

# 利用低场核磁共振技术检测刺槐种子 吸水过程水分的变化

袁 鸣<sup>1</sup>, 朱铭玮<sup>1</sup>, 侯 静<sup>1</sup>, 朱莹莹<sup>2,3</sup>, 李淑娴<sup>1\*</sup>

(1. 南京林业大学林学院, 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037; 2. 苏州纽迈分析  
仪器股份有限公司, 江苏 苏州 215163; 3. 苏州市职业大学, 江苏 苏州 215104)

**摘要:**【目的】探究种子吸水萌发过程中水分相态的变化, 为种子吸水、萌发研究提供一种新的研究手段。【方法】以初始温度 85 ℃ 热水处理后的刺槐种子为材料, 采用质量法确定种子的吸水曲线, 低场核磁共振技术(L-NMR) 采集刺槐种子吸水、萌发过程中横向弛豫时间( $T_2$ ) 的信号, 并反演得到  $T_2$  弛豫谱, 分析此过程中种子体内水分相态及含量的变化。【结果】热水处理后刺槐种子的吸水率远远高于对照组, 0~12 h 为快速吸水阶段, 之后吸水速度变缓, 至 36 h 时吸水渐趋于平衡。核磁共振波谱图表明, 刺槐种子水分质量( $x$ ) 与核磁共振弛豫图谱峰面积( $y$ ) 呈一元线性回归关系, 其线性回归方程为:  $y = 21\ 132x + 698.05, R^2 = 0.999\ 6$ 。刺槐种子在吸水萌发过程中存在 3 种相态的水: 束缚水( $T_{21}$ , >0.1~1.0 ms)、不易流动水( $T_{22}$ , >1~100 ms)、自由水( $T_{23}$ , >100~1 000 ms)。吸水萌发过程中束缚水的峰顶点变化不显著, 弛豫范围、峰面积总体呈先上升后下降的趋势, 但峰比例总体呈下降趋势, 吸水 24 h 后, 比例维持在 4% 以下, 胚根伸出时, 束缚水消失。在吸水 3~9 h 过程中, 不易流动水的峰显著向右偏移, 随后峰顶点时间趋于稳定(9~96 h); 胚根伸出时, 峰再次显著向右偏移; 弛豫时间范围基本呈不断增大的趋势, 胚根伸出时又显著减小; 其峰面积总体呈先迅速上升(3~12 h) 后保持基本稳定的趋势, 但比例略有下降。自由水峰顶点随时间呈先上升后下降的趋势, 且在吸水 72 h 时达到最大值; 峰面积及比例的最大值出现在胚根伸出时(3 h 时峰面积最大值是最小值的 4.16 倍)。【结论】刺槐种子在吸水萌发过程中存在 3 种相态的水, 其中不易流动水占比最大, 各相态水的含量处于一个动态变化过程; 随吸水时间的延长, 种子内部营养物质开始分解转化, 水分结合能力变弱, 特别是胚根穿过种皮时, 种子代谢活动旺盛, 自由水含量大幅增加。

**关键词:** 刺槐种子; 吸水过程; 低场核磁共振技术; 水分相态

中图分类号: S722.1

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1000-2006(2022)02-0135-08



## Changes of water content in *Robinia pseudoacacia* seeds during imbibition by a low nuclear magnetic resonance

YUAN Ming<sup>1</sup>, ZHU Mingwei<sup>1</sup>, HOU Jing<sup>1</sup>, ZHU Yingying<sup>2,3</sup>, LI Shuxian<sup>1\*</sup>

(1. Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Suzhou Newmine Analytical Instruments Co., Ltd., Suzhou 215163, China; 3. Suzhou Occupation University, Suzhou 215104, China)

**Abstract:** 【Objective】 Water is important for seed germination, and nutrients in seeds require water to undergo physiological and biochemical reactions. This study used a nuclear magnetic resonance technology to explore water absorption of *Robinia pseudoacacia* seeds after hot-water treatments in order to explore changes in water phases during seed imbibition and germination. This study also provides a theoretical basis for water absorption. 【Method】 Seeds of *R. pseudoacacia* were treated with hot water at an initial temperature of 85 ℃. Water absorption was calculated through dividing the increase in weight after soaking by the initial weight. The low nuclear magnetic resonance (L-NMR) was

收稿日期 Received: 2021-03-08

修回日期 Accepted: 2021-06-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31901331); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

第一作者: 袁鸣(1641071953@qq.com)。\* 通信作者: 李淑娴(shuxianli@njfu.com.cn), 教授。

引文格式: 袁鸣, 朱铭玮, 侯静, 等. 利用低场核磁共振技术检测刺槐种子吸水过程水分的变化[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2022, 46(2): 135-142. YUAN M, ZHU M W, HOU J, et al. Changes of water content in *Robinia pseudoacacia* seeds during imbibition by a low nuclear magnetic resonance[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2022, 46(2): 135-142. DOI: 10.12302/j.issn.1000-2006.202103018.

