

七叶一枝花种子萌发不同阶段生理生化变化研究

苏海兰^{1,4}, 周先治^{1,4*}, 李希¹, 陈敏健², 卓景泰¹, 唐建阳^{1,4*}, 单寄坪³, 林映从³

1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003

2. 福建省农业科学院农业生态研究所, 福建 福州 350003

3. 福建承天农林科技发展有限公司, 福建 南平 354100

4. 农业部福州热带作物科学观测实验站, 福建 福州 350003

摘要:目的 探讨七叶一枝花 *Paris polyphylla* var. *chinensis* 种子萌发不同阶段的酶和内源激素调控机制, 为其种子解除休眠、萌发不同阶段采取有效处理措施, 提高出苗率提供科学依据。方法 通过观察和测定变温层积处理后七叶一枝花种子萌发不同阶段形态差异, 采用常规的生理生化方法测定超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、苹果酸脱氢酶(MDH)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G-6-PDH) 5种酶活性, 采用质谱定量方法测定吲哚乙酸(IAA)、赤霉素(GA₃)、脱落酸(ABA)、水杨酸(SA)、反玉米素(TZ)、茉莉酸(JA)量; 研究种子萌发过程中胚率与酶活性和内源激素量变化之间的相关性。结果 七叶一枝花种子从未萌动、上胚轴休眠到即将出苗阶段, 种子质量和胚率逐步上升; SOD和POD活性逐步升高; CAT和MDH活性逐步减弱, G-6-PDH活性出现双峰, 未萌动阶段和萌动后上胚轴未伸长阶段显著高于其他阶段; IAA、GA₃、ABA、JA的量逐步升高, IAA和JA量在即将出苗阶段显著高于其他阶段($P < 0.01$); TZ和SA的量先升高后降低, TZ的量在子叶分化形成期和胚乳成熟期显著高于其他阶段($P < 0.01$), SA出苗前期量最高, 已萌动胚根刚突破种皮阶段和胚乳形成阶段量次之; CAT酶活性变化与胚率呈显著负相关, IAA和JA的量变化与胚率呈显著正相关。结论 CAT对种胚的生长有抑制作用, IAA与JA对种胚的生长有正向促进作用。

关键词: 七叶一枝花; 萌发阶段; 酶活性; 内源激素; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶; 过氧化物酶; 苹果酸脱氢酶; 6-磷酸葡萄糖脱氢酶

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)22-4755-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.22.026

Physicochemical changes of *Paris polyphylla* var. *chinensis* seed during different stages of germination

SU Hai-lan^{1,4}, ZHOU Xian-zhi^{1,4}, LI Xi¹, CHEN Min-jian², ZHUO Jing-tai¹, TANG Jian-yang^{1,4}, SHAN Ji-ping³, LIN Ying-cong³

1. Agricultural Bio-resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

2. Agricultural Ecology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

3. Fujian Chengtian Agriculture and Forestry S&D Development Co Ltd, Nanping 354100, China

4. Fuzhou Tropical Crop Scientific Observation Experimental Station of Ministry of Agriculture, Fuzhou 350003, China

Abstract: Objective To investigate the regulation mechanism of enzymes and endogenous hormones of different stages of *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* seed germination, aiming to provide scientific basis for taking effective treatment measures during the different stages of seed dormancy and germination to increase seedling emergence rate. **Methods** The morphological differences of different stages of *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* seeds germination after treatment with variable temperature stratification were observed and measured. Activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), malic acid deoxy enzyme (MDH) and 6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) were determined by routine physiological and biochemical methods. Levels of 6 endogenous hormones, named indole acetic acid (IAA), gibberellin (GA₃), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), Trans-Zeatin (TZ), and jasmonic acid (JA) were quantitatively determined by mass spectrometry. The correlation among enzyme activity, endogenous

收稿日期: 2017-08-02

基金项目: 国家标准化项目(ZYBZH-Y-FJ-09); 公益性行业科研专项(201507002); 省属公益类科研院所基本科研专项(2014R1018-11, 2015R1018-13, 201507002); 福建省农业科学院创新团队建设项目资助(STIT2017-2-8)

作者简介: 苏海兰(1980—), 助理研究员, 主要从事中药材资源利用与栽培研究。Tel: 13706945809 E-mail: 363801575@qq.com

*通信作者 唐建阳(1961—), 研究员, 主要从事中药材种植及加工方面研究。Tel: (0591)87880041 E-mail: tjy836@163.com

#并列第一作者 周先治(1976—), 助理研究员, 主要从事中药材种植方面研究。Tel: (0591)87880041 E-mail: xianzhizhou@126.com

hormone content and embryo rate during seed germination was studied. **Results** In the stages of non-germinating, epicotyl dormancy and upcoming emerging of *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* seeds, seed weight and embryo rate increased gradually; the activities of SOD and POD increased gradually, while activities of CAT and MDH decreased gradually. The G-6-PDH activity levels showed two peaks and the levels of non-germinating stage and stage before epicotyl elongation after germination were obviously higher than those of other stages. The contents of IAA, GA₃, ABA and JA increased gradually, and the contents of IAA and JA were significantly higher in the upcoming emerging stage than those of other stages ($P < 0.01$). The contents of TZ and SA increased first and then decreased. TZ levels of cotyledon differentiation stage and endosperm maturation stage were obviously higher than those of other stages ($P < 0.01$). SA level was highest in the early stage of emerge, and the levels of SA in germinating radicle just breaking through the seed coat stage and endosperm formation stage were second. The change of CAT enzyme activity was negatively correlated with embryo rate, and the content of IAA and JA was positively correlated with embryo rate. **Conclusion** CAT could inhibit the growth of embryo, and IAA and JA had positive effects on the growth of embryo.

