富的顽拗性种质资源,其中包括重要的栽培作物(如橡胶、可可和椰子),热带果树(如油梨、芒果、倒捻子、榴莲、红毛丹、木菠萝、黄皮、龙眼和荔枝),热带木材(如坡垒、青皮),以及一些珍稀濒危物种(如望天树和箭毒木)等。大部分顽拗性种子脱落后,如果置于室内通风处,往往只有几天或10余天的寿命。因此,研究种子发育与脱水行为和贮藏行为的关系,长期保存顽拗性植物种质资源就成为种子生物学必须解决的重要问题。

种子又是农林业和园艺生产中最基本的生产资料,种子质量的高低直接影响播种品质和农作物产量。生产高质量的种子,延缓种子衰老以及通过种子预处理、提高播种品质也是种子生物学研究的重要方面。

《种子生物学研究指南》的作者们是多年从事种子生物学研究与教学的中、青年科技人员。该书的编写是作者们长期积累、总结以及广泛收集国内外该领域研究进展的结晶。可以相信,该书的面世对于提高我国种子生物学的研究与教学水平,长期保存植物种质资源、特别是珍稀濒危植物资源和逆境植物资源,保障国家的生物资源安全以及实现可持续发展都具有一定的理论和实践意义。

最后,让我以“希望的种子,种子的希望”来结束本书的序。

中国科学院植物研究所

王连成

2004年11月26日于中关村

前 言

Roberts (1973) 根据种子的贮藏行为将种子分为正常性种子 (orthodox seed) 和顽拗性种子 (recalcitrant seed)。正常性种子在母体植株上经历成熟脱水, 脱落时含水量较低, 通常种子能被进一步干燥到 1% ~ 5% 的含水量而不受伤害, 并且能够根据贮藏条件被预测出寿命。顽拗性种子不经历成熟脱水, 种子脱落时含水量相对较大, 在整个发育过程中不耐脱水, 通常对低温敏感; 在适合正常性种子贮藏的条件下, 顽拗性种子的贮藏寿命通常只有几天到几个星期。Ellis *et al.* (1990) 定义了第三种类型的种子, 它们表现出中间性贮藏行为 (intermediate storage behavior), 在相对低的含水量下能够存活, 但不能忍受像正常性种子那样的水分丧失; 而且如果是热带起源的种子, 即使在脱水状态下也可能对低温敏感。因此, 在种子生物学的研究中种子顽拗性类型的区分是制定种子研究和贮藏策略的关键, 而种子的发育特性又是种子脱水行为和贮藏行为的基础。

种子是植物个体发育的一个特定阶段, 在种族延续上又是遗传信息的保存者与传递者, 是物种在环境胁迫中存活和繁衍的适应性策略; 种子也是农林业和园艺生产中最基本的生产资料, 种子质量的高低直接影响播种品质和农作物产量; 种子又是植物种质资源长期保存的理想材料。

编者整理多年来积累的种子生物学研究技术, 广泛收集国内外的有关文献, 在反复研究的基础上, 编写了这本实用的《种子生物学研究指南》。这一方面是编者本身研究的需要, 另一方面则是种子生物学研究工作者的责任, 同时也是编者多年来的夙愿。国家重大科学工程——“中国西南野生生物种质资源库(简称西南种质资源库)”项目的启动, 加速了编者实现夙愿的进程。“西南种质资源库”项目的建设重点是植物种质库, 即收集保存我国(主要是云南及其邻近地区)的珍稀、濒危以及具有重要经济和科研价值的植物种子, 长期保存于西南种质库中, 这些地区的许多植物种子, 都属于顽拗性种子。因此, 《种子生物学研究指南》的编写, 以及建立相应的技术平台, 对于防范即将实施的西南种质资源库项目的风险和实现种质资源的长期保存都具有一定的理论和实践意义。

《种子生物学研究指南》由中国科学院西双版纳热带植物园宋松泉博士及其同事、中国科学院植物研究所程红焱博士、中国科学院昆明植物研究所龙春林博士和湖南师范大学生命科学学院姜孝成博士主编(具体撰写的实验内容已在书中注明, 附录由宋松泉收集整理)。本书比较全面而系统地介绍了种子生物学的研究技术, 内容包括: 种子形态与组分, 种子发育, 种子萌发与休眠, 种子老化与抗氧化系统, 种子分子生物学技术, 种子/胚(轴)的超低温保存技术。全书由宋松泉和程红

焱负责修改润饰。

本书是编者及其同事多年来从事教学和研究的产物,国内外相关文献为本书的撰写提供了极其丰富的资料,在此我们向建立、补充和完善各个研究方法的先生们表示崇高的敬意。在本书的编写过程中,得到了国际上著名的种子生物学家、中山大学生命科学学院傅家瑞教授的关心和支持,特别是中国科学院植物研究所匡廷云院士一直关心着种子生物学学科的发展,在患病期间还为本书作序,使编者深受感动和鼓舞。本书还得到了中国科学院“百人计划”和中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KSCX2-SW-117)的资助出版,在此一并表示衷心的感谢!

