

- 成调控的研究[J]. 中草药, 2006, 37(6): 924-928.
- [3] 王梦亮, 任振兴, 刘滇生. 前体和诱导子饲喂黄芩愈伤组织强化黄芩苷生产研究[J]. 中草药, 2007, 38(1): 128-130.
- [4] Dai Y, Shi C H, Tang H, *et al.* The purification of polyphenol oxidase in tobacco and its properties [J]. *Acta Tabac Sin.*, 2001, 7(4): 7-12.
- [5] 胡风庆, 王关林, 马辉, 等. 东北红豆杉细胞培养物 PPO 活性研究[J]. 植物研究, 2001, 21(4): 583-586.
- [6] 赵伶俐, 范崇辉, 葛宏, 等. 植物多酚氧化酶及其活性特征的研究进展[J]. 西北林学院学报, 2005, 20(3): 156-159.

药用峨眉野连种子形态及萌发条件的研究

张春平¹, 何平^{1*}, 袁凤刚², 胡世俊³, 张益锋¹, 高珊¹

(1. 西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715; 2. 徐州医学院 生物化学与分子生物学研究中心, 江苏 徐州 221002; 3. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要:目的 通过对峨眉野连种子形态和萌发生理的研究, 找到打破种子休眠、提高种子萌发率的最佳条件。方法 观察种子外观形态, 对峨眉野连种子长宽、千粒质量、含水量、吸水率、生活力和萌发等多项生理指标进行测定, 考察不同温度、不同激素质量浓度对种子萌发率的影响。结果 TTC(四氮唑)染色法测得的种子的生活力低, 仅为56%。空粒和无生活力的种子占44%, 表明峨眉野连发育完全的种子较少。种子的吸水实验表明种皮透水性较好, 完全吸水时间仅为6 h, 从而可以判断, 种皮不可能是萌发率过低的制约因素。萌发实验显示, 4℃是种子较为适宜的萌发温度, 发芽率可达到54.43%。5.0 mg/L的GA₃(赤霉素)处理后的萌发率提高最为显著, 可达73.48%, 但是过高质量浓度(7.5 mg/L)的GA₃则对种子萌发有一定的抑制效应。结论 种子生活力较低, 且种子休眠, 这可能是导致其萌发率低的重要原因。峨眉野连种子在不同温度和不同质量浓度的激素处理下存在着很大的差异, 为其人工栽培生产提供了理论依据。

关键词:峨眉野连; 种子; 生活力; 萌发率; 休眠

中图分类号: R282.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)11-1799-04

Morphology and germination characteristics of medicinal plant *Coptis omeiensis* seeds

ZHANG Chun-ping¹, HE Ping¹, YUAN Feng-gang², HU Shi-jun³, ZHANG Yi-feng¹, GAO Shan¹

(1. Key Laboratory (Ministry of Education) of Eco-environments of Three Gorges Reservoir Region, Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources Research for Three Gorges Reservoir Region, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Research Center of Biochemistry and Molecular Biology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China; 3. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: Objective To break the dormancy and improve the germination rate of the seeds of *Coptis omeiensis*, the morphology and germination characteristics of *C. omeiensis* seeds were studied. **Methods** Several physiological indexes, like the weights per thousand seeds, content of moisture, the rate of water absorption, seed vigor, and different germination rates were measured. The germination rate of *C. omeiensis* seeds was determined under different temperatures and different concentration of hormone, GA₃ treatment. **Results** Seed vigor tested by TTC was relatively low (56%), while empty seeds and seeds without vitality could reach 44%, which indicated that there was a limitation in seed development of *C. omeiensis*. The water absorption experiment proved that the water permeability of seed coat was better, it could achieve complete absorption in only 6 h. A conclusion could be got that the seed coat was not the limiting factor of low seed germination rate. The experiment of germination showed that 4℃ was the most appropriate temperature for the seed germination with the germination rate up to 54.43%. The effect of 5.0 mg/L GA₃ on germination was the most significant to stimulate the rate of germination by 73.48%. But it also showed that higher concentration (7.5 mg/L) could restrain the germination. The most suit-

收稿日期: 2009-02-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070080)

作者简介: 张春平(1982—), 男, 山东潍坊人, 博士研究生, 主要从事植物资源学与植物分子生物学等方面的研究。

Tel: 13667652727 E-mail: chunpingzhang520@163.com

* 通讯作者 何平 Tel: (023)68254122 E-mail: heping196373@126.com

able parameters is 4 °C and 5.0 mg/L GA₃. **Conclusion** Low seed vigor and seed dormancy may be the main reasons which could cause the low germination rate of *C. omeiensis* seeds. Significant differences exist in the germination rate of *C. omeiensis* seeds which are affected by the factor of temperature and hormone. The result of this study provides scientific evidences for growth and cultivation of *C. omeiensis* seeds.

