

# 扫描电镜在嵩草种子结构及发芽研究中的应用

张国云<sup>1</sup>, 何晓华<sup>2</sup>, 郭付振<sup>2\*</sup>

(1. 西北农林科技大学, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 植保学院, 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西杨凌 712100)

**摘要** [目的]为了描述西藏7种嵩草(喜马拉雅嵩草、大花嵩草、藏北嵩草、短轴嵩草、线叶嵩草、矮生嵩草、高山嵩草)种子的形态特征, 阐明不同种子预处理方法提高其发芽率的机理。[方法]利用扫描电镜放大倍率大、分辨率高、图像直观等特点, 在嵩草属牧草种子结构及种子萌发研究中引入扫描电镜, 对青藏高原东部嵩草属几种嵩草种子的形态、解剖特征进行了观察, 并且对其形态特征进行初步描述。对7种嵩草种子做了不同浓度的赤霉素、PEG、硫酸、氢氧化钠化学处理, 对其果皮特征进行了电镜观察。结合发芽试验, 对嵩草属牧草种子萌发率低的原因及不同处理影响嵩草属植物种子萌发的机理进行了初步分析。[结果]除喜马拉雅嵩草种子果皮最外层的表皮细胞细胞壁较薄、有裂孔外, 其他都具有种子小、果皮厚、外表致密、保护组织机械性强等特征。不同种子预处理方法对果皮的影响不同。赤霉素、PEG对果皮几乎无机械破坏作用; 硫酸对果皮有一定的破坏作用, 但作用有限; 氢氧化钠对果皮的机械破坏效果最好。[结论]嵩草属牧草种子在试验条件下萌发率与其种子的果皮特征关系密切。嵩草属牧草种子大多果皮坚硬致密、外覆光滑且厚的角质层是其萌发率低的主要原因。一定浓度的氢氧化钠溶液处理种子能均匀去掉果皮角质层, 甚至破坏果皮最外层大型厚壁细胞, 增大细胞间隙, 使得中间纵向致密组织变得疏松, 让水分和氧气易于进入种子, 从而提高发芽率。

**关键词** 扫描电镜; 形态特征; 嵩草属; 萌芽率

中图分类号 S121 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)28-09670-04

## Application of SEM in Research of *Kobresia* Seeds Structures and Germination

ZHANG Guo-yun<sup>1</sup>, HE Xiao-hua<sup>2</sup>, GUO Fu-zhen<sup>2\*</sup> (1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management of Ministry of Education, Entomological Museum, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100)

**Abstract** [Objective] The research aimed to describe morphological characteristics of seven kinds of *K. obresia* (*K. royleana*, *K. macrantha*, *K. choenoides*, *K. prattii*, *K. capillifolia*, *K. humilis* and *K. pygmaea*) seeds from Tibet and elucidate the mechanisms how different treatments promoted germination percentage. [Method] The structures and germination of *Kobresia* pasture seeds were studied with the scanning electron microscope for its characteristics of the high magnification, high resolution, and image visual. Seven kinds of *Kobresia* seeds from Tibet were observed with scanning electron microscope in order to analyze their morphology and anatomy characteristics. Combining the *Kobresia* pasture seed germination tests, the characteristic of seed peels treated with gibberellin, PEG, sulfuric acid and sodium hydroxide was observed, and the relationship between the low germination rate and the mechanisms of different treatments was preliminarily analyzed. [Result] Except for the cell wall of external seed peels of *K. royleana* seed was thin with some cracks, the other seeds were small and covered with thick and pykno peels and their protective tissues were very strong. The effects of different treatments on seeds peels were different. GA and PEG almost had no katogene to the peels, and the effect of the sulphuric acid wasn't that good, and the caustic soda had the best effects. [Conclusion] There was a close relationship between the germination rate and the seed skin under the laboratory conditions. It was pointed out that the main reason of the low germinated rates of *Kobresia* seeds might be that the seed peel was hard, compact, and covered with smooth thick cuticle. With the treatment of certain concentration of sodium hydroxide, the corneous layer of the seeds were abscised uniformly, the sclerenchymatous cells in the outer layers were destroyed, the cell spaces were also increased and even the compact tissues in the middle were loosen, which made the entrance of the water and oxygen into the seeds easily, thereby the germination capacity was improved.