Key words: *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara; germinating stage; enzyme activity; endogenous; SOD; CAT; POD; MDH; G-6-PDH

七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 是百合科重楼属植物,为《中国药典》2015 年版收载的 2 种重楼药材基原植物之一^[1], 主要以干燥根茎入药, 其性微寒、味苦, 有小毒, 归肝经, 具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效, 用于治疗疔疮痈肿、咽喉肿痛、蛇虫咬伤、跌扑伤痛、惊风抽搐等疾病^[2]。七叶一枝花来源目前主要靠采集野生资源, 而持续几十年的毁灭性采挖, 导致七叶一枝花及其同属植物资源已近枯竭^[3], 近年来重楼价格持续攀升, 发展人工种植是形势所需, 而优质持续的种源供给是种植产业可持续发展的关键因素, 但七叶一枝花种子存在二次休眠, 自然情况下种子休眠期长, 发芽率低^[4], 探明七叶一枝花种子萌发机制, 采取有效处理措施, 突破七叶一枝花种子繁育技术, 扩大人工繁育栽培, 是保护七叶一枝花资源、持续获得药源植物和健康发展相关产业的首要任务。

在具有类似休眠特性的植物滇重楼^[5-9]、华重楼^[4]、西洋参^[10]等研究中发现, 种子休眠的解除及萌发与一系列关键酶的活性变化、多种激素调控密切相关。滇重楼人工栽培研究较多, 种子发芽问题有一定的突破, 七叶一枝花种子发芽问题还是生产上一大难题。在七叶一枝花种子萌发的研究中, 结合田间生产研究即将出苗前种子萌发各阶段, 酶活性与内源激素同时对其种子萌发、出苗的影响, 特别是对水杨酸 (SA)、反玉米素 (TZ)、茉莉酸 (JA) 的研究、种子萌发至出苗过程生理生化研究都鲜有报道。本实验通过变温层积处理, 取即将出苗前存在未萌发、萌发、即将出苗的不同萌发阶段同期处理种子, 研究各自显微结构、酶活性、内源激素量之间的差异、变化, 结合种子田间出苗生产实践,

分析同期处理种子存在不同萌发阶段的原因, 试图进一步探索七叶一枝花种子萌发、出苗相关机制, 以期为其种子解除休眠、萌发不同阶段采取有效处理措施, 提高出苗率提供科学依据, 为七叶一枝花种子繁育提供指导, 促进产业健康可持续发展。

1 材料

材料于 2015 年采自福建省南平市光泽县福建承天药业重楼规范化栽培基地, 经中国科学院昆明植物研究所李恒研究员鉴定为七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 自花授粉果实自然成熟的种子。

2 方法

2.1 种子萌动处理

将自然成熟、新鲜的七叶一枝花种子洗去红色外种皮, 去除品质较次种子, 阴干, 置冷藏, 随后保温沙藏, 大田播种, 共处理时间为 150 d, 种子即将出苗前, 种子子叶已形成, 从外观可见种皮呈透明状、外可见内子叶, 但未出苗, 根据种子萌发形态同时取未萌动阶段 (I)、胚根刚突破种皮已萌动阶段 (II)、上胚轴未伸长阶段 (III)、上胚轴已伸长但果皮未透明阶段 (IV)、即将出苗前阶段 (V), 各 10.0 g 800~900 粒种子, 观察不同萌发阶段种子显微结构、测定酶活性和内源激素量。

2.2 种子显微结构观察

先将种子从中间切开, 5%的戊二醛固定样品 4 h, 磷酸缓冲液清洗样品, 1%钨酸固定 4 h, 蒸馏水清洗, 酒精逐级脱水, 叔丁醇置换, 冷冻干燥仪干燥, 上台, 喷金, 采用 JSM-6380LV 电镜 (日本电子公司) 观察、拍照。

2.3 酶的测定

取 1.0 g 七叶一枝花种子 3 份, 分别加入 1 mL,

pH 值 8.0、浓度为 0.1 mol/L 的 H_3PO_4 缓冲液，研磨成匀浆，定容至 5 mL，置入 4 °C 冷冻离心机离心 20 min，即为超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）、过氧化氢酶（CAT）待测酶液。同法另取 3 份云南重楼种子，加入 Tris-HCl 缓冲液研磨成匀浆，其他操作同上，制成苹果酸脱氢酶（MDH）和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G-6-PDH）的待测酶液。

SOD 活性测定参照蒋德安等^[11]的方法、POD 活性测定用愈创木酚法^[12]，CAT 活性测定采用紫外分光光度法^[13]，MDH、G-6-PDH 测定参照李昭玲等^[4]采用分光光度计的方法。

2.4 内源激素测定方法

2.4.1 内源激素提取 精密称取样品 3 份，每份 1.0 g，加入液氮磨碎，加入 8 倍 80% 冰冻甲醇 4 °C 低温避光浸提 12 h，离心取上清液；将残渣再用 80% 的冰冻甲醇（1：5）浸提 2 次，每次 2 h，离心，合并上清液，40 °C 下氮气吹干，加水定容至 5 mL，作为供试液备用^[9]，用阳离子交换柱 MCX 处理。

2.4.2 内源激素测定 色谱和质谱条件 Waters BEH 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）。柱温 40 °C，进样量 5 μL。流动相为 15 mmol/L 乙酸铵水（A）- 甲醇（B），体积流量为 0.3 mL/min，洗脱梯度：0~13 min，5%~100% B；13~17 min，100% B；17~17.01 min，100%~5% B；17.01~20 min，5% B。

检测器为质谱检测器，采用内标法检测，最终加入标样最大质量浓度 IAA、TZ、JA 为 20 ng/mL，SA、GA₃ 为 200 ng/mL，ABA 为 2 000 ng/mL。

