变温层积对解除滇重楼种子休眠及其内源激素变化的研究

陈疏影，尹品训，杨艳琼，王 荔*，叶 玉，沈 阳
云南农业大学农学与生物技术学院，云南 昆明 650201

摘 要：目的 研究滇重楼种子破休眠的方法及其内源激素水平变化规律。**方法** 以变温层积处理的滇重楼种子为材料，利用高效液相色谱法（HPLC）测定种胚发育过程中植物激素赤霉素（GA）、吲哚乙酸（IAA）、脱落酸（ABA）量的变化与种子胚率的关系。**结果** 变温层积处理可在 3 个月内打破滇重楼种子休眠，其 GA 量显著升高，ABA 量显著下降。**结论** 内源激素 ABA 和 GA 在滇重楼种子休眠与萌发过程中起着重要的作用。

关键词：滇重楼种子；变温层积处理；解除休眠；种胚发育；内源激素
中图分类号：R282.7 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2011)04 - 0793 - 03

Rule of breaking *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* seed dormancy under fluctuating temperature stratification and content changes of endogenous hormone

CHEN Shu-ying, YIN Pin-xun, YANG Yan-qiong, WANG Li, YE Yu, SHEN Yang
College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: Objective To study the rule of breaking seed dormancy and content changes of endogenous hormone of the *Paris polyphylla* var. *Yunnanensis* seeds. **Methods** The seeds were treated under fluctuating temperature, and the content of endo-hormone, such as GA, IAA, and ABA, was mensurated by HPLC. **Results** During the first three months, the stratification under fluctuating temperature could break the seed dormancy. The content of GA rose obviously and the content of ABA reduced. **Conclusion** It is suggested that ABA and GA have significant effect on the dormancy and germination of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* seeds.

Key words: *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz. seeds; fluctuating temperature stratification; break dormancy; embryo development; endogenous hormone

滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz.是延龄草科 Trilliaceae 重楼属 *Paris* 植物多叶重楼 *Paris polyphylla* Smith 下的一个变种，是我国西南地区的道地药材。其根状茎可直接入药，含有甾体皂苷、黄酮苷等多种有效成分，具有抗肿瘤、止血、免疫调节等功效[1-5]，是“云南白药”、“宫血宁”等著名中成药的主要原料[6]。

滇重楼种子需经过 2 次低温休眠才能萌发，在自然情况下需要两冬一夏才能出土成苗，15 个月的出苗率仅为 46.2%[7]，大量种子在漫长的休眠期间丧失了生命力。滇重楼种子的这种“二次休眠”的生理特性，极大地限制了滇重楼实生苗的人工栽培，使其自然的年生产量远远低于制药业的年消耗量，因此开展滇重楼种子生理学研究，探讨其休眠机制及破休眠的有效方法是滇重楼驯化栽培与资源再生的关键。本实验通过对变温层积处理的滇重楼种子的种胚分化发育与激素量变化动态分析，阐述变温层积及滇重楼种子内源激素与种胚发育的关系，为滇重楼种子破休眠提供理论依据及技术储备。

1 材料与方法

1.1 材料

材料采自大理州鹤庆县，由云南农业大学陈严平副教授鉴定为新鲜滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz.的种子。

1.2 方法

1.2.1 交替变温层积处理 将新鲜滇重楼种子洗去外果皮，晾干表皮水分。置于自配基质中进行昼夜交替变温层积处理（15/20 ℃），以同期播于云南农

收稿日期：2010-06-25
基金项目：国家自然科学基金资助项目（30860367）
作者简介：陈疏影（1972—），男，云南昭通人，副教授，主要从事药用植物生理生化特性研究。
*通讯作者 王 荔 E-mail: wangli5820840@yahoo.com.cn

业大学农学院农场中的种子作为对照（CK）。在层积（播种）后 0、30、60、90 d 时分别取样。

1.2.2　胚率的测定　在不同的层积时间段，每次取 20 粒种子，沿种胚中央将胚乳切成两半。在双目解剖镜下用测微尺测量胚及胚乳的长度，并计算平均胚率（胚率＝胚长 / 胚乳长）。

1.2.3　内源激素的提取　在不同的层积时间段分别取样品，先经液氮冷冻后，再贮藏于低温冰箱中（−80 ℃）保存，以备测试。参照黄芸[8]、曾庆钱[9]等方法。精确称取样品 3.0 g，每个样品分为 2 份，其中一份碾磨时加入 GA、IAA 和 ABA 的混合对照品，另一份不加；加 8 倍 80%冰冻甲醇磨碎，4 ℃低温避光浸提 13～15 h，离心取上清液，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；加入 PVPP（0.2 g/g，日本东京化成工业株式会社）充分摇匀，离心取上清液，过反相 C_{18} 柱，氮气吹干流出液，以 1 mL pH 3.0 缓冲液溶解，醋酸乙酯等体积萃取 3 次，合并醋酸乙酯相，氮气吹干，以 1 mL 甲醇溶解，用于 HPLC 分析。