used to collect transverse relaxation time ( $T_2$ ) signals of *R. pseudoacacia* seeds during imbibition, and a  $T_2$  relaxation spectrum was obtained by inversion. Changes in water phases and abundances of each phase in the seeds during water absorption were analyzed. 【Result】The water absorption rate of seeds treated with hot water was markedly higher than that of seeds in the control group; the seeds entered the rapid water absorption stage from 0–12 h, after which their water absorption rate decelerated, and saturation was reached at 36 h. The NMR spectrum showed that the water content ( $x$ ) of *R. pseudoacacia* and the peak area ( $y$ ) had a significant linear relationship, and the linear regression equation was  $y = 21\ 132x + 698.05$ ;  $R^2 = 0.999\ 6$ . There were three phases of water in *R. pseudoacacia* seeds during water-absorbing germination: bound water ( $T_{21}$ ,  $>0.1-1$  ms), immobile water ( $T_{22}$ ,  $>1-100$  ms) and free water ( $T_{23}$ ,  $>100-1\ 000$  ms). During imbibition, the peak time of bound water did not change significantly, and the relaxation range and peak area generally increased first and then decreased. However, the proportion of the peak area decreased. After 24 h of water absorption, the proportion remained below 4%, and the proportion of bound water in the seeds was very small. Bound water disappeared completely when the radicle passed through the seed coat. During 3–9 h of water absorption, the peak time of immobile water shifted significantly to the right, after which the peak time tended to be stable (approximately 9–96 h). When the radicle passed through the seed coat, peak time again shifted significantly to the right. The relaxation range of immobile water showed an increasing trend. However, it decreased significantly when the radicle passed through the seed coat. The peak area increased rapidly at first (approximately 3–12 h) and then remained stable, but the proportion of peak area decreased slightly, especially when the radicle passed through the seed coat. The peak time of free water changed the most. It reached a maximum at 72 h and then decreased significantly. That is, peak time shifted to the right first and then to the left. The relaxation ranges of free water also first showed an increasing trend and then decreased when the radicle passed through the seed coat. The peak area of free water increased rapidly at first (approximately 3–24 h) and then remained stable. When the radicle passed through the seed coat, it reached a maximum, which was 4.16-fold the minimum value (3 h). The proportion of peak area showed an increasing trend, especially when the radicle passed through the seed coat. 【Conclusion】There are three phases of water in *R. pseudoacacia* seeds during imbibition, and the most abundant water phase was immobile water. Each phase of water was in a state of dynamic change during imbibition. With the extension of water absorption, nutrients within the seeds began to decompose and transform, decreasing their ability to bind water. In particular, when the radicle passed through the seed coat, the content of free water increased significantly, and the seeds' metabolism increased markedly.

**Keywords:** *Robinia pseudoacacia* seed; imbibition; low nuclear magnetic resonance(L-NMR); water phase state

刺槐(*Robinia pseudoacacia*) 树体高大, 叶色鲜绿, 可用作庭荫树和行道树, 其根系发达, 适应性强, 也是水土保持和西北干旱地区的主要造林树种; 其花呈白色或红色, 可以直接食用, 花蜜营养价值较高, 还是北方重要的蜜源植物<sup>[1]</sup>。刺槐通常以种子繁殖, 但因种皮存在硬实现象, 透水性差, 常常导致播种后发芽率低、发芽周期长、出苗不整齐等现象<sup>[2]</sup>, 这给育苗生产带来了一定困难。水分是种子萌发的必要条件, 干燥的种子必须吸收大量水分才能萌发。研究种子吸水量常采用质量法, 但该方法不能深入研究种子吸水过程中水分相态变化及各相态水的含量变化。

低场核磁共振(low nuclear magnetic resonance, L-NMR) 可以动态检测脉冲 CPMG(carrurcell-meiboom-gill) 序列信号, 得到样品自旋-自旋弛豫时间(即横向弛豫时间  $T_2$ )<sup>[3-5]</sup>。由于被测样品内水分流动性的差异, 使得  $T_2$  谱呈现出多组分特征, 不同  $T_2$  弛豫时间范围内的水分代表不同

相态的水分<sup>[6]</sup>, 因此利用  $T_2$  弛豫时间及其信号值的差异可以有效探测样品内水分相态及其含量的变化。有学者尝试着将 NMR 技术应用于种子吸水研究, 如李然等<sup>[7]</sup> 利用 NMR 技术对绿豆(*Vigna radiata*) 种子吸水过程进行了分析, 发现绿豆种子吸水过程中存在 3 种状态水, 即毛细管水(capillary water)  $T_{21}$ 、自由水(free water)  $T_{22}$  及束缚水(bound water)  $T_{23}$ ; 宋平等<sup>[8]</sup> 利用 NMR 技术研究了玉米(*Zea mays*) 种子萌发过程中水分相态的变化, 也得到类似结果。另外, 牟红梅等<sup>[9]</sup> 利用 NMR 技术对冬小麦(*Triticum aestivum*) 灌浆过程中水分的变化规律进行了监测; 汪楠等<sup>[10]</sup> 也利用该技术对稻谷(*Oryza sativa*) 干燥特性与水分迁移的关系进行了研究。NMR 技术在农业领域应用广泛, 但目前对林木种子, 如刺槐种子吸水过程中水分变化的研究鲜见报道。笔者拟采用核磁共振技术对刺槐种子吸水萌发过程进行研究, 利用  $T_2$  弛豫时间的差异来区分种子内部水分的相态, 根据  $T_2$  反演谱信号

幅值的差异分析种子内部各水分相态含量的变化规律,拟为揭示刺槐种子的吸水特性提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2019年9月下旬于山东烟台采集试验所用的刺槐种子,采回后先剔除刺槐种子中的夹杂物、虫害粒以及受损粒,再采用水选法去除空粒、瘪粒,剩余饱满种子阴干后置于4℃冰箱中待用(处理后种子的发芽率为95%)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 刺槐种子吸水率测定

随机取一定数量的刺槐种子,用初始温度为85℃的热水浸种5 min后,从中随机抽取解除硬实性的种子30粒,重复3次,用吸水纸擦拭种子表面水分后称取其质量( $m_1$ )。将抽取的种子置于烧杯中进行浸种,待吸水3、6、9、12、24、36……108 h时分别取出种子,擦拭种子表面水分后再次称其质量( $m_2$ ),再将称量后的种子放回原有烧杯中使其继续吸水,重复上述操作过程,直至种子质量达到稳定。对照为干种子直接置于装有清水的烧杯中浸种。按式(1)计算种子的吸水率并绘制吸水曲线。

$$\text{吸水率} = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中: $m_1$ 为浸种前的种子质量,g; $m_2$ 为浸种后各时间点的种子质量,g。