质谱正离子模式参数：毛细管电压 1.00 kV，锥孔电压 30 V，离子源温度 150 °C，锥孔气流量 150 L/Hr，脱溶剂气流量 800 L/Hr，脱溶剂气温度 400 °C。

质谱负离子模式参数：毛细管电压 1.00 kV，锥孔电压 30 V，离子源温度 150 °C，锥孔气流量 150 L/Hr，脱溶剂气流量 800 L/Hr，脱溶剂气温度 400 °C。质谱 MRM 参数见表 1。

2.4.3 标准曲线的绘制 精密吸取不同质量浓度的 IAA、ABA、TZ、SA、JA、GA₃ 适量，按照“2.4.2”项测定，以质量浓度为横坐标（X），各内源激素峰面积为纵坐标（Y），绘制其标准曲线得到回归方程 IAA： $Y=0.9596X+0.9229$ ， $R^2=0.9990$ ；ABA： $Y=0.8776X+422.74$ ， $R^2=0.9989$ ；TZ： $Y=0.501X-0.0266$ ， $R^2=0.9998$ ；SA： $Y=1.8321X+26.196$ ， $R^2=0.9973$ ；JA： $Y=0.8908X-0.0169$ ， $R^2=0.9998$ ；GA₃： $Y=0.9388X+11.986$ ， $R^2=0.9908$ 。

表 1 质谱 MRM 模式参数

化合物	质谱多反应监测	碰撞能量/eV	电离模式
indole-3-acetic acid (IAA)	176.2→77.2	34	ESI ⁺
	176.2→103.3*	30	
¹³ C6-IAA	182.1→81.1	34	ESI ⁺
	182.1→109.2*	30	
trans-zeatin (TZ)	220.1→136.1*	15	ESI ⁺
	220.1→148.1	15	
15N-trans-zeatin	221.3→137.3*	15	ESI ⁺
	221.3→149.3	15	
salicylates (SA)	137.1→65.2	22	ESI ⁻
	137.1→93.2*	16	
jasmonic acid (JA)	209.3→59.3*	12	ESI ⁻
	209.3→109.3	20	
abscisicacid (ABA)	263.2→153.2*	10	ESI ⁻
	263.2→204.3	18	
² H6-ABA (同位素内标)	269.2→159.2*	10	ESI ⁻
	269.2→207.2	18	
gibberellin A ₃ (GA ₃)	345.2→143.3*	30	ESI ⁻
	345.2→221.4	26	

*为定量离子
*represent quantitative ion

2.4.4 方法学考察 经精密度、稳定性、重复性、加样回收率试验，RSD 值均符合实验要求。

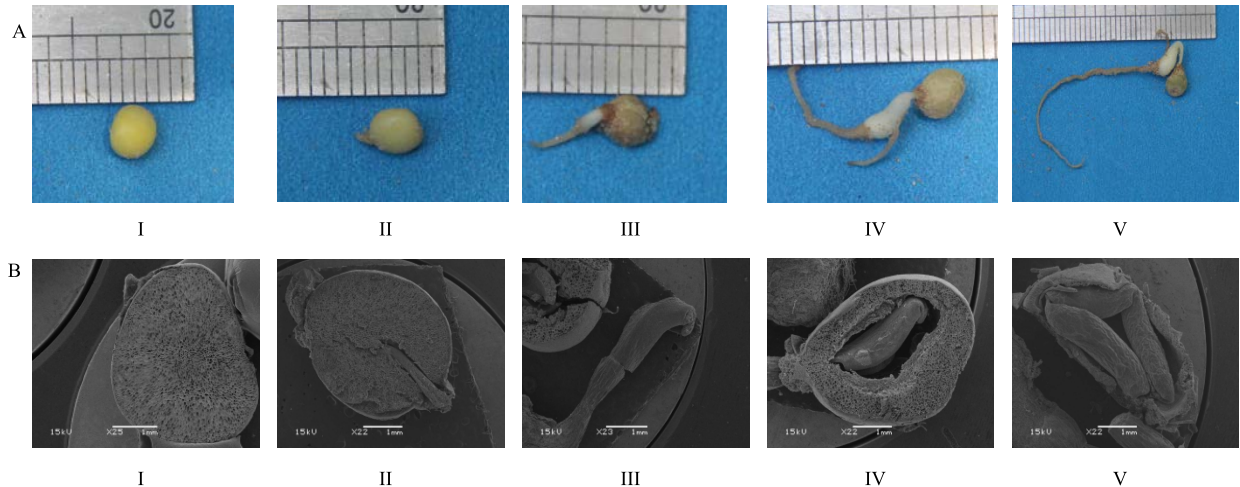
2.5 数据处理

采用 SPSS 13.0 软件进行实验数据的分析处理，每个实验处理重复 3 次，分析不同萌发阶段的差异显著性，并利用 Excel 进行图表的制作，分析七叶一枝花种子不同萌发阶段的酶活性、内源激素量和胚率的相关性。

3 结果与分析

3.1 七叶一枝花种子萌发不同阶段外观及显微结构

通过电镜显微观察种子萌发不同形态胚、子叶发育阶段（图 1），第 I 阶段种子外观未萌动，电镜观察到胚还没有分化，属胚未分化阶段；第 II 阶段种子胚根刚由珠孔端穿出，电镜观察到胚根分化形成，胚顶端增大，尚未见到子叶，属胚根分化形成期；第 III 阶段种子胚轴基部膨大呈纺锤形，末端具极短根尖，但未形成根系，电镜观察到子叶分化形成，胚发育后期，可见胚根及子叶，属胚发育后期，子叶分化形成期；第 IV 阶段种子下胚轴基部膨大加粗，根上部有收缩痕迹，出现根系，电镜观察到子叶进一步生长，胚乳营养已被吸收 1/3，属胚乳成熟阶段；第 V 阶段种皮已变薄至透明状，隐约可见到内部绿色子叶，电镜观察到子叶已占据整个种子，胚乳萎缩，是子叶最后脱离种皮伸展出来前夕。