Key words: *Coptis omeiensis* (Chen) C. Y. Cheng; seed; vitality; germination rate; dormancy

峨眉野连 *Coptis omeiensis* (Chen) C. Y. Cheng 为毛茛科黄连属多年生草本植物,习称“岩连”,为国家二级濒危保护植物^[1],主要分布在四川西部的峨眉、雅安与洪雅地区海拔 1 000~1 700 m 的隐蔽悬岩陡壁上。野连性寒、味苦,具有清热、解毒、泻火、燥湿和良好的抗菌作用^[2,3]。由于其叶片窄长,形似雉尾,故又有“凤尾连”的美称,野连单枝略微弯曲,表面黑褐,断面金黄,比家种黄连色泽更深,味道更苦,质量更优。野连根茎及叶部的有效成分小檗碱的量高于属内其他各种,具有值得重视的资源保护与利用价值,但是现在野连居群数量及个体数濒危稀少,野生资源相当匮乏。目前,峨眉野连的人工栽培主要参照黄连的栽培方式,并且规模受到局限,而且由于峨眉野连种子体积小,对生长环境的要求严格,自身要经过 6 个月左右的形态后熟和生理后熟过程才能萌发^[4]等特点,因此在自然播种条件下,往往会出现发芽率低、出苗率不整齐等现象,影响了其产量及品质。所以,提高峨眉野连种子的发芽率是进行人工栽培的重要任务。本实验通过对峨眉野连种子的相关形态指标和生理指标进行分析研究,旨在揭示影响其种子萌发率低的制约因素。并且采用不同温度及不同质量浓度的 GA₃(赤霉素)对峨眉野连的种子进行了处理,初步探究提高发芽率的合适条件,为人工栽培提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料:供试的峨眉野连种子于 2007 年 5 月采于四川省峨眉山,经峨眉山种质资源保护站李策洪工程师鉴定为 6 年生峨眉野连当年产种子。种子采集回实验室后,用透气性好的黄沙拌土保存种子,在保存过程中保持湿润,温度为(18±2) °C。进行萌发实验时,用蒸馏水将泥沙进行多次淘洗,将种子分离出来。

1.2 方法

1.2.1 种子的千粒质量:千粒质量是用来表明种子饱满程度的重要指标,因为峨眉野连种子极为难得,所以用百粒质量×10 来表示千粒质量。供试的峨眉野连种子采集后在通风阴凉处风干,进行净度分析后,将纯净的峨眉野连种子用四分法分成 4 份,从

每份中取 25 粒,100 粒为一组,3 次重复,用电子天平称量后计算平均值^[5]。

1.2.2 种子外部形态的测定:将 150 粒饱满的峨眉野连的种子平均分成 3 组,然后分别测量每粒种子的长和宽,每组 50 粒取平均值,最后取 3 组的平均值。

1.2.3 种子含水量测定:先将 100 粒风干的峨眉野连种子进行称质量,然后放入(100±4) °C 烘箱内烘 4 h,取出,在干燥器内冷却至室温后再称质量。前后两次称量的差值与未烘干前质量的比值即为含水量。即含水量(%)=(W₂-W₃)/(W₂-W₁)×100%,W₁ 为最后一次恒重时称量瓶的质量,W₂ 为未进行烘干前称量瓶加种子的质量,W₃ 为烘干后称量瓶加种子的质量。

1.2.4 种子吸水量的测定:选择饱满的种子 100 粒置于 24 °C 的恒温箱内进行吸胀,每隔 1 h 取出种子,用滤纸吸干种子表面水分,称质量。直到吸水量不再增加为止,3 次重复,最后计算平均值。