#### 1.2.2 种子吸水过程中水分相态含量的测定

按照种子吸水率测定的方法处理种子,随机选取解除硬实性的种子30粒(3个重复),用吸水纸擦拭种子表面水平后称取其质量,将种子置于烧杯中进行浸种,吸水3 h时,取出种子,放入玻璃试管,在低场核磁共振仪中进行检测。测定时,采用CPMG脉冲序列,并利用SIRT(联合迭代重建技术)算法反演操作,得到 $T_2$ 弛豫图谱。CPMG脉冲序列的主要参数有:主频(SF)为23 MHz,偏移频率( $O_1$ )为401 279.79 Hz,90°脉冲射频脉宽( $P_1$ )为12  $\mu$ s,180°脉冲射频脉宽( $P_2$ )为23.04  $\mu$ s,信号采样点数(TD)为720 016,重复采样等待时间(TW)为4 000 ms,重复采样次数(NS)为32,回波时间(TE)为0.3 ms,回波个数(NECH)为12 000。测定后立刻将种子放入清水中继续浸种,分别在6、9、12、24、36 h时取出种子,置于玻璃试管中,重复之前的操作。36 h后将种子置于湿石英砂中培养,分别在48、60、72、96 h及胚根伸出时取出种

子,重复之前的操作。

#### 1.2.3 $T_2$ 弛豫谱峰面积与刺槐种子含水量关系的构建

NMR的 $T_2$ 弛豫谱总峰面积与样品中氢质子的数量成正比,故 $T_2$ 弛豫谱总峰面积反映了种子中水分含量的多少。参照宋平等<sup>[11]</sup>的方法将传统的质量信号换作核磁信号量,再通过回归分析,构建 $T_2$ 弛豫谱总峰面积与种子含水量的回归方程,并通过 $R^2$ 检验对回归方程的拟合效果进行校验。

### 1.3 数据分析

用Excel对试验数据进行图标处理,采用SAS 6.0和SPSS 22.0统计软件对测定指标进行相关分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 刺槐种子的吸水曲线

刺槐种子的吸水曲线见图1。热水处理后种子的吸水率与对照组间差异显著( $P < 0.05$ ),在不同的吸水阶段,对照组种子的吸水率均低于热水处理的种子。热水处理后的种子,在0~12 h呈快速吸水阶段,之后种子的吸水速度变缓,至36 h时吸水渐趋于平衡,吸水率为122.31%,而此时对照种子的吸水率仅为6.16%;吸水至72 h时,热水处理的种子吸水率达123.75%,此时对照种子的吸水率为9.17%;吸水至96 h时,对照种子吸水率为9.36%,而热水处理的种子吸水率达125.01%,为对照的13.36倍。由此可见,种皮透水性差是限制刺槐种子吸水的主要原因。

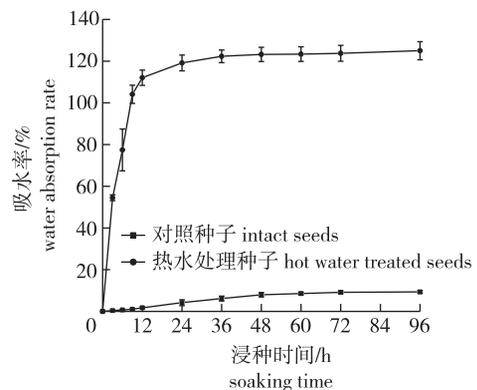


图1 刺槐种子的吸水曲线

Fig.1 The water absorption curve of *Robinia pseudoacacia* seeds during their imbibition

### 2.2 吸水萌发过程中弛豫时间( $T_2$ )与水分相态的划分

弛豫时间( $T_2$ )反映了样品中水分的自由度,

也就是说  $T_2$  图谱的变化能反映水分的流动性, 所以根据  $T_2$  弛豫谱中的波峰位置可以辨别组织中水分流动性的差异, 从而区分不同的水分相态<sup>[12-14]</sup>。本研究中, 刺槐种子吸水至萌发过程中的  $T_2$  反演谱有 3 个明显的波峰(图 2), 即存在 3 种不同相态的水。各峰结束时间  $T_{2i}$  表示样品中第  $i$  种水分的横向弛豫时间, 纵坐标为信号幅值, 用  $A_{2i}$  表示第  $i$  种水分信号的强度。 $T_2$  主要变化范围是 0.1~1 000 ms, 从左向右各峰值所在区间  $T_2$  弛豫时间分别为  $T_{21}$ 、 $T_{22}$ 、 $T_{23}$ 。弛豫时间最短( $T_{21}$ , >0.1~1 ms)的为束缚水(bound water), 该状态的水与生物大分子紧密结合, 流动性差, 其信号幅值为  $A_{21}$ ; 弛豫时间较长( $T_{22}$ , >1~100 ms)的为不易流动水(immobile water), 该种水分的流动性略高于束缚水, 但仍受一定的制约, 其信号幅值为  $A_{22}$ ; 弛豫时间最长( $T_{23}$ , >100~1 000 ms)的为自由水(free water), 该状态的水以游离形式存在, 可以在细胞内自由流动, 不会被植物细胞内胶体颗粒或大分子所吸附, 是良好的溶剂并参与物质代谢, 其信号幅值为  $A_{23}$ 。0 h 时刺槐种子的  $T_2$  反演图谱只有两个峰, 第 1 个峰的弛豫范围为 0.14~10.67 ms, 水的流动性较弱, 第 2 个峰的弛豫范围为 11.44~529.48 ms, 水的流动性较强。由于此时对应峰的弛豫范围与其他阶段完全不相同, 因此没有将 0 h 时的结果与其他吸水阶段进行比较。

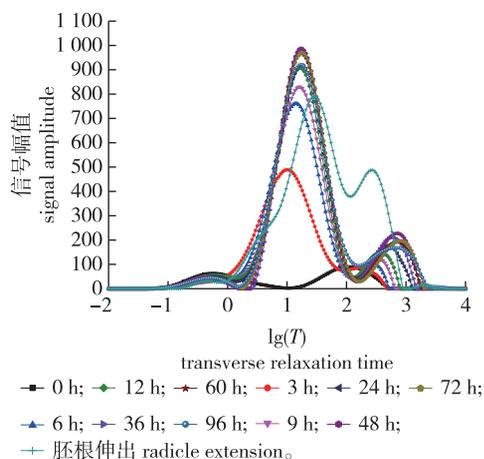
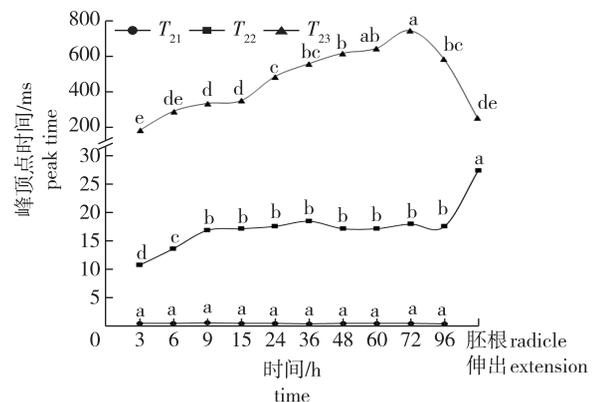