**Key words** Scanning electron microscope; Morphology characteristics; *Kobresia*; Germination percentage

嵩草属(*Kobresia*)植物是组成青藏高原高寒地区植被的主要物种。以该属一些植物为建群种的嵩草草甸是青藏高原主要的植被类型<sup>[1]</sup>。嵩草属牧草是多年生草本植物, 草质柔软, 营养丰富, 为各类家畜所喜食, 是青藏高原主要的优良牧草。其良好生长对发展当地经济、维持青藏高原地区的生态平衡都具有重要作用<sup>[2]</sup>。然而, 由于掠夺式经营、过度放牧、鼠虫危害以及人类活动的干扰等多种原因, 青藏高原草地严重退化, 生产力水平不断下降, 生态环境也日益恶化<sup>[3-7]</sup>。目前, 对于嵩草属(*Kobresia*)植物资源包括嵩草属牧草种子及其繁殖特性等方面的研究日益增多<sup>[8-16]</sup>。针对嵩草属牧草种子小、不易观察等特点, 借助于扫描电镜, 笔者先对采自西藏的几种嵩草种子的形态特征及其解剖特征进行了观察与分析, 然后对这几种嵩草种子做了不同化学试剂

处理, 并且对处理后种子果皮再次进行了电镜观察。结合发芽试验, 初步探讨了不同处理影响嵩草属植物种子萌发的机理, 并且提出了提高嵩草种子发芽率的方法, 以期为西藏地区的草地植被及生态恢复、畜牧业发展提供帮助。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 2006年9月上旬, 在西藏的那曲、当雄和浪卡子3个不同海拔地区采集喜马拉雅嵩草、大花嵩草、藏北嵩草、短轴嵩草、线叶嵩草、矮生嵩草和高山嵩草的种子(表1)作为供试草种。将种子带回实验室, 自然风干后装入纸袋, 室温贮藏。

## 1.2 方法

**1.2.1** 对供试种子形态特征、解剖特征及不同处理后种子种皮特征的电镜观察。取上述供试种子及不同化学试剂处理后种子若干(试剂处理方法见萌发试验), 在解剖镜下选取一些饱满种子, 部分横切和纵切, 装入洗净、贴好标签的青霉素小瓶, 用浓度4%、pH 6.8的戊二醛4℃固定12h; 再用pH 6.8、浓度0.1 mol/L磷酸缓冲液常温漂洗5次、每次15 min;

**作者简介** 张国云(1974-), 男, 甘肃陇西人, 实验师, 硕士, 从事电子显微镜的操作与管理工作。\* 通讯作者, 实验师, 博士, 从事电子显微镜的操作与管理工作。

**收稿日期** 2014-08-25

浓度 30%、50%、70%、80%、90%、95% 丙酮脱水 1 次, 时间 20 min; 浓度 100% 丙酮脱水 3 次, 每次 30 min; 乙酸异戊酯置换 2 次, 每次 20 min; 然后, 用二氧化碳临界点干燥仪干燥; 最后, 粘台, 喷金, 用扫描电镜观察种皮、胚乳及种子纵、横断面结构。