1.2.5 种子活力的测定:采用 TTC(红四氮唑)染色法测定种子的生活力^[6]。首先将种子浸泡 2 h,然后将种子上的水用滤纸吸干,小心地将种子切开,用 1% 的 TTC 溶液在 30 °C 的恒温箱内进行染色,溶液要浸没种子。8 h 后取出种子,用蒸馏水冲洗干净,观察染色反应。有生活力种子的胚会被染成红色,无生活力的种子则不会被染色。由于峨眉野连种子的胚非常小,长度不到 1 mm,因此,在观察胚的时候,要在盛有蒸馏水培养皿中,将胚分离出来,再观察是否染红。每个培养皿中放置 50 粒种子,全部剖开,重复 3 次,取平均值。

1.2.6 胚的形态观察:经过 TTC 染色后的种子的胚呈现明显的红色,将分离后的胚制成临时装片,在 Nikon 光学显微镜下进行观察,并进行拍照。

1.2.7 不同处理后的种子萌发实验:将峨眉野连种子于不同温度 and 不同质量浓度的 GA₃ 处理下进行萌发实验,比较各不同条件下萌发率的差异,从而找出最佳萌发条件。温度设置 4 个梯度,分别是 4、12、20、25 °C。每个梯度设 3 组,每组设 3 个重复,每个重复 50 粒种子。选用 4 种不同质量浓度的 GA₃ 对种子进行处理,分别为 0.5、2.5、5.0、7.5

mg/L。每个梯度同样设 3 组,每组设 3 个重复,每个重复 50 粒种子。种子放于直径 9 cm 的培养皿内,底部平铺两层滤纸,上面覆盖一层细沙。每隔 10 d 往培养皿内滴加不同质量浓度的 GA_3 溶液,40 d 后统计发芽率。统计所得数据在 SPSS11.0 上进行反正弦转换后,计算标准差。

2 结果与分析

2.1 种子形态和相关的生理指标:峨眉野连种子棕褐色,外部形态呈长圆形,经测定 150 粒的平均长度为 2.61 mm,宽度约为 0.76 mm,胚长度约为 0.75 mm,千粒的平均质量约为 0.99 g(表 1)。

表 1 峨眉野连种子的相关形态指标

Table 1 Relative morphological indexes of *C. omeiensis* seeds

组别	种子长/mm	种子宽/mm	胚长度/mm	千粒质量/g	种子含水量/%
第 1 组	2.63±0.05	0.74±0.02	0.75±0.03	0.94±0.08	13.82±0.83
第 2 组	2.56±0.02	0.76±0.04	0.73±0.04	1.04±0.14	14.76±1.02
第 3 组	2.65±0.04	0.77±0.02	0.78±0.05	0.98±0.07	14.98±0.84
平均值	2.61±0.02	0.76±0.03	0.75±0.02	0.99±0.11	14.52±0.92

经测量种子的含水量约为 14.52%,最高吸水率达到 24.50%。种子的吸水率曲线见图 1。通过以上结果可以看出,峨眉野连种子非常小,千粒质量仅 1 g 左右,这可能是峨眉野连在长期的进化中的一种适应对策。因为峨眉野连虽然结籽率很高,但是有相当多的部分(28%)都是瘪粒,还有一部分是半饱满的种子,饱满的种子占少数,并且种子的胚属于胚后熟类型,发芽率低,幼苗成苗率更低。种子的完全吸水时间仅 6 h 左右,峨眉野连种子在前 5 h 内吸水率较快,而后速度变缓,6 h 后基本趋向平衡,不再变化,吸水率最高达到 24.50%。这说明了峨眉野连种子的种皮透水性较好,种皮几乎不可能

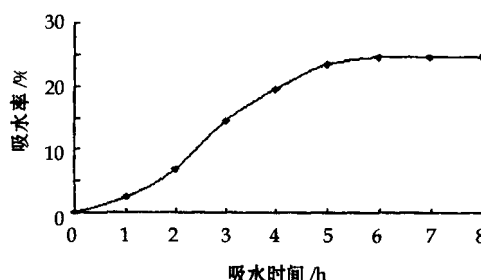


图 1 峨眉野连种子吸水率曲线

Fig. 1 Water absorption rate curve of *C. omeiensis* seeds 是峨眉野连发芽率低的制约因素。

2.2 种子活力的测定及胚的形态结构观察:TTC 染色法被广泛用于种子活力的检测,该法简便、准确、快速,不受休眠状态的限制^[7]。结果见表 2,有生活力的种子占 56%,空粒和无生活力种子占 44%,其中空粒种子占 28%。无生活力的种子未能染色的部位在胚芽端,此位置也正是茎叶的原始体,因此没有生活力,种子根本不可能成苗。