图 2 刺槐种子吸水萌发过程中的  $T_2$  反演图谱

Fig.2 Spectra inversion of transverse relaxation time ( $T_2$ ) of *Robinia pseudoacacia* seeds during their imbibition

刺槐种子吸水萌发过程中各相态水分峰顶点时间的动态变化见图 3。在吸水过程中, 束缚水  $T_{21}$  的峰顶点时间差异均不显著, 但至胚根伸出时,

束缚水消失。在吸水 3~9 h 过程中, 不易流动水  $T_{22}$  的峰顶点时间呈增加趋势, 即峰顶点向右偏移, 并且各测定结果间差异显著; 随后峰顶点时间趋于稳定(9~96 h)并维持在 17 ms 左右; 当胚根伸出时, 峰顶点时间显著延长至 27.43 ms, 再次向右偏移。而在吸水萌发过程中, 自由水  $T_{23}$  峰顶点时间的变化幅度较大, 与另外两个峰的变化规律也不一致, 总的来说呈先上升后下降的变化趋势: 72 h 前, 峰顶点时间显著延长, 即峰顶点显著向右偏移, 在 72 h 时, 峰顶点时间达到最大值 741.13 ms, 说明这一阶段, 水分的自由度变高, 流动性增强; 72 h 后, 峰顶点显著下降, 当胚根伸长时显著降低至 252.96 ms, 水分的流动性明显减弱。



不同小写字母表示同一水分相态峰顶点时间差异显著 ( $P < 0.05$ )。Different lowercase letters indicate the significant difference among peak times of the same water phase ( $P < 0.05$ )。

图 3 刺槐种子吸水萌发过程中各相态水分峰顶点时间的变化

Fig.3 Changes of peak time of each water phase of *Robinia pseudoacacia* seeds during their imbibition

刺槐种子吸水萌发过程中各相态水分的峰起始点、结束点的  $T_2$  反演谱结果见表 1。在种子吸水萌发的 3~96 h 过程中, 束缚水  $T_{21}$  峰起始点均差异不显著, 峰结束点、弛豫范围呈先增加(3~60 h)再下降(60~96 h)的变化趋势; 当胚根伸出时, 种子内部束缚水消失, 水分自由度变高。测定过程中, 不易流动水  $T_{22}$  的峰起始点时间也是呈先增加(3~36 h)再下降(36 h 以后)的变化趋势, 且在胚根伸出时峰起始点时间最低, 由最高时的 2.00 ms 显著下降到 0.57 ms。在吸水过程中, 峰结束点呈相同的变化趋势, 但变化幅度更大些, 特别是吸水 6 h 时, 由 3 h 时的 95.63 ms 迅速增加到 139.49 ms, 增加了 45.86%, 随后(6~96 h)各测定值的结果呈波动增加趋势, 峰结束点的最大值出现在吸水 96 h 时, 明显迟于起始点最大值出现的时间(36 h)。在

吸水过程中,弛豫范围呈波动变化,其最大值同样出现在吸水 96 h 时,比 3 h 时的增加了 63.58 ms,增幅 67.24%;在胚根伸出后  $T_{22}$  变化范围又显著减小。自由水  $T_{23}$  的起始点、结束点、弛豫范围也是呈波动变化的趋势,并且也是在吸水 96 h 时各测定结果最大,在胚根伸出后又再次显著减小。由此可

见,在种子吸水过程中,束缚水的变化范围较小,不易流动水和自由水的弛豫范围基本呈不断增大趋势,说明氢质子自由度逐渐升高,水分的结合能力变弱,能更好地参与物质代谢;当胚根伸出后,不易流动水和自由水的弛豫时间范围又显著变小。

表 1 刺槐种子吸水萌发过程中的  $T_2$  反演结果

Table 1  $T_2$  inversion of *Robinia pseudoacacia* seeds during its imbibition

单位:ms

时间/h time	$T_{21}$			$T_{22}$			$T_{23}$		
	峰起始点 onset time of peak	峰结束点 end time of peak	弛豫范围 relaxation range	峰起始点 onset time of peak	峰结束点 end time of peak	弛豫范围 relaxation range	峰起始点 onset time of peak	峰结束点 end time of peak	弛豫范围 relaxation range
3	0.01±0.00 a	1.05±0.02 c	1.04±0.04 c	1.08±0.04 de	95.63±6.63 d	94.55±6.67 c	102.51±7.11 d	542.46±37.64 f	439.95±30.53 f
6	0.01±0.00 a	1.22±0.10 bc	1.20±0.10 bc	1.28±0.09 cd	139.49±23.29 abc	138.20±23.21 ab	149.51±24.97 abc	541.59±0.00 f	392.07±24.97 f
9	0.01±0.00 a	1.30±0.16 abc	1.28±0.16 abc	1.39±0.17 bcd	123.22±4.88 c	121.83±5.05 b	132.08±5.23 c	716.09±49.68 ef	584.01±49.85 ef
12	0.01±0.00 a	1.52±0.16 ab	1.51±0.16 ab	1.63±0.18 abcd	126.24±8.76 bc	124.61±8.88 b	135.32±9.39 bc	803.07±31.81 ef	667.75±24.26 ef
24	0.01±0.00 a	1.54±0.36 ab	1.53±0.36 ab	1.65±0.39 abcd	138.55±10.84 abc	136.90±11.22 ab	148.52±11.62 abc	1 194.04±128.51 cd	1 045.53±120.18 cd
36	0.01±0.00 a	1.68±0.29 ab	1.67±0.29 ab	2.00±0.55 a	145.04±10.06 abc	143.04±10.32 ab	155.47±10.79 abc	1 403.90±146.20 bc	1 248.43±139.78 bc
48	0.01±0.00 a	1.68±0.29 ab	1.67±0.29 ab	1.99±0.44 ab	145.49±16.85 abc	143.50±17.08 ab	155.95±18.06 abc	1 581.01±220.73 ab	1 425.06±203.38 ab
60	0.01±0.00 a	1.72±0.30 a	1.71±0.30 a	1.80±0.27 abc	148.51±11.62 ab	146.71±11.76 ab	159.19±12.45 ab	1 662.67±290.38 ab	1 503.48±278.24 ab
72	0.01±0.00 a	1.53±0.42 ab	1.51±0.41 ab	1.63±0.48 abcd	159.19±12.45 a	157.56±12.63 a	170.64±13.35 a	1 827.49±342.97 a	1 656.85±329.62 a
96	0.01±0.00 a	1.24±0.21 bc	1.23±0.21 bc	1.33±0.22 cd	159.46±17.16 a	158.13±17.21 a	170.92±18.40 a	1 917.07±397.13 a	1 746.15±393.01 a
胚根伸出 radicle extension	—	—	—	0.57±0.29 e	126.34±8.76 bc	125.78±9.04 b	135.43±9.39 bc	943.79±0.00 de	808.36±9.39 de