由于植物种质资源的保护、开发和利用愈来愈受到各国政府、科学家和民众的重视,以及随着种子生物学相关学科例如植物生理学、生物化学、分子生物学、基因组学和蛋白质组学等学科的迅速进展,种子生物学的研究已变得日新月异,加上编者的水平限制,书中一定有不足甚至错误之处,还请读者批评指正。同时,编者也希望本书起到抛砖引玉的作用,共同为促进种子生物学的研究和应用做贡献。

本书的编写酝酿于昆明的莲花池畔,启笔于美丽的西双版纳葫芦岛——中国科学院西双版纳热带植物园,完成于北京的香山和平屋。在书稿完成之际,香山的红叶、春城的阳光、西双版纳的热带雨林和环绕葫芦岛的罗梭江,一并映入编者的眼帘,如诗如画,那不正是希望的种子吗!

编 者

于北京香山和平屋

2004年10月30日

目 录

序 前言

一、种子形态与组分	1
方案 1 种子含水量的测定	3
方案 2 种子的净度分析	4
方案 3 种子重量的测定	6
方案 4 种子的结构与幼苗类型	8
方案 5 种子中可溶性糖的测定	13
方案 6 种子中淀粉含量的测定(砷钼酸比色法)	15
方案 7 种子粗脂肪的测定	17
方案 8 种子中氨基酸含量的测定	19
方案 9 种子中蛋白质含量的测定	20
方案 10 种子蛋白质的组分分析	27
二、种子发育	31
方案 11 种子/胚(轴)萌发能力的发育变化	33
方案 12 种子/胚(轴)脱水耐性的发育变化	34
方案 13 不同脱水速率对种子/胚(轴)脱水耐性的影响	35
方案 14 酶联免疫法(ELISA)测定种子中的植物激素	36
方案 15 种胚的离体培养	41
方案 16 脱水耐性相关蛋白组的固相 pH 梯度 IEF-SDS 双向电泳分析	43
方案 17 脱水素蛋白的提取、分离和 Western 印迹	48
三、种子萌发与休眠	55
方案 18 种子发芽率和发芽势的测定	57
方案 19 种子发芽率的快速测定	58
方案 20 种子萌发指数的测定	60
方案 21 电导法测定种子活力	61
方案 22 种子呼吸速率的测定——微量定容测压法	62
方案 23 种子线粒体的提取、纯化及活性测定	67
方案 24 腺苷三磷酸含量的测定	75
方案 25 α -和 β -淀粉酶活性的测定	77
方案 26 酸性磷酸酶活性的测定	79

方案 27	异柠檬酸裂解酶活性的测定	80
方案 28	蛋白酶活性的测定	82
方案 29	内肽酶和氨肽酶活性的测定及同工酶电泳分析	84
四、种子老化与抗氧化系统		89
方案 30	细胞活性染色	91
方案 31	人工促进老化法测定种子活力	92
方案 32	超氧化物歧化酶活性的测定	93
方案 33	过氧化氢酶活性的测定	94
方案 34	抗坏血酸过氧化物酶活性的测定	95
方案 35	脱氢抗坏血酸还原酶活性的测定	97
方案 36	单脱氢抗坏血酸还原酶活性的测定	99
方案 37	谷胱甘肽还原酶活性的测定	100
方案 38	抗坏血酸含量的测定	102
方案 39	α -生育酚含量的测定	104
方案 40	硫代巴比妥酸活性产物含量的测定	106
方案 41	超氧阴离子自由基含量的测定	107
方案 42	过氧化氢含量的测定	108
方案 43	羟自由基含量的测定	110
方案 44	L-异天冬氨酰甲基转移酶活性的测定	111
五、种子分子生物学技术		115
方案 45	种子基因组 DNA 的分离、纯化和脱水素基因的 Southern 印迹 ..	117
方案 46	种子 mRNA 的分离、纯化和 Northern 印迹	124
方案 47	脱水素基因的克隆和诱导表达	128
方案 48	种子休眠和萌发过程中的蛋白质组学分析	131
六、种子/胚(轴)的超低温保存技术		143
方案 49	种子的超低温贮藏	145
方案 50	胚轴的超低温贮藏与离体再生	148
附录		153
附录 1	摩尔数与摩尔浓度	155
附录 2	常用酸、碱和其他化合物的浓度	155
附录 3	几种 pH 标准溶液的组成和性质(25℃)	156
附录 4	一些常用的缓冲溶液	156
附录 5	酸碱指示剂	160
附录 6	离心力(g)与离心机转数测算表	161
附录 7	硫酸铵饱和浓度换算表	162
附录 8	不同温度下各种饱和盐溶液和硫酸的相对湿度	162

