三七种子后熟过程中内源激素的动态变化

段承俐[1,2]，段银妹[2]，萧凤回[1,2*]

1. 浙江农林大学林业与生物技术学院，浙江 临安 311300
2. 云南农业大学中药材研究所，云南省中药材规范化种植技术指导中心，云南 昆明 650201

摘 要：目的 通过对三七种子后熟过程中内源激素变化规律的研究，探索内源激素在种胚发育进程和休眠解除中的作用机制，为三七种子的处理和种源保存奠定基础。**方法** 采用酶联免疫法（ELISA）对三七种子后熟过程中的内源激素赤霉素（GA）、吲哚乙酸（IAA）、玉米素核苷（ZR）和脱落酸（ABA）进行动态测定。**结果** 三七种子后熟过程中，内源 GA、IAA 和 ZR 的量随种胚的发育进程而增加，而 ABA 的量则减少。**结论** 激素平衡的变化是解除三七种子休眠、促进萌发的决定因素之一。

关键词：三七种子；后熟；内源激素；赤霉素；动态变化；酶联免疫法

中图分类号：R282.21 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2011)04 - 0779 - 04

Dynamic changes of endogenous phytohormones during after-ripening process of *Panax notoginseng* seeds

DUAN Cheng-li[1,2], DUAN Yin-mei[2], XIAO Feng-hui[1,2]

1. Faculty of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agriculture & Forestry University, Lin'an 311300, China;
2. Institute of Chinese Medical Materials, Yunnan Agricultural University, Yunnan Provincial GAP Center of Chinese Medical Materials, Kunming 650201, China

Abstract: Objective The studies were carried out on the endogenous phytohormone changes of *Panax notoginseng* seeds during the after-ripening process in order to understand the machanism of endogenous phytohormones (GA, IAA, ZR, and ABA) in the process of embryo development and dormancy release. **Methods** Dynamic changes of endogenous phytohormones of *P. notoginseng* seeds were measured by ELISA method through the entire after-ripening process. **Results** The contents of endogenous GA, IAA, and ZR increased with the embryo development, while the ABA content decreased contrarily. **Conclusion** The change of phytohormone balance is one of determining factors for relieving dormancy and promoting germination of *P. notoginseng* seeds.

Key words: *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen seeds; after-ripening; endogenous phytohormones; GA; dynamic changes; ELISA

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 是五加科人参属多年生草本植物，以根、根状茎入药，为我国特有的名贵药材，含有皂苷、黄酮、多糖等多种成分[1-4]。在云南、广西已有 400 余年的种植历史。目前三七主产地为云南省文山州，其面积和产量占全国的 98%以上，三七已成为当地的经济支柱产业和独具特色的生物资源[5]。

三七是通过种子繁殖的植物，果实成熟自母体脱落时，胚尚未发育完全，正处于胚发育的心形期，所以三七种子与同属的人参、西洋参的种子一样是典型的胚后熟类型[6-7]。种子的后熟发育是一个复杂的生理生化过程，随着对种子后熟生理研究的深入，人们发现植物激素是与种胚发育密切相关的重要因子，并开展了大量有效的研究工作[8]。1975 年，Khan[9]提出了种子的休眠与萌发由萌发促进物质赤霉素（GA）、细胞分裂素（CK）和萌发抑制物质脱落酸（ABA）之间的相互作用而决定，种子在不同发育时期各种内源激素处于生理有效或无效的质量分数，而质量分数的变化又取决于诸多的内外因素。许多研究也表明，种子完成后熟并具有萌发能力与

收稿日期：2010-06-24

基金项目：国家自然科学基金资助项目（30760116）；云南省自然科学基金资助项目（2007C204M）

作者简介：段承俐（1964—），女，北京人，副教授，硕士生导师，主要从事药用植物的资源及生理研究工作。
Tel: (0571)63741273 E-mail: chengliduan@hotmail.com

***通讯作者** 萧凤回 E-mail: fenghuixiao@163.com

种子内抑制物的减少、促进物的出现以及“抑制物－促进物”的比例变化有关，取决于激素绝对量的消长和相对比例的变化[10]。

在种子的生长发育过程中，植物激素起着非常重要的调控作用，它们的量也常随着种子后熟的进程而呈现出规律性的消长变化[10]。研究植物激素在三七种子后熟发育过程中的变化规律，对阐述内源激素与种胚发育的关系，了解三七种子的后熟发育机制，并指导生产中的种子贮藏、种质资源保存和育种工作具有重要意义。

1　材料与方法

1.1　材料

将采自文山三七研究所砚山基地的三年生三七的成熟果实，搓去果皮，用 5% $CuSO_4$ 消毒，将种子冲洗干净，用滤纸吸干水分，放入湿沙中层积，每隔 10 天取样 1 次进行激素的动态测定，每批样品测定重复 3 次，直到种子萌发为止。