注:数值为 mean±SD, 同列数据后不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。下同。The value is mean±SD, the different letters in the same column indicated the significant difference ( $P<0.05$ ). The same below.

### 2.3 核磁共振 $T_2$ 弛豫谱峰面积与刺槐种子含水量的关系

刺槐种子核磁共振  $T_2$  弛豫谱峰面积与含水量的拟合曲线见图 4。由图 4 可知,在显著水平  $\alpha = 0.05$  进行回归分析,发现刺槐种子含水量与峰面积之间具有明显的线性关系,其线性回归方程为  $y = 21\ 132x + 698.05$ ,其中, $y$  为核磁共振  $T_2$  弛豫

谱峰面积, $x$  为样品的含水量。回归方程中相关系数  $R^2 = 0.999\ 6$ ,说明方程拟合程度较好,刺槐种子核磁共振  $T_2$  弛豫谱峰面积与样品含水量具有较好的相关性。

### 2.4 吸水萌发过程中各峰面积及其比例的动态变化

刺槐种子吸水萌发过程中各峰面积及比例变化见表 2。 $T_{21}$ 、 $T_{22}$ 、 $T_{23}$  所对应的峰面积分别为  $S_{21}$ 、 $S_{22}$ 、 $S_{23}$ , $S$  为 3 个峰面积的总和,即该时间段种子内部各相态水含量的总和。由表 2 可知,吸水萌发过程中总峰面积呈先迅速上升后保持基本稳定的“S”形变化趋势。吸水至 12 h 时,总峰面积迅速由 3 h 时的 18 681. 86 显著增加至 32 840.98,增加了 75.79%;随后各测定时间段的总峰面积差异不显著,这与图 1 吸水曲线的变化趋势相同。在吸水过程中,各相态水峰面积的变化趋势不尽相同:束缚水的峰面积总体呈先上升(3~12 h)再下降(12~96 h)的趋势,峰面积的最大值(吸水 12 h)较最小值(吸水 3 h)时增加了 54.82%;与束缚水的变化规律不同,不易流动水的峰面积总体呈先迅速上升(3~12 h)后保持基本稳定的趋势,其最大值(吸水 60 h)较最小值(吸水 3 h)时增加了 72.42%,大于

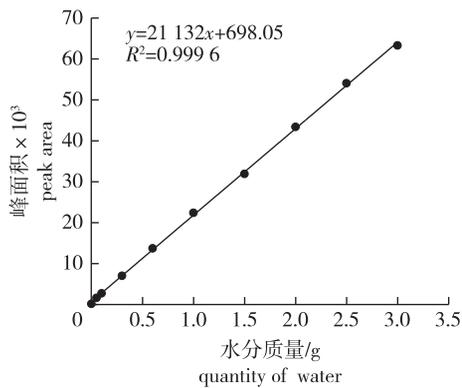


图 4 刺槐种子核磁共振  $T_2$  弛豫谱峰面积与含水量之间的回归关系

Fig.4 The regressive relationship between NMR peak area of  $T_2$  relaxation spectrum and moisture content of the *Robinia pseudoacacia* seeds

束缚水的变化幅度;自由水峰面积的变化趋势与不易流动水的相似,但峰面积的最大值出现在胚根伸出时,是最小值(吸水3 h)时的4.16倍,变化幅度远大于束缚水和不易流动水。

在刺槐种子吸水萌发过程中,各相态水的比例也是在动态变化中。总的来说,此过程中束缚水的比例呈下降趋势,特别是在吸水24 h以后,其比例维持在4%以下,在种子中水分的占比极小。随着吸水时间的延长,不易流动水的比例略呈下降的趋势,特别是胚根伸出时,峰比例进一步下降至最低

值75.89%。尽管如此,此过程中,各测定时间点均是不易流动水的占比最大,远大于自由水和束缚水的比例。随着吸水时间的延长,自由水的比例呈增加的趋势,吸水3~12 h期间,自由水的比例维持在10%以下;吸水24~96 h过程中,自由水含量有所增加,维持在15%以下;胚根伸出时,自由水占比再次增加到23.02%。由此可见,吸水萌发过程中,束缚水、不易流动水的比例在下降,自由水的比例在上升,因此吸水萌发过程中水的流动性不断增强。

表2 刺槐种子吸水萌发过程中各峰面积的动态变化

Table 2 The dynamic changes of each peak areas of *Robinia pseudoacacia* seeds during its imbibition