附录 9	不同温度下不同浓度的无机酸产生的相对湿度	163
附录 10	以鲜重或者干重为基础表达的相等的百分数含水量	164
附录 11	贮藏温度与种子最大安全含水量的关系	165
附录 12	不同相对湿度下种子的含水量 (25℃)	165
附录 13	种子湿润低温解除休眠的有效温度与所需天数	166
附录 14	植物组织和细胞培养的常用培养基	168
附录 15	常用培养基的附加成分 (mg/L)	169
附录 16	种子加速老化的适用范围及条件	170
附录 17	元素的原子量表	170
附录 18	农业和蔬菜种子的萌发规程	172
附录 19	乔木和灌木种子的萌发规程	182
附录 20	花、香料和中草药种子的萌发规程	192

一、种子形态与组分

方案 1 种子含水量的测定

原 理

种子含水量是影响种子贮藏寿命的主要因素之一。低于安全含水量的种子在贮藏中能较好地保持活力。如果种子含水量过高,则种子的劣变速率加快,导致活力下降与贮藏寿命缩短。通过测定种子含水量,能及时了解种子含水量的变化动态,对种子贮藏具有重要意义。此外,种子的脱水敏感性是判断种子顽拗性的重要参数,也是制定种子贮藏和研究策略的关键。本实验是利用水遇热蒸发为水蒸气的原理,用加热烘干法测定种子含水量。

仪器与试剂

分析天平、称量瓶、恒温干燥箱、坩埚钳、干燥器、刀片、手套。

实验步骤

(1) 称量瓶的恒重。将洗净干燥的称量瓶放在 105℃ 的恒温干燥箱中烘 4 h, 用坩埚钳取出, 放入装有活化硅胶的干燥器中冷却至室温后, 在分析天平上称重 (W_1)。放入干燥器中备用。

(2) 样品的恒重。将待测的种子装入已知重量的称量瓶中, 加盖, 在分析天平上准确称取其重量, 得瓶和鲜样品的总重量 (W_2)。揭开瓶盖, 置 103 ± 2℃ 的恒温干燥箱中烘 17 h 或者置 80℃ 的恒温干燥箱中烘 48 h 后, 打开恒温干燥箱的门, 盖上瓶盖。用坩埚钳取出, 放入装有活化硅胶的干燥器中冷却至室温, 在分析天平上称重, 得瓶和干样品的总重量 (W_3)。

(3) 种子含水量。种子含水量以干重为基础进行计算。

$$\text{种子含水量 (g H}_2\text{O/g DW)} = (W_2 - W_3) / (W_3 - W_1)$$

注意事项

● 油菜、萝卜、芝麻等小粒种子可装入称量瓶中直接烘干; 花生、大豆、蓖麻、荔枝、木菠萝等大、中粒种子在烘干前必须切成 0.1 cm 的薄片, 然后再烘干。

- 盖称量瓶盖时应在恒温干燥箱中进行,以免样品暴露在湿空气中。
- 取称量瓶时应用坩埚钳或者戴棉质手套。

参考文献

- 国家技术监督局. 1995. GB/T 3543.1~3543.7-1995, 农作物种子检验规程. 北京: 中国标准出版社, 62~64
- 全国农作物种子标准化技术委员会, 全国农业技术推广服务中心. 2000. GB/T 3543.1~3543.7-1995, 《农作物种子检验规程》实施指南. 北京: 中国标准出版社, 104~110
- International Seed Testing Association. 1999. International Rules for Seed Testing. *Seed Sci & Technol*, 27 (Supplement): 47~50

(宋松泉 龙春林)