1.2　测定方法

称取三七种子鲜样 0.5～1.0 g 于研钵中，用 4 mL 的 80%甲醇提取液（内含 1 mmol/L 二叔丁基对甲苯酚(BHT)在冰浴中研磨成匀浆，4 ℃下提取 4 h，1 000 r/min 离心 15 min，上清液过 C-18 固相萃取柱，步骤如下：80%甲醇平衡胶柱→上样→收集样品→移开样品后用 100%甲醇洗柱→100%乙醚洗柱→100%甲醇洗柱→循环。将过柱后的样品用氮气吹干，除去提取液中的甲醇，用样品稀释液定容至 1.5 mL。

内源赤霉素（GA）、吲哚乙酸（IAA）、玉米素核苷（ZR）和脱落酸（ABA）的量采用酶联免疫方法（ELISA）进行测定。试剂盒购自中国农业大学，按试剂盒说明测定样品中的激素量，在 DG5031 型酶联免疫测读仪（国营华东电子管厂制造）490 nm 处测定吸光度值，激素量以 ng/g 表示。

2　结果与分析

2.1　三七种子内源 GA 的动态变化

三七种子后熟过程中内源 GA 量呈现出先降后升的变化趋势(图 1)。层积前 GA 的量为 170.232 5 ng/g，在种子层积的前 40 d 内量稍有下降，但变幅不大，层积 40 d 时 GA 的量为 112.339 2 ng/g，与层积前相比下降了 34.01%。从层积 40 d 开始，内源 GA 的量迅速上升，于层积 50 d 时量就增至 203.441 7 ng/g，增幅达 81.09%，并在种子萌发时达到 267.342 1 ng/g。

2.2　三七种子内源 IAA 的动态变化

IAA 量在三七种子后熟过程的变化规律如图 2 所示，呈现出持续上升的趋势，在种子层积前内源 IAA 处于较低水平，只有 70.132 2 ng/g；进入湿沙层积后，三七种子的 IAA 量直线上升，于层积 30 d 时增至 198.500 2 ng/g，与层积前相比增加了 1.83 倍，平均每天增加 4.278 9 ng/g；随后 IAA 的量仍保持上升趋势，但增速变缓，于层积结束时达到最大值 307.507 1 ng/g。

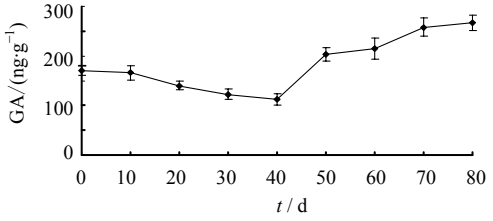

图 1　三七种子后熟过程中内源 GA 量的动态变化

Fig. 1　Dynamic changes of endogenous GA content of *P. notoginseng* seeds during after-ripening process

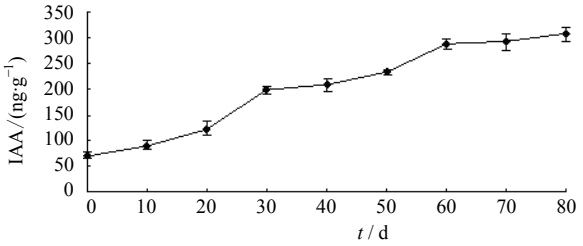

图 2　三七种子后熟过程中内源 IAA 的动态变化

Fig. 2　Dynamic changes of endogenous IAA content of *P. notoginseng* seeds during after-ripening process

2.3　三七种子内源 ZR 的动态变化

三七种子的内源 ZR 与 IAA 的变化规律相似，如图 3 所示，内源 ZR 的量在种子收获时也处于较低水平，测定值为 45.632 8 ng/g；进入层积阶段后 ZR 量缓慢上升，在层积 40 d 后快速增长，从 120.493 6 ng/g 迅速增加到层积 50 d 时达到 194.327 4 ng/g，增幅为 61.28%；此后 ZR 量仍在增加，但增速放缓，在种子发芽时达到最大值 244.236 2 ng/g。

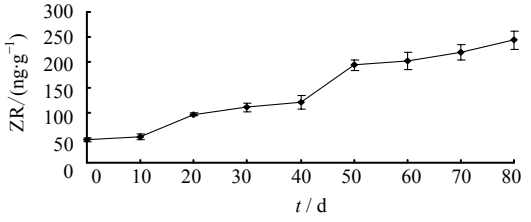

图 3　三七种子后熟过程中内源 ZR 的动态变化

Fig. 3　Dynamic changes of endogenous ZR content of *P. notoginseng* seeds during after-ripening process