时间/h time	$S_{21}$		$S_{22}$		$S_{23}$		$S$
	峰面积 peak area	比例/% ratio	峰面积 peak area	比例/% ratio	峰面积 peak area	比例/% ratio	峰面积 peak area
3	861.69±105.99 d	4.61	16 349.21±1 083.31 c	87.51	1 470.96±41.45 e	7.87	18 681.86±1 053.72 d
6	952.16±132.63 cd	3.80	22 461.53±2 293.74 b	89.71	1 624.53±134.87 e	6.49	25 038.62±2 026.80 c
9	1 293.73±118.32 a	4.53	24 873.76±943.72 ab	87.11	2 387.94±495.31 de	8.36	28 555.42±780.76 bc
12	1 334.04±157.70 a	4.33	26 275.68±1 325.16 a	85.36	2 939.70±1 017.13 cde	9.55	30 782.72±1 167.48 ab
24	1 200.02±120.33 ab	3.65	27 380.22±922.10 a	83.37	4 254.50±643.03 bc	12.95	32 840.98±311.77 ab
36	1 168.66±131.36 abc	3.55	27 096.3±1 349.5 a	82.34	4 625.10±519.72 bc	14.06	32 907.15±982.71 ab
48	1 068.30±82.43 bed	3.18	27 654.84±1 402.58 a	82.26	4 873.63±616.09 b	14.50	33 620.18±1 778.84 a
60	1 036.98±103.76 bed	3.06	28 189.32±1 297.87 a	83.17	4 631.83±598.11 bc	13.67	33 893.59±1 219.24 a
72	970.96±174.74 cd	2.91	27 908.34±1 813.70 ab	83.66	4 448.20±439.62 bc	13.33	33 361.17±2 248.72 a
96	1 003.98±76.92 bed	3.09	27 388.75±1 961.44 a	84.38	4 029.01±1 027.21 bcd	12.41	32 460.58±2 950.07 ab
胚根伸出 radicle extension	—	—	25 008.49±3 307.46 ab	75.89	7 585.00±2 528.27 a	23.02	32 951.90±6 099.44 ab

### 3 讨论

#### 3.1 刺槐种子的吸水特性

硬实现象在植物界中,特别是豆科植物中普遍存在,是种子在脱水过程中,随种皮结构不断发育而形成的。多数硬实性种子的种皮非常坚硬,在限制水分渗入的同时也会限制气体交换,从而影响种子的顺利萌发<sup>[15]</sup>。陈丽等<sup>[16]</sup>在研究合欢(*Albizia julibrissin*)种皮结构对其吸水特性的影响中发现,种皮的不透水性严重影响了合欢种子的吸水萌发,热水处理能有效解除其硬实性,大大提升种皮的透性;方芳等<sup>[2]</sup>认为刺槐种子是典型的硬实性种子,种皮对种子的吸水具有明显的力学阻碍作用,热水处理能有效提高种子的发芽率。本研究结果再次说明种皮透水性差是阻碍刺槐种子吸水的主要原因,采用85℃热水处理后的种子吸水率明显提高,这与白刺花(*Sophora davidii*)<sup>[17]</sup>、决明(*Senna tora* var. *obtusifolia*)<sup>[18]</sup>等植物种子的研究结果类似。

#### 3.2 刺槐种子吸水萌发过程中弛豫时间( $T_2$ )与水分相态的变化

水分是细胞内部新陈代谢的重要介质,也是种子萌发过程中营养物质转化和运输必不可少的条件。NMR技术可通过测定样品中氢质子密度与分布来反映水分不同的相态,从而在微观层面揭示样品中水分变化规律<sup>[19]</sup>。宋平等<sup>[20]</sup>通过横向弛豫时间 $T_2$ 的差异将水稻(*Oryza sativa*)种子中的水分区分为内层水(internal water)( $T_{21}$ ,0.01~0.5 ms)、中层水(intermediate water)( $T_{22}$ ,0.5~8 ms)和外层水(external water)( $T_{23}$ ,8~80 ms);新鲜采收的成熟香樟(*Cinnamomum camphora*)种子中也含有3种状态的水分,按照弛豫时间的长短可分为束缚水( $T_{21}$ ,1.32 ms)、不易流动水( $T_{22}$ ,12.33 ms)和自由水( $T_{23}$ ,114.98 ms)<sup>[21]</sup>。本研究利用核磁共振技术测定了刺槐种子的横向弛豫时间 $T_2$ 及信号幅值 $A$ ,发现种子在吸水萌发过程中同样存在3种相态的水:束缚水( $T_{21}$ ,0.1~1 ms)、不易流动水( $T_{22}$ ,1~

100 ms)、自由水( $T_{23}$ , 100~1 000 ms)。虽然上述植物种子中都含有 3 种相态的水,但是不同种子内含有的物质如蛋白质、脂肪等中的氢质子所处的化学环境以及所受的束缚力不同,所以各相态水分的弛豫时间也不尽相同。在 0 h 时,刺槐种子内只有 2 个峰,这可能是由于刚经过热水处理后的种子只是种皮开始软化,但内部环境没有发生明显变化,细胞也未开始活化,此时种子内水分结构与其他测定时间段不同。

本研究发现刺槐种子吸水过程中束缚水的弛豫范围明显右移,其弛豫范围的最大值为 1.71 ms (72 h),而最小值即 3 h 时仅为 1.04 ms;不易流动水和自由水的弛豫时间范围也基本呈不断增大的趋势,即峰明显向右偏移,造成峰右移的可能是由于随着种子的不断吸水,营养物质的浓度降低,导致水分结合能力逐渐变弱。花生(*Arachis hypogaea*)<sup>[22]</sup>、玉米种子<sup>[23]</sup>萌发过程中自由水的变化趋势与刺槐种子相似,但花生种子吸水过程中束缚水的弛豫时间变化不大,这与刺槐种子不同,付晓记等<sup>[22]</sup>认为这主要是由于浸种期间花生种子中的有机物变化不大,致使与之结合水分的数量整体上也相对稳定。此外,当刺槐种子胚根伸出时,束缚水完全消失,不易流动水、自由水这两个峰却明显向左偏移,水分的流动性好像又有所变弱,具体原因有待进一步研究。