I-未萌动阶段 II-已萌动胚根刚突破种皮阶段 III-上胚轴未伸长阶段 IV-上胚轴已伸长但果皮未透明阶段 V-即将出苗前阶段

I-stage of non-germinating II-stage of germinating radicle just breaking through the seed coat III-stage before epicotyl elongation IV-stage that epicotyl has elongated but the pericarp is not transparent V-stage of upcoming emerging of the seeds

图 1 七叶一枝花种子萌发不同阶段外观 (A) 和显微形态 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Morphology of *P. polyphylla* var. *chinensis* seed during different stages germination of exterior (A) and micro-morphology (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

田间栽培实验, 第 V 阶段种子 10 d 后始出苗, 第 IV 阶段种子 30 d 后始出苗, 而第 III 和第 II 阶段的种子第 2 年春后 2 月出苗, 第 I 阶段种子头 2 年未出苗。

结合种子外观形态、电镜观察、田间出苗时间以及种子休眠特性, 将 5 个阶段种子分 3 个不同萌发阶段, 即未萌发, 未解除休眠阶段 (I); 萌发后上胚轴并不伸长, 当年不出苗, 处于上胚轴休眠阶段 (II、III); 上胚轴伸长, 子叶发育完全, 即将破土出苗阶段 (IV、V) [14]。

从表 2 可知, 未萌发阶段的七叶一枝花种子质

量和上胚轴萌发尚处于休眠阶段无显著差异, 随着上胚轴伸长, 子叶开始发育后, 种子的质量迅速增加, 至胚乳成熟阶段, 种子质量相比上胚轴休眠阶段增加 1 倍以上, 至种子出苗前期阶段, 种子的质量相比胚乳成熟期又增加 1 倍以上; 不同萌发阶段的种子的纵径差异不显著, 萌发阶段的种子的横径显著高于未萌发阶段 ($P < 0.05$); 未萌发阶段种子的胚率和种子已萌动且胚根刚突破种皮阶段相比无显著差异, 随着种子胚轴基部膨大, 子叶分化形成过程开始, 种子的胚率显著增加, 至子叶发育完全、种子即将出苗阶段, 种子的胚率达到 80% 以上。

表 2 不同萌发阶段种子形态

Table 2 Morphology of *P. polyphylla* var. *chinensis* seed during different stages of germination

萌发阶段	百粒鲜质量/g	种子纵径/mm	种子横径/mm	胚率/%
I	5.14 ± 0.14 c	5.10 ± 0.35 a	4.09 ± 0.31 b	9.69 ± 0.13 d
II	5.89 ± 0.74 c	4.68 ± 0.55 a	4.18 ± 0.40 a	11.04 ± 0.68 d
III	6.10 ± 0.21 c	4.77 ± 0.73 a	4.19 ± 0.39 a	52.86 ± 1.85 c
IV	13.06 ± 0.55 b	4.94 ± 0.69 a	4.20 ± 0.44 a	68.93 ± 1.97 b
V	26.89 ± 1.79 a	5.20 ± 0.73 a	4.17 ± 0.55 a	82.20 ± 5.10 a

不同字母代表差异极显著 ($P < 0.05, 0.01$), 下同

Different letters represent significant difference ($P < 0.05, 0.01$), same as below

3.2 七叶一枝花种子不同萌发阶段酶活性变化

3.2.1 SOD 活性变化 种子萌发不同阶段 SOD 活性有一定的差异, 将出苗前种子 SOD 活性最高 (图 2-A), 与其他阶段呈现极显著差异 ($P < 0.01$), 表明 SOD 参与种子出苗阶段调控。

3.2.2 CAT 活性变化 CAT 活性随着种子的萌发

呈降低趋势, 胚乳成熟阶段和出苗阶段的 CAT 活性显著低于未萌动阶段 (图 2-B)。

3.2.3 POD 活性变化 种子萌发不同阶段 POD 活性差异明显, 胚轴休眠解除之前种子 POD 活性水平都相对较低, 当胚根伸长后, POD 活性水平上升, 即将出苗前种子 POD 活性水平最高 (图 2-C), 与

其他阶段表现出极显著差异 ($P < 0.01$), 表明 POD 参与七叶一枝花种子萌发至出苗过程的调控。

3.2.4 MDH 活性变化 三羧酸循环 (TCA) 是需氧生物体内普遍存在的循环呼吸代谢途径, 而 MDH 是其中一个关键限速酶, 其活性水平可以在一定意义上反映种子 TCA 途径的代谢强弱。七叶一枝花种子萌发不同阶段 MDH 活性呈现出 3 个明显的阶段, 未萌动 (I) 阶段种子 MDH 活性水平最高, 胚轴休眠阶段 (II、III) 种子 MDH 活性水平明显下降, 即将出苗阶段 (IV、V) 种子 MDH 活性水平最低 (图 2-D), 3 个阶段的活性表现出极显著差异 ($P <$

0.01)。表明七叶一枝花种子生理休眠解除、萌动、出苗不同阶段 TCA 途径代谢明显减弱。

3.2.5 G-6-PDH 活性变化 磷酸戊糖途径 (PPP) 是一种葡萄糖代谢途径, 其相对灵活, 可以因不同的需求而产生不同产物, G-6-PDH 是其一个关键限速酶, 其活性的大小一定程度反映种子 PPP 途径的代谢强弱。七叶一枝花种子萌发不同阶段 G-6-PDH 活性呈现出 2 个明显的阶段, 未萌动阶段 (I)、胚轴休眠阶段 (II、III) 种子 G-6-PDH 活性有波动, 但都处于较高水平, 即将出苗阶段 (IV、V) 种子 G-6-PDH 活性明显降低 (图 2-E), 2 个阶段的活性