方案 2 种子的净度分析

原 理

净度是衡量种子质量的一项重要指标,为了控制种子质量,各国种子法规都明确规定了净种子重量百分比的最低限度以及有毒、有害种子的种类与含量。凡低于净种子重量百分比规定标准或高于杂草种子规定数目标准的,一律不准在市场上流通或用于播种。净度分析主要测定供检种子样品中各组分的重量百分比,并鉴别样品中其他植物种子和杂质所属的种类。

仪器与试剂

净度分析台、分样器、不同孔径的套筛、双目显微镜、分析天平。

实验步骤

送检样品的称重和重型混杂物的检查

(1) 将送检样品(大约是净度分析试样重量的10倍,至少含有2500个种子单位)在天平上称重(M)。然后将其倒在光滑的搪瓷盘中,挑出与供检种子在大小或重量上明显不同且严重影响结果的重型混杂物,如土块、小石块或小粒种子中混杂的大粒种子等,并称重(m)。

$$\text{重型混杂物 \% (D)} = m/M \times 100$$

(2) 再将重型混合物中属于其他植物种子的重型混合物与属于杂质的重型混合物分别称重,并计算各自的百分比(分别为 D_{OS} 和 D_1)。

实验样品的分取

(3) 先将除去重型混合物的实验样品混匀,再用分样器分取实验样品 2 份,分别称重(按规定留取小数位数)。

试样的分离

(4) 选用筛孔适当的两层套筛(小孔筛的孔径小于所分析的种子,而大孔筛的孔径大于所分析的种子)。使用时将小孔筛套在大孔筛的下面,再把筛底盒套在小孔筛的下面,倒入试样、加盖,手工筛动 2 min。

(5) 筛理后将各层筛及底盒中的分离物分别倒在净度分析台上进行分析鉴定,区分出净种子、其他植物种子和杂质,并分别称重。称量精度与试样称重相同。其中,其他植物种子还应分种类计数。

结果计算

(6) 核查各成分的重量之和与样品原来的重量之差是否超过 5%。若增失差值超过原始重量的 5%,则必须重做。净种子百分比(P_1)、其他植物种子百分比(OS_1)和杂质百分比(I_1)的计算:

$$P_1 = \text{净种子重量} / \text{各成分重量之和} \times 100$$

$$OS_1 = \text{其他植物种子重量} / \text{各成分重量之和} \times 100$$

$$I_1 = \text{杂质重量} / \text{各成分重量之和} \times 100$$

(7) 含重型混合物样品的结果计算:

$$P_2(\%) = P_1 \times (M - m) / M$$

$$OS_2(\%) = OS_1 \times (M - m) / M + m_1 / M \times 100$$

$$I_2(\%) = I_1 \times (M - m) / M + m_2 / M \times 100$$

式中, M 为送检样品的重量(g); m 为重型混合物的重量(g); m_1 为重型混合物中的其他植物种子的重量(g); m_2 为重型混合物中杂质的重量(g); P_1 为除去重型混合物后的净种子重量百分比; I_1 为除去重型混合物后的杂质重量百分比; OS_1 为除去重型混合物后的其他植物种子重量百分比; P_2 为含重型混合物的净种子重量百分比; I_2 为含重型混合物的杂质重量百分比; OS_2 为含重型混合物的其他植物种子重量百分比。

百分比的修约

(8) 各种成分的最后结果应保留一位小数。各种成分之和应为 100%, 小于

0.05%的微量成分在计算中应除外。如果其和是99.9%或是100.1%,那么应从最大值(通常是净种子部分)增减0.1%。如果修约值大于0.1%,就应检查计算有无差错。

注意事项

● 种子检验中所谓的“种子”就是种子单位,即通常所见的传播单位。它不仅包括由胚珠发育而来的真种子,也包括由其他器官发育而来的附属成分。净种子定义就是描述不同种的“种子单位”,因此正确理解净种子的含义就显得非常重要。例如水稻属(*Oryza*)的净种子定义为:

“有颖片、内外稃包着颖果的小穗,当芒长超过小花长度时,须将芒去除;

有或无不孕外稃、有内外稃包着颖果的小花,当芒长超过小花长度时,须将芒去除;

有内外稃包着颖果的小花,当芒长超过小花长度时,须将芒去除;

颖果;

超过原来大小一半的破损颖果。”