1.2.4　内源激素的测定

仪器与试剂：Agilent 1200 高效液相色谱仪，色谱柱为 Hypersil ODS（C_{18}）反相柱（25 cm×5.0 mm，5 μm）；激素对照品（IAA、ABA、GA）均为 Sigma 产品；乙腈与甲醇为色谱纯，其他试剂均为分析纯，实验用水为超纯水。

色谱条件：流动相为甲醇-乙腈-磷酸缓冲液（20∶20∶60，pH 3.5），体积流量为 1 mL/min；柱温 35 ℃；进样量为 20 μL，检测波长 210 nm。以对照品出峰时间和峰高叠加定性，外标法定量。

2　结果与分析

2.1　变温层积过程中滇重楼种子胚率的变化

变温层积过程中，滇重楼种子胚率与层积时间的关系见图 1。可以看出，种胚生长速率与层积时间有密切关系，随层积时间的推移，胚率逐渐增大。从胚率的变化趋势可判断变温层积处理种子的种胚开始分化发育，进入形态后熟过程。而播种于自然条件下的滇重楼种子对照（CK）胚率无显著变化，仍处于休眠状态。

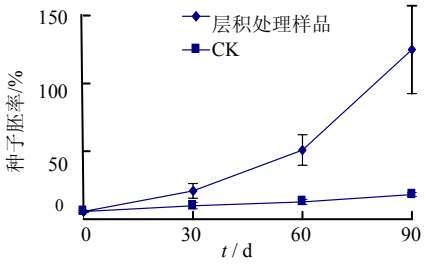

图 1　滇重楼种子变温层积过程中胚率的变化

Fig. 1　Embryo ratio during fluctuating temperature stratification of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* seeds

2.2　滇重楼种子变温层积过程中内源激素的动态变化

GA、IAA、ABA 的量的动态变化见图 2，GA/ABA 值的动态变化见图 3。与播种于自然条件下的对照相比较，变温层积种子的 GA、ABA 2 种激素的量有显著或极显著的变化。由图 2 可看出，在变温层积过程中，种子内源 GA 的量随着滇重楼种胚的分化发育快速增加；滇重楼种子在变温层积 90 d 时，其内源 ABA 的量逐渐降低至刚采收成熟种子量的一半以下。而在变温层积 90 d 时，滇重楼种子内源 IAA 量变化不显著。从图 3 可知，滇重楼种子在变温层积处理 90 d 时，GA/ABA 值随种胚分化发育而逐渐增加，与刚采收成熟种子相比，增加了 5 倍以上，其变化趋势与胚率的变化趋势相一致。

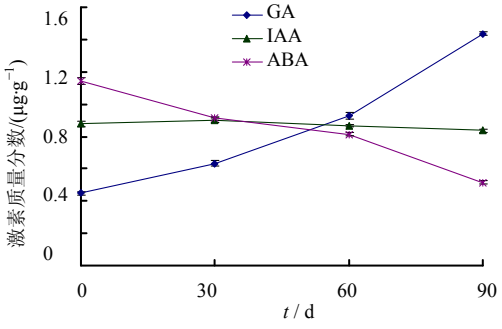

图 2　滇重楼种子变温层积过程中内源激素的变化

Fig. 2　Endogenous hormone content during fluctuating temperature stratification of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* seeds

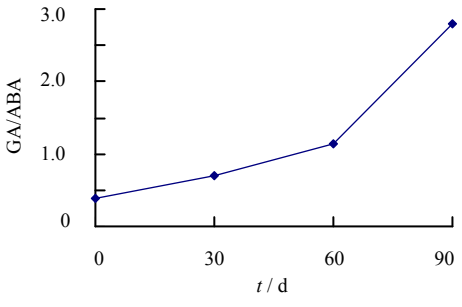

图 3　滇重楼种子变温层积过程中 GA/ABA 值的变化

Fig. 3　GA/ABA ratio during fluctuating temperature stratification of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* seeds

3 讨论

3.1 滇重楼种子胚形态后熟与休眠的关系

本研究通过对刚采收时的新鲜滇重楼种子进行切片观察，发现滇重楼种子确实存在着胚形态后熟现象，即种子内只有一个圆形未分化的原始胚，整个种子处于休眠状态。与黄玮等[10]研究结果相同。所以滇重楼种子需要经过一个较长时间的形态后熟及生理后熟作用后才能萌发，这是滇重楼作为原产温带的高山植物对环境的一种适应方式[11]。本研究模拟高山自然环境中春夏季的气温变化模式，将滇重楼种子置于 15/20 ℃条件下进行变温层积处理（昼夜交替变温），使种子提前进入形态及生理后熟过程，快速促进种胚的发育，提前解除滇重楼种子的休眠期。