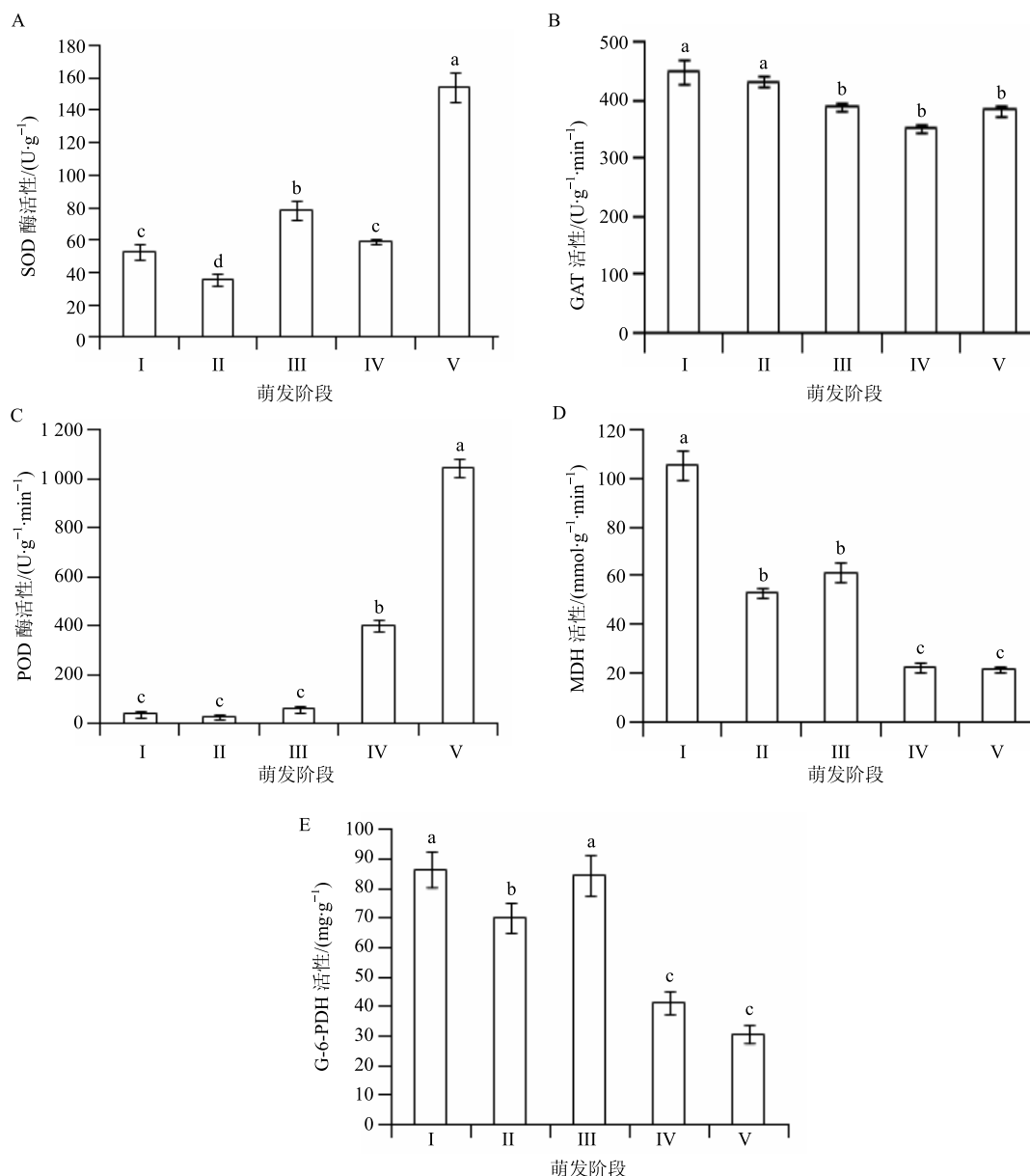


图 2 七叶一枝花种子不同萌发阶段相关酶活性变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Changes of SOD, CAT, POD, MDH, and G-6-PDH activities in *P. polyphylla* var. *chinensis* seed during different stages of germination ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

出极显著差异 ($P < 0.01$)。表明七叶一枝花种子休眠解除、出苗不同阶段 PPP 途径代谢明显减弱。

3.3 七叶一枝花种子不同萌发阶段内源激素量变化

3.3.1 IAA 量变化 七叶一枝花种子萌发不同阶段 IAA 量呈现出 3 个明显的阶段, 未萌动阶段 (I) 种子 IAA 量最低, 胚轴休眠阶段 (II、III) 种子 IAA 量明显提高, 即将出苗阶段 (IV、V) 种子 IAA 量最高 (图 3-A), 3 个阶段的量表现出极显著差异

($P < 0.01$), 表明 IAA 是影响七叶一枝花种子生理休眠解除、萌动、出苗不同阶段的重要因子。

3.3.2 GA₃ 量变化 七叶一枝花种子胚轴休眠解除之前 GA₃ 量都相对较低, 当胚根伸长后, 种子 GA₃ 量迅速提高, 即将出苗前种子 GA₃ 量最高 (图 3-B), 与其他阶段表现出极显著差异 ($P < 0.01$), 表明七叶一枝花种子 GA₃ 量与解除休眠关系不明显, 与后期出苗关系密切。