2.4 三七种子内源 ABA 的动态变化

内源 ABA 量显示出与前 3 种激素完全相反的变化趋势，从图 4 可看出，三七种子中的 ABA 量在收获时处于一个较高水平，为 22.182 1 ng/g，除在层积的前 10 d ABA 量有小幅攀升，达到了峰值 28.670 8 ng/g，此后 ABA 量随着种胚发育的进程直线下降，在层积结束时降至最低值 4.043 3 ng/g。

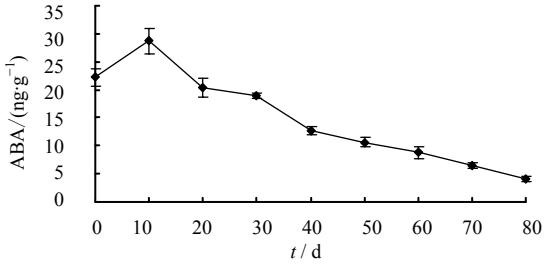

图 4 三七种子后熟过程中内源 ABA 的动态变化

Fig. 4 Dynamic changes of endogenous ABA content of *P. notoginseng* seeds during after-ripening process

2.5 三七种子后熟过程中激素比值的动态变化

三七种子后熟发育过程中激素比值的变化见图 5，随着种胚发育的进程，GA/ABA、IAA/ABA 和 ZR/ABA 的值均呈现增加的趋势，于种子萌发时分别达到 66.12、76. 05、60.41。它们共同的特点是层积前期变化较为平缓，而层积后期（层积 40 d 以后）增幅较快。

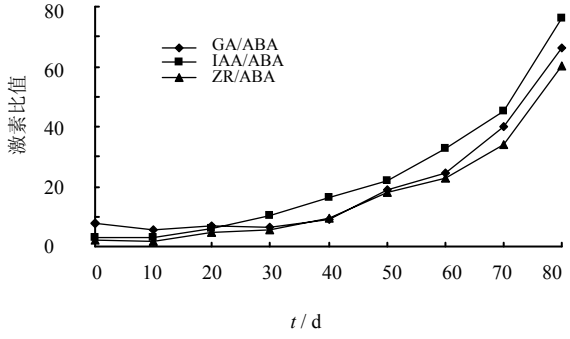

图 5 三七种子后熟过程中的激素比值变化

Fig. 5 Phytohormone ratio changes of *P. notoginseng* seeds during after-ripening process

3 讨论

自然条件下，三七种子在 10～12 月份采收后，要经过 60～80 d 的休眠才能萌发。研究发现三七种子的休眠主要是由于胚发育不全需要后熟而引起的，层积过程也是种胚不断生长和分化发育的过程，同时也会发生复杂的物质代谢和生理生化变化，从而完成种胚发育的形态后熟和生理后熟[2]。

在三七种子的层积过程中，GA、IAA、ZR 和 ABA 的水平都发生了变化，说明三七种子的休眠并不是单一因素引起的，而是促进物和抑制物共同作用的结果。这与西洋参、肉苁蓉、滇重楼等具有后熟作用药用植物种子中的内源激素变化趋势相似[11-13]。

在种子休眠获得或者解除过程中的关键因子是内源信号分子 ABA 和 GA，两者之间存在拮抗作用[14]。本研究发现，GA 量的增加与种胚的快速发育是一致的，即从层积 40 d 开始 GA 量增长迅速，此时三七的种胚处于快速生长期，种胚增大明显，各种代谢作用增强[6]。许多研究都证实，GA 在促进种子发育和调控种子发芽中起着十分重要的作用，它通过提高各种酶活性来加速体内物质的分解与合成从而促进种胚的分化发育和种子萌发[14]。因此可以间接证实 GA 与三七种胚的萌发有关。

在三七的种胚发育过程中，ABA 量变化最大，从层积初期到层积结束下降了 7 倍，所以三七种子的休眠可能与 ABA 的量有关。大量研究显示，ABA 可诱导发育种子的休眠，并抑制种胚的过早萌发和贮藏物质的过早水解转化[15]。三七种子在发育初期内源 ABA 处于较高水平，但层积 10 d 后，种子中的 ABA 量迅速下降，此时种胚发育进入鱼雷期，胚根原基和子叶原基开始形成，ABA 量的下降趋势与种胚发育的完成和休眠的解除呈现出高度的一致性，因此推测 ABA 量的下降是三七种胚发育的启动因子。

生长素能促进细胞的伸长，细胞分裂素能刺激细胞分裂与扩大，并有利于营养物质的动用和运输，因而可以促进种子的萌发[10,16]。研究发现内源 IAA 和 ZR 量的增长与三七种胚的生长速度是一致的，有利于细胞的分裂与增长，从而加快胚后熟的进程，因此它们也是三七种胚发育的促进因子。

种子休眠和萌发不仅与植物内源激素的绝对量有关，还与各类激素之间的平衡、特别是促进生长的激素与抑制生长的激素之间的比例及平衡有关[9]。三七种子后熟过程中激素比值的增加与种胚萌发能力的提高、种胚的分化和休眠的解除是一致的，从而证实激素平衡的变化是打破三七种子休眠、促进萌发的决定因素之一。

参考文献

[1] 时圣明, 袁永兵, 陈常青, 等. HPLC 法在三七及其制

剂现代药学研究中的应用 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 472-476.