● 当计算各成分的百分比时,百分比必须根据分析后各种成分重量的总和计算,而不是根据实验样品的原始重量计算。

● 其他植物种子数目的测定可根据送验者的不同要求,采用完全检验、有限检验和简化检验的方法进行。

参考文献

- 国家技术监督局. 1995. GB/T 3543.1~3543.7-1995, 农作物种子检验规程. 北京: 中国标准出版社, 18~33
- 全国农作物种子标准化技术委员会, 全国农业技术推广服务中心. 2000. GB/T 3543.1~3543.7-1995, 《农作物种子检验规程》实施指南. 北京: 中国标准出版社, 24~42
- International Seed Testing Association. 1999. International Rules for Seed Testing. *Seed Sci & Technol*, 27 (Supplement): 19~24

(龙春林 宋松泉)

方案3 种子重量的测定

原 理

种子重量测定是测定1000粒种子的重量(即千粒重),种子千粒重是种子质

量的重要指标之一。千粒重大的种子,通常具有充实、饱满、均匀等优良特性,在田间往往表现出苗率高,幼苗生长健壮,以及作物产量高。此外,千粒重也是衡量种子顽拗性的特征之一。顽拗性种子的千粒重通常大于 500 g,这一特征为初步制定种子的研究和贮藏策略提供了方便。

仪器与试剂

分析天平、称量瓶。

实验步骤

(1) 数取试样。重量测定的试样是从净度分析后的全部净种子中,经均匀混合后分出的一部分。然后,用数粒仪或者手工从净种子中随机数取 3~5 份试样,大粒种子每份试样为 500 粒,中、小粒种子为 1000 粒。

(2) 试样称重。每份试样分别称重 (g),计算平均值和标准差。

(3) 换算成规定水分下的千粒重。当大粒种子用 500 粒测定时,须按平均数 $\times 2$ 换算为千粒重。

在《国际种子检验规程》中将千粒重定义为在气干(自然干燥)状态下 1000 粒种子的重量,以 g 为单位。不同种子批在自然干燥条件下的水分含量不同,特别是在不同地区和不同季节,其种子含水量差异更大。为了便于比较不同水分下的种子千粒重,就必须将实测水分换算成相同的规定水分条件下的千粒重,换算公式如下:

$$\text{千粒重(规定水分)(g)} = \text{实测千粒重(g)} \times [1 - \text{实测水分(\%)}] \\ \div [1 - \text{规定水分(\%)}]$$

参考文献

- 全国农作物种子标准化技术委员会,全国农业技术推广服务中心. 2000. GB/T 3543.1~3543.7-1995,《农作物种子检验规程》实施指南. 北京:中国标准出版社,126~129
- International Seed Testing Association. 1999. International Rules for Seed Testing. *Seed Sci & Technol*, 27 (Supplement): 51~53

(龙春林 宋松泉)

方案 4 种子的结构与幼苗类型

原 理

种子由胚珠发育而成。花生、棉花、油菜、紫云英、柑橘、菜豆、茶和桑的种子,都是由胚珠发育而成的,是真正的种子。水稻、小麦、玉米、高粱、向日葵的籽粒,一般也称作“种子”,实际上都是果实。因为它们的单粒种子包在果皮之内,特别是禾本科作物的果实,其果皮与种皮相互愈合,不易分离。

种子在大小、形状和颜色等方面,因植物的种类不同而有较大的差异。椰子的种子很大,而油菜、萝卜、芝麻的种子较小,烟草的种子则更小;大豆、菜豆的种子为肾形,而棉花、豌豆、龙眼的种子为圆球形。种子的颜色也多种多样,小麦、粟为黄褐色,大豆为黄色、青色或黑色,龙眼和荔枝为红褐色等。虽然种子在形状、大小和颜色等方面存有差异,但其基本结构是一致的,主要由胚、营养贮藏组织和种皮组成。

幼苗的类型也因植物而不同,常见的幼苗主要有两种类型:子叶出土的幼苗和子叶留土的幼苗。

仪器与试剂

培养箱、培养皿、土壤、解剖镜、镊子、解剖刀。

实验步骤

1. 种子的结构

有胚乳种子

这类种子由种皮、胚和胚乳三部分组成。双子叶植物中的蓖麻、番木瓜、烟草、茄、辣椒、桑等植物种子和单子叶植物中的水稻、小麦、玉米、高粱、洋葱等植物的种子,都属于这种类型。

(1) 双子叶植物的有胚乳种子。取一粒新鲜的蓖麻种子观察(图 4-1)。种子呈椭圆形,种皮呈硬壳状,光滑并具有斑纹,种子小头基部具海绵状的突起为种阜,种子腹部中央隆起的条纹为种脊。用解剖镜观察,可见种子腹面种阜内侧有小突起,称为种脐。种孔被种阜掩盖。剥去种皮,其中白色肥厚的部分为胚乳,用刀片