3.3.3 ABA 量变化 七叶一枝花种子萌动时 ABA

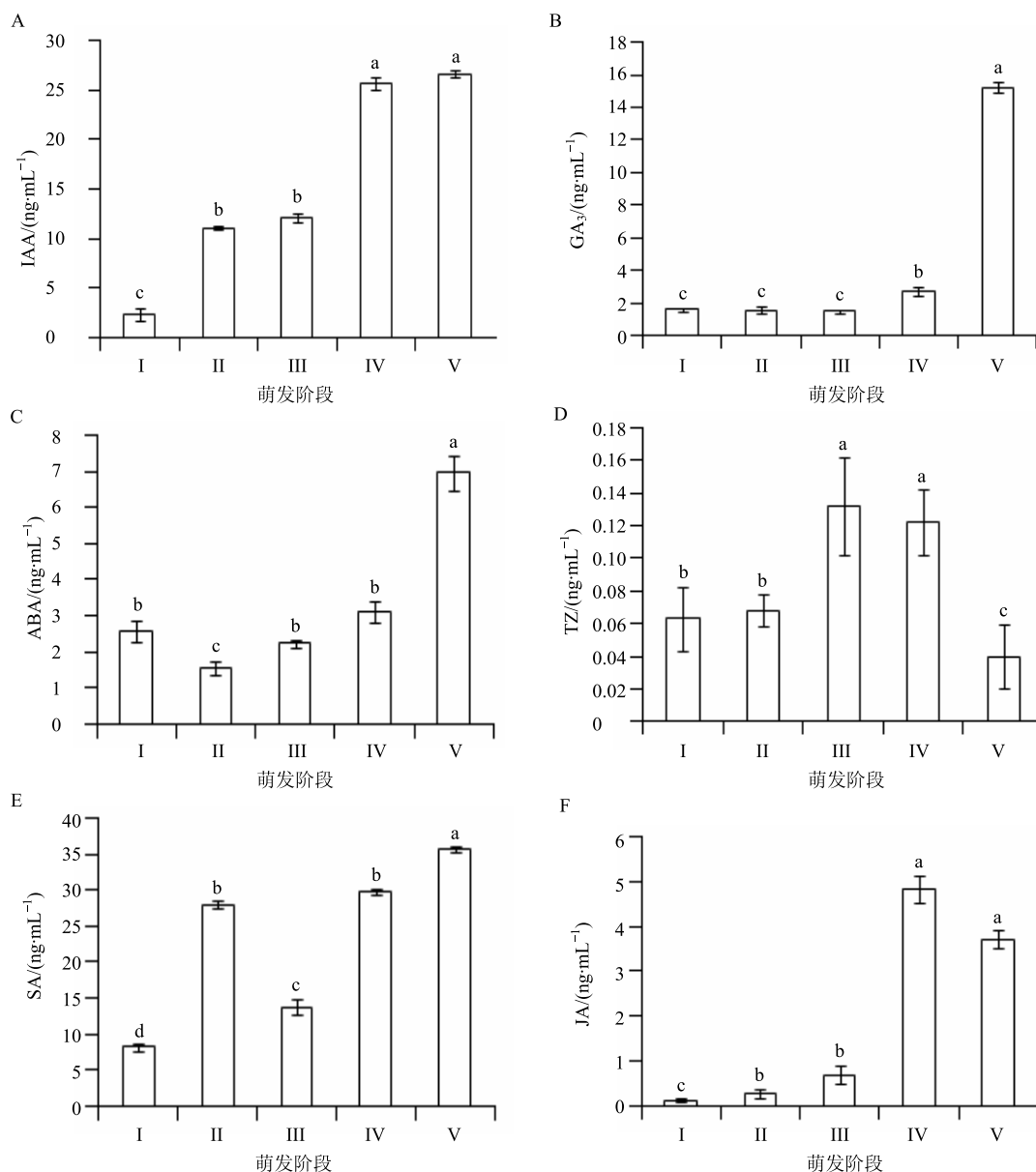


图 3 七叶一枝花种子萌发不同阶段内源激素量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Changes of endogenous hormone contents in *P. polyphylla* var. *chinensis* seed during different stages of germination ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

量明显降低,表明 ABA 是种子休眠解除的重要因子;即将出苗前整个种子 ABA 量最高(图 3-C),与其他阶段表现出极显著差异($P<0.01$)。

3.3.4 TZ 量变化 种子萌动长根和子叶生长时,七叶一枝花种子 TZ 量高(图 3-D),TZ 会促进种子长根发芽,但对种子休眠和出苗影响规律性不是很明显。

3.3.5 SA 量变化 SA 是一种酚类激素,可调节植物的生长发育。种子生理休眠阶段(I)、胚轴休眠阶段(III) SA 量低,种子萌动(II)、即将出苗阶段(IV、V) SA 量高,2 个阶段的量相关 3 倍(图 3-E),表现出极显著差异($P<0.01$),表明 SA 量与解除种子休眠、种子生长发育、出苗关系密切。

3.3.6 JA 量变化 茉莉酸信号分子参与植物生长

发育众多生理过程的调控,七叶一枝花未萌动种子 JA 量极低,为 0.031 ng/mL,即将出苗前种子 JA 量高,4.843 和 3.720 ng/mL(图 3-F),表现出极显著差异($P<0.01$),表明 JA 是促进种子休眠解除、出苗的重要因子。

3.4 种子的酶活性、内源激素量与种子胚率的相关性研究

七叶一枝花种子萌发过程中,种子的酶活性变化、内源激素量与种子胚率的相关性分析见表 3。CAT 酶活性变化与胚率呈显著负相关($P<0.05$),说明 CAT 对种胚的生长有抑制作用。IAA 和 JA 的含量变化与胚率呈显著正相关($P<0.05$),说明 IAA 与 JA 对种胚的生长有正向促进作用。