[2] Dong H J, Jiang B H, Han Y, *et al*. Transfrmation of compound K from saponins in leaves of *Panax notoginseng* by immobiled β-glucanase [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 41-47.

[3] 张 敏, 胡 坪, 罗国安, 等. 三七剪口指纹图谱研究及应用 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 442-445.

[4] 时圣明, 李 巍, 曹家庆, 等. 三七果化学成分的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1249-1251.

[5] 郑光植, 杨崇仁. 三七生物学及其应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.

[6] 段承俐, 杨 莉, 萧凤回. 三七种胚形态发育的解剖观察 [J]. 种子, 2010, 29(1): 1-4.

[7] 黄耀阁, 刘人崧, 崔树玉, 等. 人参和西洋参种子物理催芽技术研究进展 [J]. 吉林农业大学学报, 1996, 18(4): 106-113.

[8] 宋松泉, 程红炎, 姜孝成, 等. 种子生物学 [M]. 北京科学出版社, 2008.

[9] Khan A A. Primary, preventive and permissive role of hormones in plant systems [J]. *Bot Rev* , 1975, 41: 391-420.

[10] 李 蓉, 叶 勇. 种子休眠与破眠机理研究进展 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(11): 2350-2355.

[11] 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, 32(2): 159-162.

[12] 盛晋华, 张雄杰, 刘宏义, 等. 肉苁蓉种子后熟阶段内源激素含量变化 [J]. 种子, 2006, 25(4): 1-3.

[13] 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]. 中药研究, 2006, 34(4): 36-38.

[14] Brady S M, Mccourt P. Hormone cross-talk in seed dormancy [J]. *J Plant Grow Regulat*, 2003, 22: 25-31.

[15] Kermode A R. Role of abscisic acid in seed dormancy [J]. *J Plant Grow Regulat*, 2005, 24: 319-344.

[16] Nikolić R, Mitić N, Miletić R, *et al*. Effects of cytokinins on *in vitro* seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. [J]. *J Plant Grow Regul*, 2006, 25: 187-194.

《现代药物与临床》杂志征稿、征订启事

《现代药物与临床》杂志（CN12-1407/R，ISSN 1674-5515）是国家级医药科技期刊，天津市一级期刊，2009 年 1 月由《国外医药•植物药分册》更名为《现代药物与临床》，并被美国《化学文摘》（CA）、波兰《哥白尼索引》（IC）、美国《乌里希期刊指南》（Ulrich's Periodicals Directory），CNKI 中国期刊全文数据库、中国核心期刊（遴选）数据库等收载。为了进一步提高期刊质量，2010 年出版的《现代药物与临床》全新改版，更加突出创新性与实用性，紧跟国内外药学发展趋势，适时追踪热点，从栏目内容、文章质量，到封面版式、装帧印刷都得到了全面的提升与改进。

办刊宗旨：报道国内外药物研究的新进展与新技术，以及药物在临床应用方面的最新动态，为新药研发、生产人员以及临床医生与药剂师合理用药提供有益的参考。

内容与栏目：涵盖药物的基础研究与临床研究各学科，设置“专论与综述”、“实验研究”、“临床研究”、“未来药物”、“药事管理”、“知识产权”、“药物经济学”和“市场信息”等栏目。“专论与综述”栏目除报道植物药研究的最新进展外，诚征有关药物与临床研究前沿的前瞻性文章。

读者对象：药物研发、生产、监管人员，以及临床医生与药剂师。

《现代药物与临床》双月刊，国内外公开发行，封面铜板彩色覆膜。为扩大信息量、缩短出版周期，本刊由 64 页扩版为 80 页；为惠顾广大读者，改版不提价，每期定价仍为 15 元，全年 90 元。本刊自办发行，请直接与编辑部联系订阅。

本刊网上在线投稿、审稿、查询系统正式开通，欢迎投稿、欢迎订阅！

《现代药物与临床》编辑部

地址：天津市南开区鞍山西道 308 号（300193）　**电话与传真：**（022）23006823

网址：www.中草药杂志社.中国　**邮箱：**dc@tiprpress.com

开户银行：兴业银行天津南开支行　**网址：**www.中草药杂志社.中国

账号：44114010010081504　**户名：**天津中草药杂志社　www.tiprpress.com