表 2 峨眉野连种子生活力的四氮唑(TTC)染色法检验

Table 2 Vigor of *C. omeiensis* seeds tested by TTC

组别	有生活力/粒	无生活力/粒	空粒/粒
第 1 组	30	11	9
第 2 组	26	17	7
第 3 组	28	14	8
总计	84	42	24
比例(%)	56.0	28.0	16.0

峨眉野连种子的胚长度在 0.75 mm 左右,难以观察,必须先在盛有清水的玻璃器皿中分离出来,然后置于显微镜下,才能看清楚。肉眼直接观察,不能判断出染色与否。胚的结构如图 2 所示,胚前端钝圆,后端分叉,呈“火箭形”。

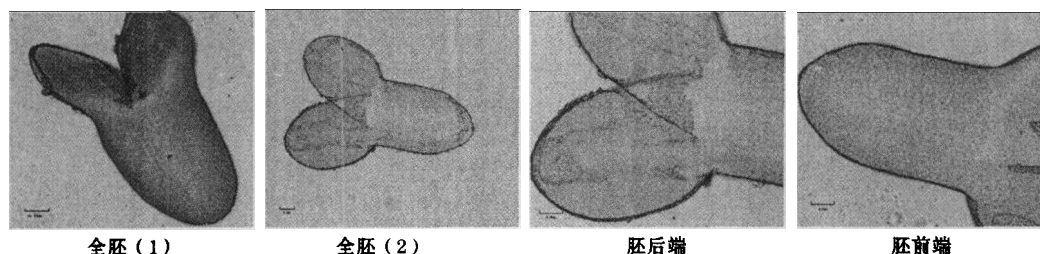


图 2 黄莲种子胚的形态

Fig. 2 Morphology of embryo of *C. omeiensis* seeds

2.3 不同处理后的种子萌发率:结果见表 3 和 4。表 3 中显示的是不同的温度下种子萌发率的不同,通过表 3 可以很明显的看出:峨眉野连种子在 4 个温度梯度中,4 °C 下的平均萌发率最高,可达 54.43%,25 °C 下的平均萌发率最低,只有 16.25%,两者差距较为显著,萌发率呈降低的趋势。这说明

峨眉野连的种子比较适合在较低的温度下萌发,并且在 20 °C 和 25 °C 下萌发的种子,部分出现了霉烂的现象,这也说明了低温是种子萌发的合适条件。

表 4 显示的是不同质量浓度的 GA_3 对萌发率的影响。可以看出:在 ≤ 5.0 mg/L 的质量浓度范围内,平均萌发率呈增长趋势,最低的是清水对照组,

只有 44.80%, GA_3 处理组最高可达到 73.48%。但在整个的浓度梯度中, 萌发率的趋势却发生了改变, 在质量浓度为 7.5 mg/L 时, 萌发率降为最低, 仅有 35.37%, 甚至低于 0.5 mg/L 下的萌发率, 这可能是过高浓度的 GA_3 抑制了种子的萌发, 因为相对高浓度的 GA_3 本身就有抑制作用。因此, 5.0 mg/L 的 GA_3 是最佳的诱导浓度。通过对不同温度梯度和浓度梯度处理结果的分析, 可以得出最佳的诱导峨眉野连种子萌发的条件, 即 4 °C 下用 5.0 mg/L 的 GA_3 溶液定期(10 d/次)进行诱导, 可以大幅度地提高种子的萌发率, 可以达到 78.24%。

表3 不同温度下的种子萌发率

Table 3 Germination rates in different temperatures

温度/°C	萌发率/%			
	第1组	第2组	第3组	平均值
4	57.26±1.20**	49.14±1.87**	56.88±1.73**	54.43±4.58**
12	38.55±1.04**	32.32±1.05**	29.49±1.14**	33.45±4.63**
20	23.64±0.83*	21.56±0.94	21.32±0.27	22.17±1.27*
25	16.27±0.47	17.15±0.82	15.33±1.24	16.56±0.51

与 25 °C 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs 25 °C表4 不同质量浓度 GA_3 下的种子萌发率Table 4 Germination rates in different concentration of GA_3