表 3 种子酶活性、内源激素量与种子胚率的相关性

Table 3 Correlation analysis among endogenous hormone contents, enzymatic activity and embryo rate in *P. polyphylla* var. *chinensis* seed during different stages of germination

指标	SOD	POD	CAT	MDH	G-6-PDH	IAA	ABA	GA ₃	TZ	SA	JA	胚率
SOD	1.00											
POD	0.90*	1.00										
CAT	-0.41	-0.53	1.00									
MDH	-0.49	-0.70	0.83*	1.00								
G-6-PDH	-0.62	-0.89*	0.69	0.88*	1.00							
IAA	0.61	0.81*	-0.88*	-0.96**	-0.94**	1.00						
ABA	0.95**	0.98**	-0.40	-0.53	-0.77	0.68	1.00					
GA ₃	0.94**	0.96**	-0.32	-0.56	-0.76	0.65	0.98**	1.00				
TZ	-0.38	-0.44	-0.50	-0.09	0.25	0.05	-0.52	-0.60	1.00			
SA	0.46	0.73	-0.55	-0.91*	-0.91*	0.86*	0.58	0.65	-0.28	1.00		
JA	0.48	0.74	-0.87*	-0.83*	-0.91*	0.93**	0.62	0.53	0.10	0.71	1.00	
胚率	0.77	0.8	-0.90*	-0.81	-0.78	0.90*	0.74	0.67	0.18	0.59	0.85*	1.00

*表示显著相关, $P<0.05$, **表示极显著相关, $P<0.01$

*means significant difference, $P<0.05$; ** means extremely significant difference, $P<0.01$

4 讨论

种子萌发需要多种酶参与,通过各种酶的作用,促进蛋白质、淀粉等物质转化,调节内源激素的浓度,促进种子萌发、出苗。SOD 活性在种子不同萌发阶段波动性大,可能与种子休眠解除直接关系不明显,这与前人研究结果相似^[4,6],出苗前 SOD 酶活性较高,与种子活力水平关系密切,七叶一枝花种子萌发后出苗过程需要较高的 SOD 活性。POD 活性在种子萌发后期显著提高,说明较高的 POD 活性可以促进其种子萌发、出苗,这与前人研究结果一致,较高的 POD 活性降低因自由基过多而引起膜脂过氧化作用造成的膜损伤^[6],POD 活性与

GA₃ 量呈显著正相关、与 JA 含量正相关,POD 是 IAA 氧化酶的一种同工酶,能够参与调节 IAA 量,进一步影响 GA₃ 的量^[4],可能还通过调节种子 JA 量及其他激素水平进而影响种子萌发、出苗。MDH 活性、G-6-PDH 活性差异变化相似,从未萌发阶段至出苗前,TCA 途径代谢和 PPP 途径的代谢同时减弱,表明七叶一枝花种子处理后未萌动种子呼吸代谢途径以 TCA 途径和 PPP 途径为主,萌动之后种子以其他代谢途径为主,TCA 途径和 PPP 途径代谢减弱与打破休眠有关,这与李昭玲等^[4]的研究华重楼种子在从休眠状态转为破除休眠状态过程中其呼吸代谢途径从以 TCA 途径为主转为了以 PPP 途径

为主结果不一致,可能与实验取样阶段有关,前人研究主要根据层积时间从 0~120 d,按天数划分取样,本研究是在同期根据田间不同萌发阶段取样,同时,七叶一枝花种子解除休眠、出苗可能不只是传统的代谢途径转化,单一的从 TCA 途径转为 PPP 途径,在萌发后期即出苗前,代谢 TCA 途径和 PPP 途径同时减弱,可能以水解途径为主要代谢途径或涉及更多的主要代谢途径,这是否与其种子出苗率低有关,有待于进一步研究。

植物内源激素在细胞分裂与伸长、组织与器官分化、开花与结实、成熟与衰老、休眠与萌发以及离体组织培养等方面,分别或相互协调地调控植物的生长、发育与分化,植物激素对种子的生长发育有重要的调节作用^[15-16]。内源激素量的变化与种子萌发存在紧密联系,各种激素能够诱导储藏物质的分解与合成并最终导致种子的萌发^[17-20]。七叶一枝花种子萌发不同阶段 IAA 的差异变化与 SA 相似,出现 2 次高峰,第 1 个高峰出现在第 1 次萌发,可能与种子休眠解除有关,是促进种子萌发的因子,之后低峰与进入胚轴休眠有关,第 2 个高峰与胚、子叶快速发育一致,是促进种子出苗的重要因子。七叶一枝花种子处理后总体 ABA 量较低,仅为 1~8 ng/mL,明显低于滇重楼种子处理前 55 ng/mL^[20],这说明变温层积处理可以有效地降低种子 ABA 量,这种现象也发生在滇重楼^[18-20]、白花树^[21]等种子处理过程中,即将出苗前种子 ABA 量最高,一般植物种子萌发过程中其 ABA 量逐步下降,刺槐种子发芽时 ABA 量继续上升^[22],浦梅等^[19,23]研究也发现滇重楼萌动种子中 ABA 量高于未萌动种子中的含量,说明在种子萌发过程中,解除种子休眠不仅 ABA 量降低,即将出苗前种子 ABA 量高,可能是阻止胚的过早萌发和淀粉贮藏物的过早水解^[10,24],Kojima 则认为 ABA 的促进出苗作用在于其能够增加液泡中糖的溶度,从而增加了细胞吸取营养的能力^[15],也可能与种子胚乳营养消耗完毕,萎缩,即将脱落的种壳有关,生产上种子萌发后期不能盲目降低 ABA 量。 GA_3 量在子叶发育后期、出苗阶段才迅速升高,表明 GA_3 并不是影响七叶一枝花种子休眠解除的重要因素,滇重楼同一批处理种子有无萌发阶段内源赤霉素差异也不大^[24],目前的研究主要集中在通过添加外源 GA_3 来促进重楼种子萌发^[17-20,25],有研究表明外源赤霉素对滇重楼种子的发育萌发没有明显的促进作用,甚至反而会抑制