3.2 滇重楼种子内源激素变化与休眠的关系

种子对环境变化的感受（包括温度、水分等）最终体现为种子内部各内源激素量及比值的动态变化。在对许多种子的研究中发现，ABA 及 GA 是控制种子休眠及萌发的一对主要内源激素因素[12-14]。ABA 与种子胚的发育等生理过程有关，是控制种子休眠的主要因素，在休眠种子中通常有较高的 ABA 水平[15]。GA 参与调控植物生长发育的各个阶段包括种子发芽、茎生长、叶片表皮、开花发育、花与果成熟等不同阶段的发育过程，可通过对 ABA 的拮抗作用来打破种子休眠[16]，促进种子胚的发育及种子的萌发。结果可以看出，ABA 量持续降低、GA 量逐渐增加，GA/ABA 值的增大与滇重楼种胚发育过程具同样的趋势。因此，提高 GA/ABA 值可能是打破滇重楼种子休眠的有效方法之一。本研究发现，在所设定的 90 d 变温处理期间，IAA 量没有显著变化，说明在种胚生理后熟阶段，IAA 不是促进种胚发育的主要因素。据相关文献报道[17-18]，IAA 对其他种子的萌发也几乎无促进作用，但对植物体内 GA 的合成、幼芽的生长具有重要作用，在胚轴生长期其量会有显著增加。

参考文献

[1] 季 申, 周坛树, 张锦哲. 中药重楼和云南中药中抗肿瘤细胞毒活性物质 Gracillin 的测定 [J]. 中成药, 2001, 23(2): 212-215.

[2] 许 玲, 刘嘉湘. 益肺抗瘤饮对肺癌转移及免疫功能的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(7): 401-403.

[3] 王 羽, 高文远, 袁理春, 等. 滇重楼的化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 17-20.

[4] 王艳霞, 李惠芬. 重楼抗肿瘤作用研究 [J]. 中草药, 2005, 36(4): 628-630.

[5] 颜璐璐, 张艳军, 高文远, 等. 滇重楼皂苷成分体内外抗肺癌活性研究 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 424-428.

[6] 边洪荣, 李小娜, 王会敏. 重楼的研究及应用进展 [J]. 中药材, 2002, 25(3): 218-230.

[7] 李运昌. 重楼属植物引种栽培的研究Ⅰ. 滇重楼的有性繁殖试验初报 [J]. 云南植物研究, 1982, 4(4): 429-431.

[8] 黄 芸, 崔力剑, 刘伟娜, 等. HPLC-ELSD 法分析重楼商品药材中甾体皂苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(15): 1230-1233.

[9] 曾庆钱, 陈厚彬, 鲁才浩, 等. HPLC 测定荔枝不同器官中内源激素流程的优化 [J]. 果树学报, 2006, 23(1): 145-148.

[10] 黄 玮, 孟繁蕴, 张文生, 等. 滇重楼种子休眠机理研究 [J]. 植物生理科学, 2008, 24(12): 242-246.

[11] 孟繁蕴, 汪丽娅, 张文生, 等. 滇重楼种胚休眠和发育过程中内源激素变化的研究 [J]. 中医药学报, 2006, 34(4): 36-38.

[12] Kucera B, Cohn M A, Leubner-Metzger G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination [J]. *Seed Sci Res*, 2005, 15(4): 281-307.

[13] Rohde1 Antje, Bhalerao R P. Plant dormancy in the perennial context [J]. *Trends Plant Sci*, 2007, 12(5): 217-223.

[14] 韩明玉, 张满让, 田玉命. 植物激素对几种核果类种子休眠破除和幼苗生长的效应研究 [J]. 西北植物学报, 2002, 22(6): 1348-1354.

[15] Abdallah A, D A, Barhoumi Z, *et al*. ABA, GA, and nitrate may control seed germination of *Crithmum maritimum* (Apiaceae) under saline conditions [J]. *Comptes Rendus Biol*, 2009, 332(8): 704-710.

[16] Bewley J. D. Seed germination and domancy [J]. *Plant Cell*, 1997, 9: 1055-1066.

[17] 赵 鑫, 马小军, 凯撒·苏莱曼, 等. 低温解除阜康阿魏种子休眠和内源激素变化规律的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 268-270.

[18] 雷泞菲, 彭书明, 牛 蓓, 等. 珍稀濒危植物珙桐种子休眠萌发过程中内源激素的变化 [J]. 广西植物, 2009, 29(1): 66-69.