表 1 7 种嵩草种子采集地的地理信息

| 种名     | 采集地点 | 海拔/m  | 北纬        | 东经        |
|--------|------|-------|-----------|-----------|
| 喜马拉雅嵩草 | 浪卡子  | 4 455 | 28°59'11" | 90°26'4"  |
| 大花嵩草   | 浪卡子  | 4 455 | 28°59'11" | 90°26'4"  |
| 藏北嵩草   | 那曲   | 4 456 | 31°26'34" | 92°16'32" |
| 短轴嵩草   | 当雄   | 4 278 | 30°29'35" | 91°5'58"  |
| 线叶嵩草   | 当雄   | 4 278 | 30°29'35" | 91°5'58"  |
| 矮生嵩草   | 当雄   | 4 278 | 30°29'35" | 91°5'58"  |
| 高山嵩草   | 那曲   | 4 456 | 31°26'34" | 92°16'32" |

**1.2.2 萌发试验。**设 4 种试剂处理方式, 即将上述 7 种草种分别用 0.15、0.20、0.25、0.30、0.40 g/L 赤霉素溶液浸种 12、24、36、48 h; 体积分数 15%、20%、25%、30% 聚乙二醇(PEG-6000) 溶液浸种 12、24、36、48 h; 体积分数 49%、98% 硫酸溶液浸种 3、5、10 min; 10、20、30、40 g/L 氢氧化钠溶液浸种 0.5、1.0、2.0、3.0 h。上述处理后的种子都用自来水反复冲洗后置于 4℃ 冰箱中层积 1 个月, 以不经任何预处理的种子为对照, 用 2PW-280B 型智能植物培养箱进行发芽试验。采用培养皿内滤纸上变温发芽, 每天光照 8 h, 温度 35℃, 黑暗 16 h, 温度 25℃。每个草种每个处理取 100 粒种子, 3 次重复。逐日观察, 统计发芽情况, 到第 28 天结束试验, 测定发芽率。

## 2 结果与分析

**2.1 7 种嵩草种子形态结构特征及解剖特征** 结合扫描电镜图像及肉眼观察, 发现 7 种嵩草种子的果皮均可分为 3 层。果皮最外层为大型厚壁细胞, 细胞腔大而明显, 可储存大量气体。表面覆有角质层, 厚且光滑(喜马拉雅嵩草除外, 果皮最外层表皮细胞细胞壁较薄, 有裂孔)。中间一层为纵向的机械组织, 排列紧密。最里层为横向的基本组织。胚位于胚乳之中果柄一侧。不同嵩草种子虽具有以上共性, 但也具有不同的结构特征, 其种子大小和形状也有很大差别。

(1) 喜马拉雅嵩草。果实长梭形, 具有较长的果柄和果喙, 果柄侧保护组织薄且疏松, 厚度仅为 17.4 μm (图 1a, 1c)。果皮粗糙(图 1b), 厚度约 55 μm, 最外层表皮细胞外壁有裂孔。

(2) 大花嵩草。果实宽卵形, 具有较长的果柄和果喙, 基部(果柄)与顶部(果喙)保护组织致密层极厚, 基部厚度约 170 μm (图 1d, 1f)。果皮极光滑、致密(图 1e), 厚度约 58 μm。

(3) 藏北嵩草。果实形似葵花籽, 具较长的果柄和果喙, 果喙侧保护组织厚达 167 μm, 基部(果柄)组织疏松, 厚度 48 μm (图 1g, 1i)。果皮细胞突起、光滑(图 1h), 厚度约 84 μm。

(4) 短轴嵩草。果实长圆形, 果柄 76 μm, 果喙 180 μm, 基部(果柄)组织疏松且薄, 厚度 25 μm (图 1j, 1l)。果皮细胞突起、致密(图 1k), 厚度约 32 μm。

(5) 线叶嵩草。果实卵圆形, 无明显的果柄和果喙, 果柄

侧致密, 保护组织极厚, 约 80 μm, 果喙侧有导气孔(图 1m, 1o)。果皮细胞突起, 极光滑、致密(图 1n)。果皮厚度约 63 μm。

(6) 矮生嵩草。果实侧扁, 形似南瓜子, 果柄侧与果喙侧致密, 保护组织极厚, 基部致密层厚度约 75 μm, 顶部(果喙)有导气孔(图 1p, 1r)。果皮极光滑、致密(图 1q), 厚度约 77 μm。