种子的萌发^[24,26],延长了华重楼平均出苗时间,对华重楼幼苗的各项生长指标均有负面影响^[3],而且激素处理常常会造成大量的种子霉烂^[4],因此,在生产上种子萌发前期不建议施用外源赤霉素,种子萌发后期才需要较高的 GA_3 量。TZ 量差异规律性不明显,而且量很少,但种子萌动长根和子叶生长时,TZ 量较高,可能与 TZ 刺激细胞分化有关。从未萌发种子至出苗前不同萌发阶段 JA 的差异,JA 在七叶一枝花种子解除休眠和出苗过程都起了重要的作用,可能是与种子中蛋白合成有关^[27],刺激休眠种子的萌发,促进种子出苗,可以进一步研究茉莉酸对七叶一枝花种子繁殖的作用机制和外源茉莉酸处理作用。

本实验研究种子萌发到出苗阶段酶和内源激素的水平变化及规律,为进一步提高种子出苗率提供理论参考,七叶一枝花个体发育过程十分缓慢(从播种至药材采收需要 8~10 年),种源紧缺,如何提高出苗率、保苗率以及加快其生长速度是将来研究的热点,也是生产中亟待解决的瓶颈问题。

志谢:本研究得到中国医学科学院药用植物研究所李先恩研究员、福建农林大学钟凤林博士、陈思博士、福建省农业科学院农业生物资源研究所陈倩倩博士、阮传清博士热情指导与大力支持。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 李恒,苏豹,张兆云,等. 中国重楼资源现状评价及其种植业的发展对策 [J]. 西部林业科学, 2015, 44(3): 1-7.
- [3] 任永权,田茂美,李娇梅,等. 促进华重楼种子萌发和出苗的技术研究 [J]. 种子, 2015, 34(6): 88-91.
- [4] 李昭玲,童凯,闫燊,等. 变温层积过程中华重楼种胚后熟生理生化的变化 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 629-633.
- [5] 黄玮,孟繁蕴,张文生,等. 滇重楼种子休眠机理研究 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 242-246.
- [6] 李戈,唐玲,王艳芳,等. 不同层积条件下滇重楼种子的生理变化 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(7): 149-153.
- [7] 李海峰,赵昱,袁朗白,等. 滇重楼种子休眠破除及植株形态发生的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 161-164.
- [8] 张绍山,刘璇,王景富,等. 多因素处理对云南重楼及其多芽品系种子萌发的影响 [J]. 中草药, 2017,

- 48(10): 2111-2115.
- [9] 赵俊凌, 罗承彬, 李 戈, 等. 不同层积处理滇重楼种子内源激素变化的研究 [J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(3): 28-29.
- [10] 赵永华, 杨世林, 刘惠卿, 等. 西洋参种胚形态后熟过程中种子内源激素变化动态及其对种胚发育的调节 [J]. 中草药, 2001, 42(2): 65-68.
- [11] 蒋德安, 朱 城. 植物生理学实验指导 [M]. 成都: 成都科技大学出版社, 1998.
- [12] Beers E P. Programmed cell death during plant growth and development [J]. *Cell Death Differenti*, 1997, 4(8): 649-661.
- [13] Amalo K, Chen G X, Asade K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants [J]. *Plant Cell Physiol*, 1994, 35(3): 497-504.
- [14] 李 恒. 重楼属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [15] 段 娜, 贾玉奎, 徐 军, 等. 植内源激素研究进展 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(2): 159-165.
- [16] 王丽萍, 李志刚, 谭乐和, 等. 植物内源激素研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(4): 1912-1914.
- [17] 宋发军, 余晓东, 刘 佳, 等. 激素和 PEG 对华重楼种子萌发的影响 [J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2015, 34(2): 14-17.
- [18] 金雅琴, 李冬林, 黄雪方. 栎木种子低温层积过程中内源激素含量的动态变化特征 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(11): 2255-2261.
- [19] 浦 梅, 孙永玉, 高成杰, 等. 滇重楼种子内源激素含量与种胚长度和萌发的关系 [J]. 林业科学研究, 2016(2): 268-273.
- [20] 赵俊凌, 罗承彬, 李 戈, 等. 不同层积处理滇重楼种子内源激素变化的研究 [J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(3): 28-29.
- [21] 吴 君, 李因刚, 罗修宝, 等. 白花树种子处理过程中内源激素动态变化 [J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(5): 988-992.
- [22] 郑秀珍. 紫穗槐和刺槐种子萌发过程中内源激素含量及相关酶活性的动态变化 [J]. 长江大学学报: 自科版, 2006(8): 163-165.
- [23] 黄 玮, 孟繁蕴, 张文生, 等. 滇重楼种子休眠机理研究 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 242-246.
- [24] 王艳芳, 唐 玲, 李荣英, 等. 影响滇重楼种子萌发及胚根生长因素的研究 [J]. 云南中医学院学报, 2012, 35(2): 28-31.
- [25] 宋发军, 罗 忠, 黄 珍, 等. 赤霉素处理对重楼种子萌发相关生理指标的影响 [J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2016, 35(3): 30-34.
- [26] 袁理春, 陈 翠, 杨丽云, 等. 温度和赤霉素对滇重楼种子二次发育的影响 [J]. 种子, 2003, 131(5): 34-35.
- [27] 吴劲松, 种 康. 茉莉酸作用的分子生物学研究 [J]. 植物学通报, 2002, 19(2): 164-170.