### 3.3 刺槐种子吸水萌发过程中各相态水分含量的动态变化

吸水萌发过程中种子内各相态水分的含量是一个动态变化过程。刺槐种子吸水萌发过程中,束缚水峰面积总体呈先上升再下降的趋势,不易流动水、自由水的峰面积先增加而后保持基本不变,说明随着种子内部营养物质的分解以及转化等活动的进行,束缚水与物质的结合程度不再那样牢固,而不易流动水、自由水的流动性变高。胚根穿过种皮时,自由水峰面积较上一阶段显著增加近 1 倍,这主要是因为自由水是细胞间自由流动的水,负责把营养物质运送到各个细胞,其含量制约着细胞的代谢强度,自由水含量越高表明生物的代谢越旺盛。玉米种子在萌发过程中束缚水、不易流动水的变化与刺槐种子类似,但其自由水的含量却先减少后增加,因此不同植物种子各相态水含量的变化规律并不完全相同<sup>[8]</sup>。另外,大多数植物种子吸水过程中自由水含量较多,如花生种子<sup>[22]</sup>;而宋平等<sup>[8]</sup>在研究玉米种子萌发过程中水分流动规律时则发现,束缚水含量高于其他两种相态水分,但刺

槐种子却是不易流动水含量占比远超过束缚水和自由水的总和。本研究还发现,刺槐种子吸水萌发过程中,束缚水不仅峰面积在下降,其峰比例总体也呈现下降趋势,而 Garnczarska 等<sup>[23]</sup>则发现羽扇豆(*Lupinus angustifolius*)种子吸水过程中束缚水比例却迅速增大。刺槐种子内不易流动水的峰比例呈下降趋势,自由水的比例则一直呈增加趋势,虽然自由水的占比不是特别高,但占总含水量的比例却显著增大。综上所述,不同植物种子内的主要水分相态、各相态水分含量的变化规律并不相同,上述差异与营养物质的种类、种子萌发速度的关系还有待进一步研究。

## 4 结 论

1) 刺槐种子吸水曲线表明,85 °C 热水处理的刺槐种子吸水率远远高于对照组种子,0~12 h 为快速吸水阶段,随后吸水速率变缓,至 36 h 时吸水趋于平衡。

2) 回归分析发现,刺槐种子水分质量( $x$ )与核磁共振弛豫图谱峰面积( $y$ )呈显著一元线性回归关系,其线性回归方程为: $y = 21\ 132x + 698.05$ ,相关系数  $R^2 = 0.999\ 6$ 。

3) 利用弛豫时间( $T_2$ )的差异可区分种子内部水分的相态,吸水过程中刺槐种子主要存在 3 种相态的水,即束缚水、不易流动水、自由水。

4) 通过  $T_2$  反演结果发现,种子吸水过程中,束缚水的峰顶点、起始点变化不明显,峰结束点、弛豫范围呈先增加再下降的变化趋势,胚根伸出时,种子内部束缚水消失。此过程中,不易流动水的峰顶点时间先增加后趋于稳定,胚根伸出时,峰顶点时间再次增加;弛豫时间范围基本呈不断增大的趋势。自由水的峰顶点先上升后下降,吸水 72 h 时,峰顶点时间达到最大值;弛豫范围呈增大趋势,但在胚根伸出时,范围减小。

5) 通过分析吸水过程中刺槐种子各相态水的峰面积及比例变化发现:束缚水峰面积呈先上升再下降的趋势,但峰比例总体呈下降趋势;不易流动水的峰面积呈先上升随后保持稳定趋势,峰比例略呈下降趋势;自由水的峰面积不断上升,且在胚根伸出时,增幅近 1 倍,峰比例也呈上升趋势。

### 参考文献 (reference):

- [1] 曹笑皇,季志平,贺亮,等.不同坡向刺槐林对蜂蜜产量的影响[J].西北林学院学报,2006,21(6):174-176. CAO X H, JI Z P, HE L, et al. Impact of aspect on the locust honey yields[J]. J Northwest For Univ, 2006, 21(6): 174-176. DOI: 10.3969/j.issn.