(7) 高山嵩草。果实近三棱形, 无明显果柄, 果喙 187 μm。果实基部与顶部(果喙)致密, 保护组织极厚, 约 120 μm, 顶部(果喙)有导气孔(图 1s, 1u)。果皮细胞突起, 极光滑、致密(图 1t), 厚度约 88 μm。

**2.2 不同药剂处理对种子表皮的作用(以藏北嵩草为例)** 由图 2、3 可知, 不同药剂处理对嵩草种子果皮的影响不同, 赤霉素、PEG 对果皮几乎没有机械破坏作用。由图 4 可知, 硫酸对果皮有一定的破坏作用, 使得藏北嵩草果皮最外层细胞出现一些横向裂孔; 由图 5 可知, 氢氧化钠对果皮的机械破坏效果较好, 不但去掉嵩草种子角质层, 而且使最外层细胞间隙加大, 甚至使部分最外层大型厚壁细胞脱落。

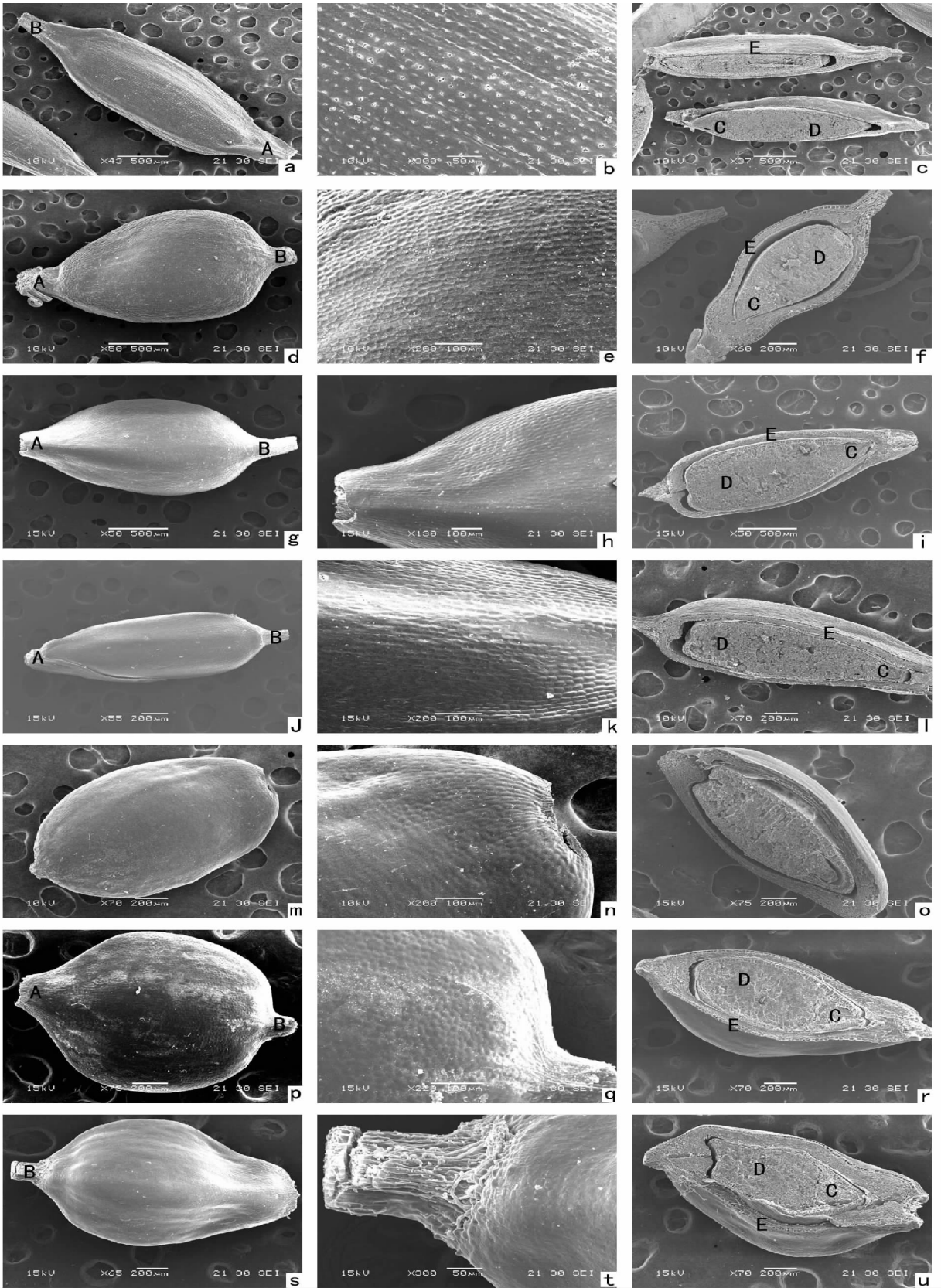
**2.3 7 种嵩草种子的结构特征对比及不同处理的种子发芽率** 由表 2 可知, 各嵩草种子未经任何处理试验条件下发芽率与种子大小、地理位置、海拔高度似无直接关系, 与果皮厚度关系也不大, 但与果皮光滑致密度、发芽口致密层厚度呈 0.05 水平显著负相关。赤霉素、PEG 处理对嵩草种子发芽率没有大的影响, 一定浓度的硫酸和氢氧化钠处理能明显提高发芽率, 其中 40% 氢氧化钠处理效果较好, 使得上述种子的发芽率分别由未经任何预处理的 91%、0、76%、69%、14%、21% 和 0 提高到 96%、90%、93%、96%、74%、63% 和 50%。