GA_3 / (mg · L ⁻¹)	萌发率/%			
	第1组	第2组	第3组	平均值
0.5	53.23±1.32*	56.27±1.84**	48.75±2.26	52.75±3.78
2.5	60.48±1.89**	62.35±1.74**	60.94±1.62**	61.26±0.97**
5.0	72.12±1.87**	70.86±1.32**	77.47±1.96**	73.48±3.51**
7.5	38.23±0.83	32.18±1.26**	35.71±0.73*	35.37±3.03
对照(CK)	46.31±0.32	42.45±0.87	45.66±0.41	44.80±2.06

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

千粒质量和含水量是评价种子质量的重要指标, 千粒质量决定田间的播种量, 而种子含水量则对种子的物理性质和生理特性有着显著的影响, 含水量越高, 种子的呼吸作用越强, 代谢功能也就越旺盛, 种子越容易萌发。峨眉野连种子的含水量较低, 仅为 14.52%, 这与其萌发率较低有一定的联系。峨眉野连种子种皮透水性比较好, 但是萌发率仍然很低, 很显然峨眉野连种子的萌发制约因素不在于种皮, 这不同于毛柄小勾儿茶、银杏等植物的种子^[8]。种子的生活力是种子萌发的生理基础, 也是衡量种子质量高低的重要指标之一^[9]。通过测定, 峨眉野连种子的生活力较低, 空籽率也很高(28%),

并且胚具后熟作用, 种子内含有抑制种子萌发的物质, 造成种子休眠, 因此, 总体上看萌发率并不高。而且还与温度等外界条件有较大的关系, 这也可以解释为什么峨眉野连成苗率低, 育苗困难的现象。至于为什么其还要产生大量的没有萌发力的种子, 这可能是进化过程中的一种生殖对策, 为了适应外界的环境, 峨眉野连选择了产生大量种子, 以“量”取胜。

峨眉野连种子的萌发是受多因素制约的, 除了本身胚的后熟, 种子的休眠外, 外界诸如温度、光照、海拔等可能都会对其萌发产生影响, 本实验只从温度因素探讨了其对种子萌发的影响, 其他的外界条件有待于进一步深入地探讨。打破种子休眠、促进萌发的方法很多, 其中化学物质对种子进行处理是最常用的方法, 例如休眠的秤锤树种子在酸蚀的基础上经 GA_3 溶液浸种处理可获得较高的萌发率^[10], 濒危植物南川升麻经过 GA_3 的预处理后, 发芽率也有大幅度的提高^[11]。 GA_3 作为一种重要的植物内源激素, 是一种萌发刺激物质, 在种子的萌发中起着重要的调节作用^[12]。针对胚的后熟对种子萌发造成的影响, 在实验中选择了 GA_3 对种子进行诱导, 得到了最佳的诱导浓度, 明显提高了萌发率。本实验中对促进种子萌发的条件进行了初探, 为保护野生峨眉野连种质资源以及大规模的人工种植提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 傅立国. 中国植物红皮书—稀有濒危植物(第一册)[M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [2] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中国药用植物栽培学[M]. 北京: 农业出版社, 1991.
- [3] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [4] 杨继祥. 药用植物栽培[M]. 北京: 农业出版社, 1991.
- [5] 刘丽, 郭巧生, 王云鹏, 等. 药用鼠尾草种子萌发特性的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(19): 1587.
- [6] 陶嘉玲, 郑光华. 种子活力[M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [7] 谢宗强, 李庆梅. 濒危植物银杉种子特性的研究[J]. 植物生态学报, 2000, 24(1): 82.
- [8] 党海山, 张燕君, 江明喜, 等. 濒危植物毛柄小勾儿茶种子休眠与萌发生理的初步研究[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(4): 327.
- [9] 郑光华, 史忠礼, 赵同芳. 实用种子生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1990.
- [10] 徐本美, 冯桂强, 史华. 从秤锤树种子的萌发论酸蚀处理效应[J]. 种子, 1999(5): 45.
- [11] Fu J, Qi W Q, Gu Z H. et al. Seed dormancy and germination in *Cimicifuga nanchuanensis* [J]. *Acta Bot Sin*, 1998, 40(4): 303.
- [12] Maarten K, Bentsink L, Henk H. Seed dormancy and germination [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 5(1): 33.