- 1001-7461.2006.06.044.
- [2] 方芳,彭祚登,郭志民,等.刺槐种子硬实特性及萌发促进的研究[J].中南林业科技大学学报,2013,33(7):72-76.FANG F, PENG Z D, GUO Z M, et al. Study on seed hardness characteristic and germination promoting of *Robinia pseudoacacia* seeds[J]. J Central South Univ For Technol, 2013, 33(7): 72-76. DOI: 10.14067/j.cnki.1673-923x.2013.07.016.
- [3] 邵小龙,李云飞.用低场核磁研究烫漂对甜玉米水分分布和状态影响[J].农业工程学报,2009,25(10):302-306.SHAO X L, LI Y F. Effects of blanching on water distribution and water status in sweet corn investigated by using MRI and NMR[J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2009, 25(10): 302-306. DOI: 10.3969/j.issn.1002-6819.2009.10.054.
- [4] 张绪坤,祝树森,黄俭花,等.用低场核磁分析胡萝卜切片干燥过程的内部水分变化[J].农业工程学报,2012,28(22):282-287.ZHANG X K, ZHU S S, HUANG J H, et al. Analysis on internal moisture changes of carrot slices during drying process using low-field NMR[J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2012, 28(22): 282-287. DOI: 10.3969/j.issn.1002-6819.2012.22.039.
- [5] 要世瑾,牟红梅,杜光源,等.小麦种子吸胀萌发过程的核磁共振检测研究[J].农业机械学报,2015,46(11):266-274.YAO S J, MOU H M, DU G Y, et al. Water imbibition and germination of wheat seed with nuclear magnetic resonance[J]. Trans Chin Soc Agric Mach, 2015, 46(11): 266-274. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2015.11.036.
- [6] 范明辉,范崇东,王森.利用脉冲 NMR 研究食品体系中的水分性质[J].食品与机械,2004,20(2):45-48.FAN M H, FAN C D, WANG M. Pulse NMR study of water in food system[J]. Food Mach, 2004, 20(2): 45-48. DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2004.02.024.
- [7] 李然,李振川,陈珊珊,等.应用低场核磁共振研究绿豆浸泡过程[J].食品科学,2009,30(15):137-141.LI R, LI Z C, CHEN S S, et al. Study of water absorption of mung beans based on low-field nuclear magnetic resonance technology[J]. Food Sci, 2009, 30(15): 137-141. DOI: 10.3321/j.issn.1002-6630.2009.15.031.
- [8] 宋平,彭宇飞,王桂红,等.玉米种子萌发过程内部水分流动规律的低场核磁共振检测[J].农业工程学报,2018,34(10):274-281.SONG P, PENG Y F, WANG G H, et al. Detection of internal water flow in germinating corn seeds based on low field nuclear magnetic resonance[J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2018, 34(10): 274-281. DOI: 10.11975/j.issn.1002-6819.2018.10.035.
- [9] 牟红梅,何建强,邢建军,等.小麦灌浆过程籽粒水分变化的核磁共振检测[J].农业工程学报,2016,32(8):98-104.MOU H M, HE J Q, XING J J, et al. Water changes in wheat spike during grain filling stage investigated by nuclear magnetic resonance[J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2016, 32(8): 98-104.
- [10] 汪楠,邵小龙,时小转,等.稻谷低温低湿干燥特性与水分迁移分析[J].食品工业科技,2017,38(5):114-119.WANG N, SHAO X L, SHI X Z, et al. Analysis of drying characteristics and moisture migration for paddy rice under low temperatures and low relative humidities[J]. Sci Technol Food Ind, 2017, 38(5): 114-119. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.05.013.
- [11] 宋平,杨涛,王成,等.利用低场核磁共振分析水稻种子浸泡过程中的水分变化[J].农业工程学报,2015,31(15):279-284.SONG P, YANG T, WANG C, et al. Analysis of moisture changes during rice seed soaking process using low-field NMR[J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2015, 31(15): 279-284. DOI: 10.11975/j.issn.1002-6819.2015.15.038.
- [12] CHALAND B, MARIETTE F, MARCHAL P, et al.  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance relaxometric characterization of fat and water states in soft and hard cheese[J]. J Dairy Res, 2000, 67(4): 609-618. DOI: 10.1017/s002202990004398.
- [13] 侯彩云,大下诚一,濑尾康久,等.蒸煮过程中稻米水分状态的质子核磁共振谱测定[J].农业工程学报,2001,17(2):126-131.HOU C Y, SEIICHI OSHITA YASUHISA, SEO YOSHINORI KAWAGOE, et al. State of moisture in rice kernel during cooking process by  $^1\text{H}$ -NMR measurement[J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2001, 17(2): 126-131.
- [14] TROUTMAN M Y, MASTIKHIN I V, BALCOM B J, et al. Moisture migration in soft-panned confections during engrossing and aging as observed by magnetic resonance imaging[J]. J Food Eng, 2001, 48(3): 257-267. DOI: 10.1016/S0260-8774(00)00167-9.
- [15] 杨期和,尹小娟,叶万辉.硬实种子休眠的机制和解除方法[J].植物学通报,2006,41(1):108-118.YANG Q H, YIN X J, YE W H. Dormancy mechanism and breaking methods for hard seeds[J]. Chin Bull Bot, 2006, 41(1): 108-118. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3466.2006.01.014.
- [16] 陈丽,代松,马青江,等.合欢种皮结构及其与吸水的关系[J].林业科学,2019,55(5):46-54.CHEN L, DAI S, MA Q J, et al. Structure of seed coat of *Albizia julibrissin* and its relationship with water uptake[J]. Sci Silvae Sin, 2019, 55(5): 46-54. DOI: 10.11707/j.1001-7488.20190506.
- [17] 郭学民,肖啸,梁丽松,等.白刺花种子硬实与萌发特性研究[J].种子,2010,29(12):38-42.GUO X M, XIAO X, LIANG L S, et al. Study on the properties of hard and germination of *Sophora viciifolia* seed[J]. Seed, 2010, 29(12): 38-42. DOI: 10.16590/j.cnki.1001-4705.2010.12.079.
- [18] 张春平,何平,杜丹丹,等.决明种子硬实及萌发特性研究[J].中草药,2010,41(10):1700-1704.ZHANG C P, HE P, DU D D, et al. Study on hardness and germination characteristic of *Cassia obtusifolia* seeds[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2010, 41(10): 1700-1704.
- [19] TAKEUCHI S, FUKUOKA M, GOMI Y, et al. An application of magnetic resonance imaging to the real time measurement of the change of moisture profile in a rice grain during boiling[J]. J Food Eng, 1997, 33(1/2): 181-192. DOI: 10.1016/S0260-8774(97)00052-6.
- [20] 宋平,徐静,马贺男,等.用低场核磁共振检测水稻浸种过程中种子水分的相态及分布特征[J].农业工程学报,2016,32(6):204-210.SONG P, XU J, MA H N, et al. Moisture phase state and distribution characteristics of seed during rice seed soaking process by low field nuclear magnetic resonance[J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2016, 32(6): 204-210. DOI: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.06.028.
- [21] 宣艳,孙旭,向义龙,等.低场核磁共振技术对香樟种子水分变化的研究[J].江苏林业科技,2018,45(6):8-11,15.XUAN Y, SUN X, XIANG Y L, et al. Analysis of internal moisture change of camphor seeds during drying by low field-NMR[J]. J Jiangsu For Sci Technol, 2018, 45(6): 8-11, 15. DOI: 10.3969/j.issn.1001-7380.2018.06.002.
- [22] 付晓记,唐爱清,闵华,等.花生浸种过程中水分相态和水分迁移动态研究[J].中国油料作物学报,2018,40(4):552-557.FU X J, TANG A Q, MIN H, et al. Analysis on water phase state and transport in process of peanut seed soaking by using low-field nuclear magnetic resonance[J]. Chin J Oil Crop Sci, 2018, 40(4): 552-557. DOI: 10.7505/j.issn.1007-9084.2018.04.012.
- [23] GARNCZARSKA M, ZALEWSKI T, KEMPKA M. Water uptake and distribution in germinating lupine seeds studied by magnetic resonance imaging and NMR spectroscopy[J]. Physiol Plant, 2010, 130(1): 23-32. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.00883.x.