## 3 结论与讨论

根据对 7 种嵩草种子的形态和解剖特征以及不同处理后种子种皮特征的观察与分析, 结合发芽试验, 认为嵩草属牧草种子试验条件下萌发率与其种子的果皮特征关系密切。嵩草属牧草种子果皮大多坚硬致密、外覆光滑且厚的角质层是其萌发率低的主要原因。坚硬致密的果皮虽有利于嵩草属种子抵御严寒和外力破坏, 也使得胚和胚乳不易获得足够的水和氧气, 并且阻碍胚根和胚芽穿破保护组织, 限制种子的萌发。

从不同处理种子的电镜照片可以看出, 赤霉素、PEG 对果皮几乎没有机械破坏, 对嵩草属种子的作用可能更多的是药理性的, 而与对果皮的机械破坏无关。硫酸对果皮有一定的破坏作用, 使得果皮最外层细胞破裂, 但对破除角质层无明显作用。氢氧化钠对种皮的机械破坏效果最好。首先是去角质层, 使得果皮更容易吸附水分, 进一步加大细胞间隙, 使细胞间变得疏松, 甚至去掉了果皮最外层的大型厚壁细胞, 使中间纵向致密细胞层也变得疏松, 水分和氧气易于进入种子, 从而提高发芽率。

研究还表明, PEG 处理对上述嵩草种子发芽率没有影响; 赤霉素处理对大花嵩草、藏北嵩草、短轴嵩草、线叶嵩草、矮生嵩草和高山嵩草种子的发芽率有少许提高; 一定浓度的硫酸和氢氧化钠处理均能明显提高发芽率, 但以 40 g/L 氢氧化钠的处理效果最好。



注:A.果柄;B.果喙;C.胚;D.胚乳;E.果皮。a~c.喜马拉雅高草;d~f.大花高草;g~i.藏北高草;j~l.短轴高草;m~o.线叶高草;p~r.矮生高草;s~u.高山高草。

图1 7种蒿草种子的外形、表皮和纵切面电镜图

在该次蒿草属植物资源的研究中,蒿草属种子小、种间难以区分。扫描电镜具有放大倍率大、分辨率高、图像直观

等特点,利用扫描电镜能够较好地对小粒蒿草种子的形态和解剖特征进行观测,并且加以区分。在提高蒿草属种子发芽

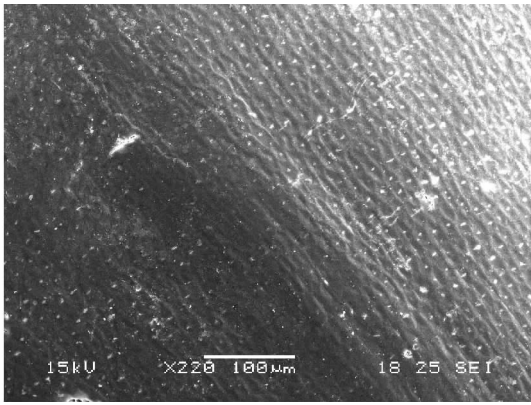


图2 赤霉素处理后的藏北嵩草种子表皮

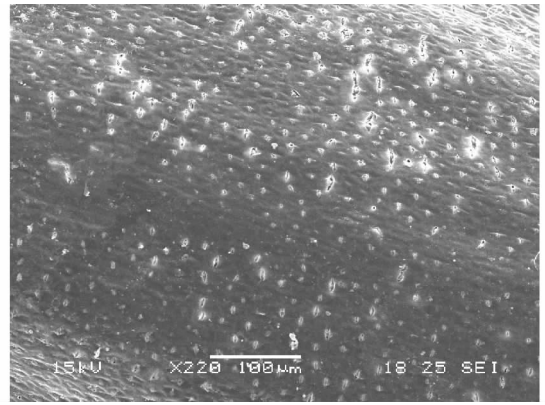


图4 硫酸处理后的藏北嵩草种子表皮

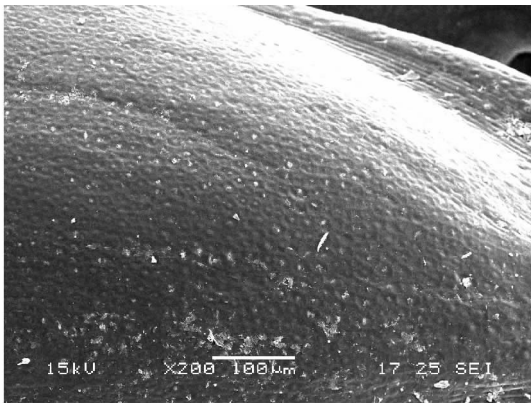


图3 PEG处理后的藏北嵩草种子表皮

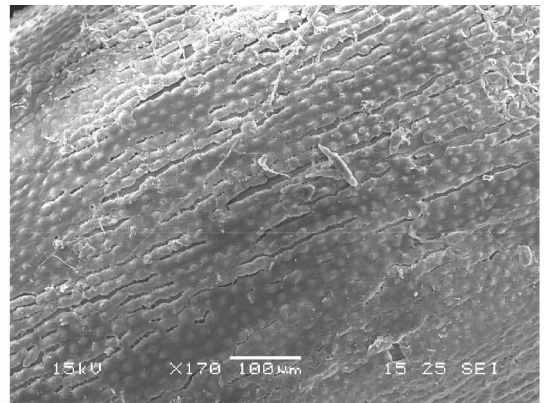


图5 氢氧化钠处理后的藏北嵩草种子表皮

表2 西藏7种嵩草种子结构特征及不同处理发芽率

| 种名     | 种皮厚度<br>µm | 种皮特征  | 发芽口致密层厚度<br>µm | 不同处理的种子发芽率//% |     |     |    |      |
|--------|------------|-------|----------------|---------------|-----|-----|----|------|
|        |            |       |                | 未处理           | 赤霉素 | PEG | 硫酸 | 氢氧化钠 |
| 喜马拉雅嵩草 | 55         | 疏松多孔  | 17.4           | 91            | 91  | 90  | 94 | 96   |
| 大花嵩草   | 58         | 极光滑致密 | 170.0          | 0             | 1   | 0   | 15 | 90   |
| 藏北嵩草   | 84         | 较光滑致密 | 48.0           | 76            | 77  | 76  | 86 | 93   |
| 短轴嵩草   | 32         | 较光滑致密 | 25.0           | 69            | 70  | 69  | 80 | 96   |
| 线叶嵩草   | 63         | 极光滑致密 | 80.0           | 14            | 15  | 14  | 22 | 74   |
| 矮生嵩草   | 77         | 极光滑致密 | 75.0           | 21            | 25  | 22  | 42 | 63   |
| 高山嵩草   | 88         | 极光滑致密 | 122.0          | 0             | 2   | 0   | 10 | 50   |

率的研究中,需要将萌发试验与不同化学试剂处理后对种子种皮的微观形态观测相结合,这样不但有利于找到提高嵩草属种子发芽率的方法,而且有利于阐述其机理。

#### 参考文献

- [1] 张树仁. 西藏嵩草属(莎草科)的修订[J]. 植物分类学报, 2004, 42(3): 194-221.
- [2] 李巧峡, 赵庆芳, 马世荣, 等. 嵩草属植物研究进展[J]. 西北师范大学学报, 2006, 42(6): 78-82.
- [3] 武高林, 杜国祯. 青藏高原退化高寒草地生态系统恢复和可持续发展探讨[J]. 自然杂志, 2007, 29(3): 159-164.
- [4] 赵贵锋, 余成群, 武俊喜. 青藏高原退化高寒草地的恢复与治理研究进展[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(5): 125-129.
- [5] 王建兵, 张德罡, 曹广民, 等. 青藏高原高寒草甸退化演替的分区特征[J]. 草业学报, 2013, 22(2): 1-10.
- [6] 周华坤, 赵新全, 周立, 等. 青藏高原高寒草甸的植被退化与土壤退化特征研究[J]. 草业学报, 2005, 14(3): 31-40.
- [7] 贺有龙, 周华坤, 赵新全, 等. 青藏高原高寒草甸的退化及其恢复[J]. 草业与畜牧, 2008(11): 1-9.

- [8] 褚希彤, 付娟娟, 孙永芳. 不同海拔梯度嵩草种子的萌发机制[J]. 草业科学, 2013, 30(7): 1025-1030.
- [9] 李巧峡, 李凯, 丁文龙, 等. 不同处理对北方嵩草种子萌发的影响[J]. 草业科学, 2009, 26(8): 112-117.
- [10] 马玉玲. 三种嵩草种子萌发技术的探讨试验[J]. 养殖与饲料, 2009(7): 62-63.
- [11] 李希来. 不同地区矮嵩草(*Kobresia humilis*)种子解剖特征和萌发特性的研究[J]. 种子, 2002(6): 12-13.
- [12] 段春华, 张德罡, 张靖, 等. 物理、化学处理方法对矮生嵩草和线叶嵩草种子萌发的影响[J]. 草原与草坪, 2013, 33(1): 40-44.
- [13] 周芝琴, 李廷山, 胡小文. 莎草科4种植物种子休眠与萌发特性的研究[J]. 西北植物学报, 2013, 33(9): 1885-1890.
- [14] 严虎, 苟桂香, 王得贤. 几种预处理对两种贮藏期线叶嵩草萌发的影响[J]. 青海草业, 2000, 9(1): 13-15.
- [15] 苟桂香, 赵得明. 不同处理方法对三种嵩草种子发芽率影响的初探[J]. 青海草业, 2006, 15(2): 21-23.
- [16] 李希来. 非萌发与萌发状态下两种嵩草种子解剖特征的初步研究[J]. 种子, 2003(2): 48-50.